



**HAL**  
open science

**Evaluation de l'état de viabilité et du pouvoir d'infectiosité de trois micro-organismes pathogènes pour l'homme (bactérie: Campylobacter, virus: Adenovirus et parasite: Cryptosporidium) détectés dans des échantillons d'eaux destinées à des fins alimentaires**

Adeline Tissier

► **To cite this version:**

Adeline Tissier. Evaluation de l'état de viabilité et du pouvoir d'infectiosité de trois micro-organismes pathogènes pour l'homme (bactérie: Campylobacter, virus: Adenovirus et parasite: Cryptosporidium) détectés dans des échantillons d'eaux destinées à des fins alimentaires. Autre. Université de Lorraine, 2012. Français. NNT : 2012LORR0034 . tel-01749204

**HAL Id: tel-01749204**

**<https://hal.univ-lorraine.fr/tel-01749204v1>**

Submitted on 29 Mar 2018

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

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



## AVERTISSEMENT

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

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

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

Contact : [ddoc-theses-contact@univ-lorraine.fr](mailto: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.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php)

<http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm>

Ecole Doctorale BioSE (Biologie-Santé-Environnement)

Thèse

Présentée et soutenue publiquement pour l'obtention du titre de

**DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE LORRAINE**

Mention: « Sciences de la Vie et de la Santé »

Par **Adeline TISSIER**

**Evaluation de l'état de viabilité et d'infectiosité de trois micro-organismes pathogènes pour l'Homme (bactérie: *Campylobacter*, virus: *Adenovirus* et parasite: *Cryptosporidium*) détectés dans des échantillons d'eaux destinées à des fins alimentaires**

Le 11 Avril 2012

**Membres du Jury:**

**Rapporteurs:** M<sup>r</sup> Francis Mégraud, Professeur, Université Victor-Segalen, Bordeaux

M<sup>r</sup> Pierre Pothier, Professeur, Université de Bourgogne, Dijon

**Examineurs:** M<sup>elle</sup> Isabelle Bertrand, Maitre de Conférences, Université de Lorraine, Nancy

Mr Philippe Hartemann, Professeur, Département de Santé Publique, Université de Lorraine, directeur de thèse

**Membres invités:** M<sup>r</sup> Benoît Gassilloud, Docteur, Agence Nationale de Sécurité Sanitaire, Nancy



## **Remerciements**

Je tiens tout d'abord à remercier mon directeur de thèse, Philippe Hartemann, pour la confiance qu'il m'a accordée en acceptant de diriger ce travail doctoral, pour ses remarques et ses conseils judicieux.

Je remercie Benoit Gassilloud pour ses généreux conseils, sa gentillesse et la patience qu'il a manifesté à mon égard, mais surtout pour toute l'aide apportée tout au long de ce travail.

Je souhaite remercier Francis Mégraud et Pierre Pothier pour m'avoir fait l'honneur d'accepter de juger ce travail en tant que rapporteurs. Mes remerciements vont également à Isabelle Bertrand pour avoir accepté de participer à mon jury de thèse.

Je remercie l'ANSES de m'avoir permis de réaliser mes travaux de recherche au sein du Laboratoire d'Hydrologie de Nancy. Merci à l'ensemble du personnel pour son accueil et sa bonne humeur. Je tiens à remercier tout spécialement Cristina, pour son soutien moral qui m'a énormément aidé surtout à la fin, moment le plus difficile de la thèse.

Je souhaite également remercier Martine Denis, Anne Thebault et Bruno Polack pour leurs conseils lors de mon comité de pilotage.

Je tiens également à remercier toutes les communes ayant acceptées de participer à notre étude, et plus particulièrement l'équipe technique du site E pour leur aide et leur disponibilité.

Je remercie ma famille et plus particulièrement, mes parents, même si aucun mot ne sera jamais à la hauteur de ce que je ressens. Merci pour votre aide irremplaçable et votre inconditionnel soutien depuis toujours. Merci d'être là à chaque instant pour partager mes joies mais également pour me reconforter dans les moments plus difficiles. Je vous suis infiniment reconnaissante et vous dédie ce travail. Mon frère jumeau, Jérôme, qui malgré la distance et nos rares visites, sait toujours trouver les mots pour me faire rire (d'ailleurs, souvent je suis la seule à qui ça fait rire), merci tout simplement d'être là, et j'espère que tu es fier de ta jumelle.

Enfin, je voudrais remercier, Grégoire, ma moitié, qui a autant souffert que moi (et peut-être même plus) pendant ces années de thèse. Je te suis infiniment reconnaissante pour tout l'amour que tu me portes, et je sais que sans toi, je n'aurai peut-être pas été au bout de cette périlleuse aventure. Cette thèse est un peu aussi la tienne... que ce travail soit le témoignage de mon amour.



# Sommaire

<b>LISTE DES ABREVIATIONS .....</b>	<b>1</b>
<b>LISTE DES TABLEAUX .....</b>	<b>3</b>
<b>LISTE DES FIGURES .....</b>	<b>7</b>
<b>INTRODUCTION.....</b>	<b>13</b>
<b>ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE .....</b>	<b>21</b>
1. <i>Campylobacter</i> .....	23
1.1. Description générale .....	23
1.1.1. Historique et taxonomie du genre <i>Campylobacter</i> .....	23
1.1.2. Morphologie des campylobacters .....	24
1.1.3. Génome des campylobacters .....	25
1.2. Epidémiologie des infections à <i>Campylobacter</i> chez l'Homme .....	26
1.2.1. Signes cliniques de la campylobactériose .....	26
1.2.2. Dose infectieuse .....	27
1.2.3. Réservoirs et voies de contamination .....	28
1.2.4. Incidence de la campylobactériose .....	29
1.3. Niveau de contamination des eaux par les campylobacters.....	34
1.3.1. Niveau de contamination des eaux de surface .....	34
1.3.2. Niveau de contamination des eaux faiblement turbides .....	34
1.3.3. Corrélations avec les indicateurs de contamination fécale.....	34
1.4. Persistance des campylobacters dans l'environnement.....	37
1.4.1. Principaux facteurs naturels impactant la survie des campylobacters .....	38
1.4.2. Efficacité des traitements de potabilisation.....	41
1.4.3. Mécanismes de survie des campylobacters .....	43
1.5. Méthodes de détection des campylobacters dans l'eau .....	45
1.5.1. Méthodes de concentration des campylobacters.....	46
1.5.2. Méthodes de détection des campylobacters .....	49
2. Les virus pathogènes à transmission hydrique .....	56
2.1. Virus des hépatites.....	56
2.1.1. Le virus de l'hépatite A .....	56
2.1.2. Le virus de l'hépatite E .....	57
2.2. Les virus provoquant des infections multiples.....	57
2.3. Les virus responsables de gastro-entérites.....	58
2.3.1. Les calicivirus .....	59
2.3.2. Les rotavirus .....	61
2.3.3. Les astrovirus.....	62
2.3.4. Les adénovirus .....	63
2.4. Contamination virale du milieu hydrique .....	64
2.4.1. Concentration des virus entériques dans l'eau .....	64
2.4.2. Virus entériques et indicateurs de contamination fécale .....	72
2.5. Persistance des virus pathogènes pour l'Homme dans l'eau .....	73

2.5.1.	Survie des virus entériques dans les conditions environnementales .....	73
2.5.2.	Persistence des virus face aux traitements de potabilisation .....	79
2.6.	Détection des virus entériques dans l'eau .....	83
2.6.1.	Méthodes de concentration des virus entériques .....	83
2.6.2.	Méthodes de détection des virus entériques.....	97
3.	<i>Cryptosporidium</i> .....	100
3.1.	Historique et taxonomie .....	100
3.1.1.	Historique .....	100
3.1.2.	Taxonomie .....	100
3.2.	Génome de <i>Cryptosporidium</i> .....	102
3.3.	Epidémiologie des infections à <i>Cryptosporidium</i> chez l'Homme .....	103
3.3.1.	Cycle d'infection .....	103
3.3.2.	Symptômes de la cryptosporidiose .....	104
3.3.3.	DI <sub>50</sub> et pouvoir pathogène .....	105
3.3.4.	Incidence de la cryptosporidiose.....	105
3.4.	Niveau de contamination du milieu hydrique par les parasites <i>Cryptosporidium</i> ....	106
3.4.1.	Eaux de forte turbidité .....	106
3.4.2.	Eaux de faible turbidité .....	107
3.4.3.	<i>Cryptosporidium</i> et indicateurs de contamination fécale .....	110
3.5.	Persistence des oocystes de <i>Cryptosporidium</i> dans l'eau.....	110
3.5.1.	Survie des oocystes dans les conditions environnementales .....	110
3.5.2.	Persistence face aux procédés de traitement de potabilisation .....	111
3.6.	Détection de <i>Cryptosporidium</i> dans l'eau.....	114
3.6.1.	Méthode de concentration de <i>Cryptosporidium</i> .....	115
3.6.2.	Méthode de détection de <i>Cryptosporidium</i> .....	125

## **MATERIELS ET METHODES..... 129**

1.	<i>Campylobacter</i> .....	131
1.1.	Les souches de <i>Campylobacter</i> .....	131
1.2.	Méthode de concentration des campylobacters à partir des eaux .....	131
1.3.	Méthodes de détection des campylobacters.....	132
1.3.1.	Détection de <i>C. jejuni</i> et <i>C. coli</i> par biologie moléculaire.....	132
1.3.2.	Détection des campylobacters par la méthode de culture .....	134
2.	Adénovirus humains .....	135
2.1.	Virus.....	135
2.2.	Méthode de concentration des adénovirus humains.....	135
2.3.	Méthodes de détection et quantification du génome d'adénovirus humains .....	136
2.3.1.	Extraction de l'ADN viral.....	136
2.3.2.	Détection du génome des adénovirus humains par PCR en temps réel .....	137
2.3.3.	Culture des adénovirus infectieux.....	137
3.	<i>Cryptosporidium</i> .....	138
3.1.	Suspension d'oocystes <i>C. parvum</i> .....	138
3.2.	Méthode de concentration des oocystes de <i>Cryptosporidium</i> .....	139
3.3.	Méthodes de détection des parasites <i>Cryptosporidium</i> .....	140
3.3.1.	Quantification des oocystes de <i>Cryptosporidium</i> par immunofluorescence ...	140
3.3.2.	Quantification du génome des espèces de <i>Cryptosporidium</i> pathogènes pour l'Homme	141

4.	Construction d'un étalon moléculaire .....	141
5.	Analyse et Traitement statistique des données .....	145

## **RESULTATS ET DISCUSSION..... 147**

### **PARTIE 1: EVALUATION ET DEVELOPPEMENTS METHODOLOGIQUES .....149**

1.	Campylobacter.....	152
1.1.	Détection des espèces <i>C. coli</i> et <i>C. jejuni</i> par biologie moléculaire .....	152
1.1.1.	Contexte .....	152
1.1.2.	Détection de <i>C. jejuni</i> et <i>C. coli</i> par PCR en temps réel .....	153
1.1.3.	Evaluation de la méthode d'extraction d'ADN de <i>C. jejuni</i> et <i>C. coli</i> .....	158
1.2.	Mise en évidence de la viabilité de <i>C. jejuni</i> et <i>C. coli</i> .....	163
1.2.1.	Contexte .....	163
1.2.2.	Robustesse de la méthode de PCR couplée à la méthode de culture pour la révélation de la viabilité des campylobacters.....	165
1.3.	Concentration des campylobacters dans l'eau .....	170
1.3.1.	Contexte .....	170
1.3.2.	Evaluation de la méthode de concentration dans les eaux faiblement chargées	170
1.3.3.	Evaluation de la méthode de concentration dans les eaux fortement chargées	174
2.	Les adénovirus humains.....	176
2.1.	Détection des adénovirus humains dans l'eau par biologie moléculaire (PCR).....	176
2.1.1.	Contexte .....	176
2.1.2.	Évaluation de la méthode de détection de l'ADN des adénovirus humains....	177
2.1.3.	Evaluation de la méthode d'extraction de l'ADN des adénovirus humains....	183
2.2.	Mise en évidence de l'infectiosité des adénovirus humains.....	186
2.2.1.	Contexte .....	186
2.2.2.	Détection des adénovirus humains infectieux par ICC-PCR en microplaque ...	186
2.3.	Concentration des adénovirus dans l'eau.....	191
2.3.1.	Contexte .....	191
2.3.2.	Evaluation de la méthode de concentration des adénovirus dans les eaux faiblement chargées .....	191
2.3.3.	Evaluation de la méthode de concentration des adénovirus dans les eaux turbides	193
3.	<i>Cryptosporidium</i> .....	195
3.1.	Détection des espèces de <i>Cryptosporidium</i> pathogènes pour l'Homme par biologie moléculaire.....	195
3.1.1.	Contexte .....	195
3.1.2.	Développement et évaluation de la méthode de détection de <i>Cryptosporidium</i> par PCR en temps réel.....	196
3.1.3.	Évaluation de la méthode d'extraction génomique .....	200
3.2.	Estimation de la viabilité de <i>Cryptosporidium</i> .....	204
3.2.1.	Contexte .....	204
3.2.2.	Evaluation de la méthode combinée d'EMA-PCR en temps réel .....	205
3.3.	Concentration des oocystes de <i>Cryptosporidium</i> dans l'eau .....	209
4.	Discussion.....	211
4.1.	Les méthodes de concentration.....	211

4.1.1.	<i>Campylobacter</i> .....	212
4.1.2.	Adénovirus humains.....	213
4.1.3.	<i>Cryptosporidium</i> .....	213
4.2.	Les méthodes de détection.....	214
4.2.1.	<i>Campylobacter</i> .....	215
4.2.2.	Adénovirus humains.....	215
4.2.3.	<i>Cryptosporidium</i> .....	216
4.3.	Mise en évidence de la viabilité .....	217
4.3.1.	<i>Campylobacter</i> .....	217
4.3.2.	Adénovirus humains.....	218
4.3.3.	<i>Cryptosporidium</i> .....	219

**PARTIE 2: NIVEAU DE CONTAMINATION FECALE DE DIFFERENTS MILIEUX HYDRIQUES ENVIRONNEMENTAUX PAR DES CAMPYLOBACTERS, DES ADENOVIRUS HUMAINS ET DES PARASITES CRYPTOSPORIDIUM ..... 221**

1.	Description des sites d'étude.....	224
2.	Concentration des pathogènes ciblés dans la Moselle.....	226
2.1.	Pollution fécale de la Moselle au niveau du site E .....	226
2.1.1.	Paramètres physico-chimiques .....	226
2.1.2.	Les indicateurs bactériens de contamination fécale et ASR.....	229
2.1.3.	<i>Campylobacter</i> .....	230
2.1.4.	Les adénovirus humains .....	233
2.1.5.	Les parasites <i>Cryptosporidium</i> .....	235
2.2.	Pollution fécale de la Moselle au niveau des sites A, B, C, D, E, F, G et H.....	236
2.2.1.	Les paramètres physico-chimiques .....	236
2.2.2.	Les indicateurs bactériens de contamination fécale .....	236
2.2.3.	<i>Campylobacter</i> .....	237
2.2.4.	Les adénovirus humains .....	239
2.2.5.	<i>Cryptosporidium</i> .....	239
2.2.6.	Corrélations entre les paramètres physico-chimiques, les indicateurs bactériens et les micro-organismes d'intérêt dans la Moselle.....	240
3.	Concentration des pathogènes ciblés dans les nappes alluviales .....	243
3.1.	Pollution fécale de la nappe alluviale au niveau du site E .....	243
3.1.1.	Les paramètres physico-chimiques .....	243
3.1.2.	Les indicateurs de contamination fécale et ASR .....	244
3.1.3.	<i>Campylobacter</i> .....	244
3.1.4.	Les adénovirus humains .....	246
3.1.5.	<i>Cryptosporidium</i> .....	249
3.2.	Pollution fécale de la nappe alluviale au niveau des sites A, B, C, E, G et H. ....	249
3.2.1.	Paramètres physico-chimiques .....	249
3.2.2.	Les indicateurs de contamination fécale.....	250
3.2.3.	<i>Campylobacter</i> .....	250
3.2.4.	Les adénovirus humains .....	250
3.2.5.	<i>Cryptosporidium</i> .....	251
4.	Concentration des pathogènes ciblés dans l'eau traitée.....	251
4.1.	Pollution fécale dans l'eau traitée au niveau du site E .....	251
4.1.1.	Les paramètres physico-chimiques .....	252

4.1.2.	Les indicateurs de contamination fécale et les spores de bactéries ASR.....	255
4.1.3.	<i>Campylobacter</i> .....	255
4.1.4.	Les adénovirus humains .....	256
4.1.5.	<i>Cryptosporidium</i> .....	256
4.2.	Pollution fécale de l'eau traitée au niveau des sites A, B, C, D, F, G et H. ....	257
4.2.1.	Les paramètres physico-chimiques .....	257
4.2.2.	Indicateurs de contamination fécale.....	258
4.2.3.	<i>Campylobacter</i> .....	258
4.2.4.	Les adénovirus humains .....	258
4.2.5.	<i>Cryptosporidium</i> .....	258
5.	Discussion.....	259
5.1.	Présence des campylobacters dans les différents milieux hydriques.....	260
5.2.	Présence des adénovirus humains dans les différents milieux hydriques.....	266
5.3.	Présence des parasites <i>Cryptosporidium</i> dans les différents milieux hydriques .....	270
<b>PARTIE 3: PERSISTANCE DE C. JEJUNI, DE L'ADENOVIRUS 1 ET DE C. PARVUM DANS LES DIFFERENTS MILIEUX HYDRIQUES.....</b>		<b>273</b>
1.	Persistance de la viabilité et du génome de <i>Campylobacter jejuni</i> à 4°C et 22°C .....	275
1.1.	Persistance de <i>C. jejuni</i> dans la Moselle.....	276
1.2.	Persistance de <i>C. jejuni</i> dans la nappe alluviale à 4°C et 22°C.....	278
1.3.	Persistance de <i>C. jejuni</i> dans l'eau d'alimentation.....	281
2.	Persistance du pouvoir infectieux et du génome de l'adénovirus 1 à 4°C et 22°C.....	283
2.1.	Persistance de l'adénovirus 1 dans la Moselle.....	284
2.2.	Persistance de l'adénovirus 1 dans la nappe alluviale .....	286
2.3.	Persistance de l'adénovirus 1 dans l'eau d'alimentation chlorée. ....	288
3.	Persistance de la viabilité et du génome de <i>Cryptosporidium parvum</i> à 4°C et 22°C .....	290
3.1.	Persistance de <i>C. parvum</i> dans la Moselle.....	291
3.2.	Persistance de <i>C. parvum</i> dans la nappe alluviale .....	293
3.3.	Persistance de <i>C. parvum</i> dans l'eau d'alimentation chlorée.....	295
4.	Discussion.....	297
4.1.	Persistance de <i>C. jejuni</i> .....	297
4.2.	Persistance de l'adénovirus 1.....	299
4.3.	Persistance de <i>C. parvum</i> .....	301
4.4.	Comparasion de la persistance des trois micro-organismes.....	304
<b>CONCLUSION.....</b>		<b>307</b>
<b>REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES .....</b>		<b>313</b>
<b>PUBLICATIONS ET COMMUNICATIONS .....</b>		<b>355</b>



## **LISTE DES ABREVIATIONS**

ACP	Analyse en Composante Principale
ADN	Acide désoxyribonucléique
AFSSA	Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments (ancien nom de l'ANSES)
ANSES	Agence Nationale de Sécurité Sanitaire
AQR	Appréciation Quantitative de Risque
ARN	Acide ribonucléique
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
CNRCH	Centre Nationale de Référence des Campylobacters et des Hélicobacters
Ct	Cycle threshold
DAPI	4',6-diamidino-2-phenylindole
DI <sub>50</sub>	Dose infectieuse nécessaire pour provoquer une infection chez 50% des cas ayant ingérés la dose
DIC	Differential interference contrast
ECP	Effet cytopathogène
EMA	Ethidium Monoazide
ET	Ecart Type
FAM	6-carboxyfluorescéine
FITC	Fluorescein Isothiocyanate
HRM	High Resolution Melt
ICC-PCR	Integrated Cell Culture-Polymerase Chain Reaction
IPTG	Isopropyl $\beta$ -D-thiogalactopyranoside
InVS	Institut de Veille Sanitaire
ISO	International Standardization Organisation
LHN	Laboratoire d'Hydrologie de Nancy
NPP	Nombre le Plus Probable
NPPUC	Nombre le Plus Probable d'Unités Cytopathogènes
PBS	Phosphate Buffer Saline
Pb	Paire de base
PCR	Polymerase Chain Reaction
qPCR	Quantitative Polymerase Chain Reaction
PFGE	Pulsed Field Gel Electrophoresis
PI	Propidium iodide
PMA	Propidium Monoazide
RAPD	Randomly Amplified Polymorphic DNA
RFLP	Restriction Fragment Length Polymorphism
RT	Reverse Transcriptase
TAMRA	6-carboxylétraméthylrhodamine
Taq	Thermophilus aquaticus
T <sub>m</sub>	Temperature melting
T <sub>90</sub>	Temps nécessaire pour inactiver 90% d'une population
UFC	Unité Formant Colonie
UFP	Unité Formant Plage
USEPA	United States Environmental Protection Agency
WHO	World Health Organization



## LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1: Principaux micro-organismes pathogènes pour l'Homme transmissibles par l'eau (WHO, 2006).....	15
Tableau 2: Quelques campylobactérioses liées à l'eau de distribution.....	33
Tableau 3: Quelques études cas-témoins conduites dans différents pays sur des cas de campylobactérioses.....	33
Tableau 4: Niveau de contamination des eaux superficielles en <i>Campylobacter</i> .....	35
Tableau 5: Corrélation entre les indicateurs de contamination fécale et les campylobacters.....	37
Tableau 6: Persistance de <i>C. jejuni</i> et <i>C. coli</i> en fonction des conditions expérimentales.....	39
Tableau 7: Valeurs de CT (mg/L.min) pour obtenir une inactivation d' <i>E. coli</i> de 3,5 log <sub>10</sub> à 3,7 log <sub>10</sub> par l'ozone.....	43
Tableau 8: Bactéries capables d'entrer dans un état de VNC (Oliver, 2005).....	43
Tableau 9: Evaluation des techniques de concentration des campylobacters dans l'eau.....	47
Tableau 10: Comparaison des différentes méthodes génotypiques (Wassenaar et Newell, 2000; Foxman <i>et al.</i> , 2005).....	53
Tableau 11: Classification actuelle des entérovirus (King <i>et al.</i> , 1999).....	57
Tableau 12: Epidémies de gastro-entérites virales d'origine hydrique investiguées en France par l'InVS entre 2000 et 2006 (Beaudeau <i>et al.</i> , 2007).....	61
Tableau 13: Sites d'infections des différents sérotypes des adénovirus (Jiang, 2006).....	64
Tableau 14: Niveau de contamination des eaux de surface par les virus entériques.....	66
Tableau 15: Présence des virus entériques dans les eaux souterraines.....	68
Tableau 16: Présence et concentration des virus entériques dans les eaux potables.....	70
Tableau 17: Facteurs influençant la persistance des virus dans l'environnement (Bosch <i>et al.</i> , 2006).....	73
Tableau 18: Persistance du pouvoir infectieux de quelques virus en fonction de la température et de la nature de la matrice hydrique.....	75
Tableau 19: Inactivation des particules infectieuses et dégradation du génome viral de quelques virus en fonction du milieu hydrique et de la température d'incubation.....	78
Tableau 20: Valeurs de CT (mg.min/L) nécessaires pour l'obtention d'un abattement d'inactivation de 2 log <sub>10</sub> (99%) de différents virus par le chlore libre à 5°C dans du PBS en fonction du pH.....	82
Tableau 21: Rendements de concentration des virus entériques avec la laine de verre dans des matrices hydriques faiblement turbides.....	84
Tableau 22: Rendements de concentration des virus avec la méthode d'adsorption-élution sur laine de verre dans des matrices hydriques fortement turbides.....	85
Tableau 23: Rendement des techniques de concentration des virus entériques à partir d'eaux de faible turbidité.....	87
Tableau 24: Rendement des techniques de concentration des virus entériques à partir d'eaux de turbidité variable.....	92
Tableau 25: Hôtes majoritaires et lieux d'infection des différentes espèces de <i>Cryptosporidium</i> (Caccio <i>et al.</i> , 2005; OIE, 2005; Smith et Nichols, 2007).....	101
Tableau 26: Caractéristique du génome de <i>C. parvum</i> et <i>C. hominis</i> (Xu <i>et al.</i> , 2004).....	102
Tableau 27: Quelques cryptosporidioses associées à l'eau de distribution en Europe.....	106
Tableau 28: Niveau de contamination des eaux environnementales en oocystes de <i>Cryptosporidium</i> .....	108

Tableau 29: Niveau de contamination des eaux d'alimentation en oocystes de <i>Cryptosporidium</i> ....	109
Tableau 30: Efficacité ( $\log_{10}$ ) des différentes étapes de traitement de l'eau concernant l'élimination des oocystes de <i>Cryptosporidium</i> sp. et des kystes de <i>Giardia</i> sp. en fonction de la turbidité de l'eau en sortie d'étape de traitement (d'après AFSSA, 2001) .....	112
Tableau 31: Valeurs de CT (mg/L.min) mesurées pour une inactivation des oocystes de <i>Cryptosporidium</i> par un traitement au dioxyde de chlore (d'après Chauret <i>et al.</i> , 2001).....	113
Tableau 32: Efficacité des traitements chimiques pour l'inactivation de <i>Cryptosporidium</i> (d'après Baudin <i>et al.</i> (2001)) .....	114
Tableau 33: Valeurs de CT (mg/mL.min) pour l'inactivation des oocystes de <i>Cryptosporidium</i> par ozonation (WHO, 2004).....	114
Tableau 34: Rendements de techniques de concentration des oocystes de <i>Cryptosporidium</i> à partir d'eaux de faible turbidité .....	118
Tableau 35: Rendements de concentration des oocystes de <i>Cryptosporidium</i> à partir d'eaux de turbidité variable .....	122
Tableau 36: Séquences cibles, méthodes employées et principales applications des techniques moléculaires d'amplification (Caccio <i>et al.</i> , 2005).....	126
Tableau 37: Composition du milieu réactionnel utilisé pour la PCR qualitative .....	142
Tableau 38: Séquences nucléotidiques des amorces utilisées pour la PCR qualitative .....	144
Tableau 39: Composition du milieu réactionnel pour la PCR qualitative sur colonie .....	144
Tableau 40: Séquences nucléotidiques des amorces et des sondes fluorogéniques utilisées pour la détection et la quantification de l'ADN de <i>C. coli</i> et <i>C. jejuni</i> .....	154
Tableau 41: Composition du milieu réactionnel utilisé en PCR quantitative pour la détection et la quantification de l'ADN de <i>C. jejuni</i> et <i>C. coli</i> .....	154
Tableau 42: Coefficients de variation (CV %) obtenus en conditions de répétabilité (CV % intra-essai) et de reproductibilité (CV% inter essai) à partir des gammes de dilutions logarithmiques du stock d'ADN plasmidique de <i>C. jejuni</i> .....	157
Tableau 43: Coefficients de variation (CV %) obtenus en conditions de répétabilité (CV % intra essais) et de reproductibilité (CV% inter-essais) à partir des gammes de dilutions logarithmiques du stock d'ADN plasmidique de <i>C. coli</i> .....	158
Tableau 44: Coefficients de variation observés lors de l'estimation de la variabilité inter-essais (CV% inter-essais) de l'étape d'extraction pour différentes concentrations de <i>C. jejuni</i> dans du tampon PBS et du tampon d'élution.....	160
Tableau 45: Coefficients de variation observés lors de l'estimation de la variabilité inter-essais (CV% inter-essais) de l'étape d'extraction pour différentes concentrations de <i>C. coli</i> dans du tampon PBS et du tampon d'élution.....	161
Tableau 46: Coefficients de variation observés lors de l'estimation de la variabilité inter-essais (CV% inter-essais) de l'étape d'extraction pour différentes concentrations de <i>C. jejuni</i> et <i>C. coli</i> ...	163
Tableau 47: Détection de <i>C. jejuni</i> par culture sur milieu gélosé mCCDA avec ou non une étape préalable d'enrichissement .....	164
Tableau 48: Détection des espèces <i>C. coli</i> et <i>C. jejuni</i> par la méthode de culture-PCR en fonction du bouillon d'enrichissement employé et du volume d'eau analysé.....	164
Tableau 49: Valeurs des Tm obtenus à partir des amplicons de souches de <i>C. jejuni</i> , <i>C. coli</i> et <i>C. lari</i> .....	166
Tableau 50: Caractéristiques des membranes testées pour la concentration des campylobacters ..	171

Tableau 51: Rendements d'adsorption des différentes membranes mesurés par PCR en temps réel (RR <sub>PCR</sub> ) et par culture (RR <sub>c</sub> ).....	172
Tableau 52: Séquences nucléotidiques des amorces et de la sonde TaqMan utilisées pour la détection et la quantification des adénovirus humains par PCR en temps réel (Jothikumar <i>et al.</i> , 2005)	177
Tableau 53: Composition du milieu réactionnel de PCR quantitative pour la détection et la quantification des adénovirus humains .....	177
Tableau 54: Coefficients de variation obtenus en conditions de répétabilité (CV% intra-essais) et de reproductibilité (CV% inter-essais).....	179
Tableau 55: Séquences nucléotidiques des amorces utilisées pour la détection des adénovirus humains entériques (Jothikumar <i>et al.</i> , 2005).....	181
Tableau 56: Composition du milieu réactionnel de PCR quantitative pour la détection des adénovirus humains entériques.....	181
Tableau 57: Coefficients de variation déterminés en conditions de reproductibilité (CV% inter-essais) lors de l'extraction de l'ADN de différentes quantités d'adénovirus 1 inocuées dans du tampon PBS et du tampon d'éluion.....	185
Tableau 58: Quantité de génome d'adénovirus 1 mesurée au cours du temps par PCR en temps réel lors de l'infection des cellules A549 (ICC-PCR) (n=2).....	189
Tableau 59: Sensibilité de détection des méthodes de culture cellulaire et d'ICC-PCR après 96h d'inoculation sur cellules A549 en comparaison avec la méthode de détection par PCR en temps réel.....	190
Tableau 60: Rendements de concentration, rendement global et interférence mesurés à partir d'échantillons d'eau de réseau artificiellement contaminés avec de l'adénovirus 1, en fonction du diamètre de la cartouche et du volume d'échantillon filtré .....	192
Tableau 61: Critères de sélection des amorces et de la sonde TaqMan pour la PCR en temps réel (logiciel Primer Express) .....	196
Tableau 62: Séquences nucléotidiques des amorces et de la sonde utilisées pour la détection et la quantification de <i>C. parvum</i> , <i>C. hominis</i> et <i>C. meleagridis</i> par PCR en temps réel.....	197
Tableau 63: Composition du milieu réactionnel de PCR en temps réel pour la détection et la quantification de <i>C. parvum</i> , <i>C. hominis</i> et <i>C. meleagridis</i> .....	197
Tableau 64: Coefficients de variation obtenus en conditions de répétabilité (CV % intra-essais) et de reproductibilité (CV% inter-essais).....	199
Tableau 65: Coefficients de variation (CV%) obtenus après extraction génomique d'une suspension de 100 µL d'oocystes de <i>C. parvum</i> à différentes concentrations, en présence ou non de thiocyanate de guanidium.....	201
Tableau 66: Coefficients de variation observés lors de l'estimation de la variabilité intra-essais (CV% intra-essais) du système d'extraction génomique pour différentes concentrations d'oocystes de <i>C. parvum</i> (n=3) .....	203
Tableau 67: Rendements de la méthode de concentration sur cartouche Envirochek, purification par IMS et détection soit par immunofluorescence soit par PCR en temps réel .....	210
Tableau 68: Synthèse des mesures de température, turbidité, pH, COT et conductivité obtenues dans la Moselle au niveau du site E durant la période d'étude de juin 2010 à mai 2011 .....	229
Tableau 69: Concentration en campylobacters thermotolérants et distribution des espèces <i>C. coli</i> et <i>C. jejuni</i> dans la Moselle au niveau du site E sur la période de juin 2010 à mai 2011 .....	231
Tableau 70: Température, pH, turbidité, COT et conductivité mesurés dans la Moselle au niveau des huit sites .....	236

Tableau 71: Concentrations en campylobacters mesurées par la norme ISO 17995 (2005) et la méthode couplée de culture-PCR dans la Moselle au niveau des huit sites d'étude en mars 2011 .....	238
Tableau 72: Synthèse des résultats obtenus pour les adénovirus humains, dans les échantillons d'eau Moselle au niveau des huit sites en mars 2011.....	239
Tableau 73: Matrice de corrélation (coefficient de corrélation de Pearson).....	242
Tableau 74: Synthèse des mesures de température, turbidité, pH, COT et conductivité obtenues dans la nappe alluviale au niveau du site E durant l'année d'étude.....	243
Tableau 75: Synthèse des résultats de détection des campylobacters par la méthode normalisée ISO 17995, la méthode de culture-PCR et la méthode de PCR en temps réel, dans les échantillons de la nappe alluviale prélevée au niveau du site E durant l'année d'étude.....	245
Tableau 76: Synthèse des résultats obtenus pour les adénovirus humains dans les échantillons d'eau de nappe alluviale au niveau du site E durant l'année d'étude .....	248
Tableau 77: Synthèse des valeurs de température, turbidité, pH, COT, et conductivité mesurées dans les nappes alluviales des différents sites en mars 2011 .....	249
Tableau 78: Synthèse des mesures de température, turbidité, pH, COT, conductivité, chlore libre et chlore total obtenues dans l'eau après traitement sur le site E durant la période d'étude de juin 2010 à mai 2011 .....	254
Tableau 79: Synthèse des mesures de température, turbidité, pH, COT, conductivité et chlore libre et total obtenues en mars 2011 dans l'eau traitée en fonction du site d'étude.....	257
Tableau 80: Modélisation de la perte de viabilité et de la dégradation du génome (ADN intracellulaire et ADN nu) de <i>C. jejuni</i> dans la Moselle à 4°C et 22°C.....	277
Tableau 81: Modélisation de la perte de viabilité et de la dégradation du génome (ADN intracellulaire et ADN nu) de <i>C. jejuni</i> dans la nappe alluviale à 4°C et 22°C .....	280
Tableau 82: Modélisation de la perte de viabilité et de la dégradation du génome (ADN intracellulaire et ADN nu) de <i>C. jejuni</i> dans l'eau d'alimentation chlorée à 4°C et 22°C.....	282
Tableau 83: Modélisation de l'inactivation virale et de la dégradation du génome (ADN encapsidé et ADN nu) de l'adénovirus 1 dans la Moselle à 4°C et 22°C.....	285
Tableau 84: Modélisation de l'inactivation virale et de la dégradation du génome (ADN encapsidé et ADN nu) de l'adénovirus 1 dans la nappe alluviale à 4°C et 22°C .....	287
Tableau 85: Modélisation de l'inactivation des particules virales infectieuses et dégradation du génome (ADN encapsidé et ADN nu) de l'adénovirus 1 dans l'eau d'alimentation chlorée à 4°C et 22°C .....	289
Tableau 86: Modélisation de l'évolution de la quantité d'oocystes totaux et d'oocystes viables ainsi que de la quantité de génome (ADN intracellulaire et ADN nu) de <i>C. parvum</i> dans la Moselle à 4°C et 22°C.....	292
Tableau 87: Modélisation de l'évolution de la quantité d'oocystes totaux et d'oocystes viables ainsi que de la quantité de génome (ADN intracellulaire et ADN nu) de <i>C. parvum</i> dans la nappe alluviale à 4°C et 22°C.....	294
Tableau 88: Modélisation de l'évolution de la quantité d'oocystes totaux et d'oocystes viables ainsi que de la quantité de génome (ADN intracellulaire et ADN nu) de <i>C. parvum</i> dans l'eau d'alimentation chlorée à 4°C et 22°C .....	296

## LISTE DES FIGURES

Figure 1: Probabilité de détecter, grâce aux analyses du contrôle sanitaire, une pollution généralisée d'une unité de distribution d'une durée de 24 heures en fonction de la taille de la population desservie (Beaudeau <i>et al.</i> , 2007) .....	18
Figure 2: Dendrogramme montrant les relations entre les espèces de <i>Campylobacter spp.</i> par comparaison des séquences du gène ARN 16S (On, 2001) .....	24
Figure 3: Photographie obtenue par microscopie électronique des différentes formes cellulaires au centre d'une colonie de <i>C. coli</i> (Ng <i>et al.</i> , 1985).....	25
Figure 4: Représentation schématique du génome circulaire de <i>C. jejuni</i> NCTC 11168 (Parkhill <i>et al.</i> , 2000). En vert, les séquences codantes; en noir, les séquences hypervariables ; en rouge, les gènes impliqués dans la modification des structures de surface.....	26
Figure 5: Mode de transmission des campylobacters à l'Homme (Dromigny, 2007) .....	28
Figure 6: Nombre d'isolement de <i>Campylobacter</i> en France entre 2003 et 2009 en fonction du type de laboratoire (King <i>et al.</i> , 2008).....	30
Figure 7: Nombre d'isollements de <i>Campylobacter</i> selon le mois de prélèvement biologique et l'espèce en France en 2006 (A), 2007 (B), 2008 (C) et 2009 (D) (Espié <i>et al.</i> , 2006; King <i>et al.</i> , 2007; King <i>et al.</i> , 2008; King <i>et al.</i> , 2009) .....	31
Figure 8: Mise en évidence des différents états physiologiques de <i>C. jejuni</i> au cours du temps dans un microcosme d'eau (Federighi <i>et al.</i> , 1998) .....	44
Figure 9: Distribution des souches de calicivirus détectées dans des épidémies de gastro-entérites en France de décembre 1998 à février 2004 selon le mode de transmission (Bon <i>et al.</i> , 2005). SV: sapovirus, GI, GII: seules les souches GI ou GII ont été isolées; GI+, GII+, GI+GII: au moins une souche de norovirus appartenant au génogroupe GI ou GII détectée.....	60
Figure 10: Représentation schématique de la structure des adénovirus (Russell, 2000).....	63
Figure 11: Cycle de contamination virale du milieu hydrique (Schwartzbrod et Bosch, 1991) .....	65
Figure 12: Cycle parasitaire de <i>Cryptosporidium</i> (Smith <i>et al.</i> , 2005).....	103
Figure 13: Carte génétique du plasmide pDrive Cloning Vector (Qiagen) permettant l'insertion du gène d'intérêt. ....	143
Figure 14: Séquence nucléotidique d'une portion de l'ADN plasmidique pDrive Cloning Vector.....	143
Figure 15: Gamme standard permettant la quantification absolue du génome de <i>C. jejuni</i> , obtenue à partir des dilutions logarithmiques du stock d'ADN plasmidique de <i>C. jejuni</i> porteur du gène d'intérêt (n=3).....	155
Figure 16: Courbe de dissociation obtenue à partir d'amplicons issus d'une gamme de dilutions de raison 10 du stock d'ADN plasmidique de <i>C. jejuni</i> . ....	156
Figure 17: Gamme standard permettant la quantification absolue du génome de <i>C. coli</i> , obtenue à partir des dilutions logarithmiques du stock d'ADN plasmidique de <i>C. coli</i> porteur du gène d'intérêt (n=3).....	156
Figure 18: Courbe de dissociation obtenue à partir d'amplicons issus d'une gamme de dilutions logarithmiques d'ADN plasmidique de <i>C. coli</i> .....	157
Figure 19: Gamme standard obtenue à partir d'une gamme de dilutions logarithmiques d'une suspension de <i>C. jejuni</i> réalisée dans le PBS pH 7,4 (A) et dans la solution éluante (B) .....	159
Figure 20: Gamme standard obtenue à partir d'une gamme de dilutions logarithmiques d'une suspension de <i>C. coli</i> réalisée dans le PBS pH 7,4 (A) et dans la solution éluante (B).....	160

Figure 21: Gamme standard obtenue par PCR en temps réel à partir des dilutions logarithmiques d'une suspension de <i>C. jejuni</i> (n=3).....	162
Figure 22: Gamme standard obtenue par PCR en temps réel à partir des dilutions logarithmiques d'une suspension de <i>C. coli</i> (n=3) .....	162
Figure 23: Courbes de dissociation obtenues à partir d'amplicons issus de différentes souches de <i>Campylobacter</i> amplifiés par la PCR <i>C. jejuni</i> .....	167
Figure 24: Courbes de dissociation obtenues à partir d'amplicons issus de différentes souches de <i>Campylobacter</i> amplifiés par la PCR <i>C. coli</i> .....	167
Figure 25: Courbes de dissociation obtenues à partir d'amplicons issus d'un échantillon d'eau de Moselle artificiellement contaminé avec une souche de référence <i>C. jejuni</i> (NCTC 11168) (A) ou d'un échantillon d'eau de Moselle naturellement contaminé en <i>C. jejuni</i> (colonies isolées sur le milieu gélosé (B) ou présence d'un tapis sur le milieu gélosé (C)) .....	169
Figure 26: Droite linéaire obtenue par PCR en temps réel à partir d'échantillons d'1L d'eau de réseau artificiellement contaminés avec différentes quantités de <i>C. coli</i> .....	173
Figure 27: Droite linéaire obtenue par PCR en temps réel à partir d'échantillons de 20L d'eau de réseau artificiellement contaminés avec différentes quantités de <i>C. coli</i> .....	174
Figure 28: Droite linéaire obtenue par PCR en temps réel à partir d'échantillons d'1L d'eau de Moselle artificiellement contaminés avec différentes quantités de <i>C. coli</i> .....	175
Figure 29: Gamme standard permettant la quantification absolue du génome d'adénovirus 1, obtenue à partir des dilutions logarithmiques du plasmide porteur du gène d'intérêt (n=3) en conditions de répétabilité.....	178
Figure 30: Gamme standard permettant la quantification absolue du génome d'adénovirus 1, obtenue à partir des dilutions logarithmiques du plasmide porteur du gène d'intérêt (n=3) en condition de reproductibilité.....	179
Figure 31: Courbes de dissociation obtenues à partir d'amplicons d'une gamme de dilutions de raison 10 du stock d'ADN plasmidique d'adénovirus 40 et 41, en conditions de répétabilité (n=3)....	182
Figure 32: Droite standard obtenue par PCR en temps réel après extraction génomique de différentes quantités d'adénovirus 1 inoculées dans du tampon PBS .....	184
Figure 33: Droite standard obtenue par PCR en temps réel après extraction génomique de différentes quantités d'adénovirus 1 inoculées dans du tampon d'élution .....	184
Figure 34: Courbes standards obtenues par PCR en temps réel après extraction génomique de différentes quantités d'adénovirus 1 inoculées sur un tapis cellulaire et dans du PBS pH 7,4 (n=2).....	187
Figure 35: Evolution de la quantité de génome au cours du temps mesurée par ICC-PCR sur cellules A549 pour différentes quantités d'adénovirus 1 infectieux.....	189
Figure 36: Droite standard obtenue par PCR en temps réel pour différentes quantités d'adénovirus 1 inoculées dans des échantillons de 50L d'eau de réseau.....	193
Figure 37: Droite standard obtenue par PCR en temps réel pour différentes quantités d'adénovirus 1 inoculées dans des échantillons de 10 L d'eau de Moselle .....	194
Figure 38: Gamme standard permettant la quantification absolue du génome de <i>Cryptosporidium parvum</i> , obtenue à partir des dilutions logarithmiques du stock d'ADN plasmidique porteur du gène d'intérêt (n=3) en condition de répétabilité.....	198
Figure 39: Gamme standard permettant la quantification absolue du génome de <i>Cryptosporidium parvum</i> , obtenue à partir des dilutions logarithmiques du stock d'ADN plasmidique porteur du gène d'intérêt (n=4) en condition de reproductibilité .....	199

Figure 40: Droite standard obtenue par PCR en temps réel après extraction génomique de 100 µL d'une suspension d'oocystes de <i>C. parvum</i> à différentes concentrations en présence de thiocyanate de guanidium.....	202
Figure 41: Droite standard obtenue par PCR en temps réel pour différentes concentrations d'oocystes de <i>C. parvum</i> .....	203
Figure 42: Impact de l'étape de centrifugation sur la détection des oocystes viables par PCR en temps réel en fonction des différentes concentrations en EMA.....	206
Figure 43: Impact de la concentration en EMA sur la détection d'ADN de <i>C. parvum</i> issus de suspensions d'oocystes viables (suspension A) ou d'oocystes non viables (suspension B).....	207
Figure 44: Droites standards obtenues par PCR en temps réel pour différentes quantités d'oocystes viables (suspension A) et non viables (suspension B) traités ou non avec 100 µg/mL d'EMA...	208
Figure 45 : Situation géographique du site d'étude sur le bassin versant de la Moselle.....	224
Figure 46: Température de l'eau (°C) mesurée dans la Moselle au niveau du site E entre juin 2010 et mai 2011 .....	226
Figure 47: Turbidité (NTU) mesurée dans la Moselle au niveau du site E entre juin 2010 et mai 2011 .....	227
Figure 48: pH de l'eau mesuré dans la Moselle au niveau du site E entre juin 2010 et mai 2011 .....	227
Figure 49: Carbone Organique Total de l'eau (mg/L) mesuré dans la Moselle au niveau du site E entre juin 2010 et mai 2011.....	228
Figure 50: Conductivité de l'eau (mS/cm) mesurée dans la Moselle au niveau du site E entre juin 2010 et mai 2011.....	228
Figure 51: Evolution de la concentration en <i>E. coli</i> , Entérocoques et en spores de bactéries ASR dans la Moselle au cours du temps (n=21 pour <i>E. coli</i> et Entérocoques, et n=20 pour les spores de bactéries ASR).....	230
Figure 52: Inhibition des méthodes de détection (%) mesurée pour chaque échantillon d'eau de Moselle au cours de l'année d'étude .....	232
Figure 53: Evolution de la concentration moyenne en génome d'adénovirus humains dans la Moselle au niveau du site E entre juin 2010 et mai 2011 .....	233
Figure 54: Inhibition de la méthode de détection par PCR en temps réel (%) mesurée pour chaque échantillon d'eau de Moselle entre juin 2010 et mai 2011.....	234
Figure 55: Inhibition de la méthode de détection par PCR en temps réel (%) mesurée pour chaque échantillon d'eau de Moselle entre juin 2010 et mai 2011.....	235
Figure 56: Concentration en <i>E. coli</i> et en Entérocoques (NPP/100 mL) mesurée dans la Moselle au niveau des huit sites en mars 2011 .....	237
Figure 57: Inhibition des méthodes de détection par PCR en temps réel (%) mesurée dans la Moselle au niveau des huit sites d'étude en mars 2011.....	238
Figure 58: Analyse en composante principale des paramètres microbiologiques et physico-chimiques; projection des variables sur une plan factoriel à deux dimensions .....	240
Figure 59: Inhibition des méthodes de détection par PCR en temps réel (%) mesurée pour chaque prélèvement d'eau de nappe du site E entre juin 2010 et mai 2011 (n=2).....	246
Figure 60: Inhibition de la méthode de détection par PCR en temps réel (%) mesurée pour chaque prélèvement sur les différents sites d'étude en mars 2011.....	250
Figure 61: Proportion d'eau de rivière (Moselle) et d'eau de nappe employées par la station du site E pour la production d'eau potable.....	251

Figure 62: Température (°C) mesurée dans l'eau après traitement au niveau du site E entre juin 2010 et mai 2011 .....	252
Figure 63: Turbidité (NFU) mesurée dans l'eau après traitement au niveau du site E entre juin 2010 et mai 2011 .....	252
Figure 64: pH mesuré dans l'eau après traitement au niveau du site E entre juin 2010 et mai 2011 .....	253
Figure 65: Carbone organique total (mg/L) mesuré dans l'eau après traitement au niveau du site E entre juin 2010 et mai 2011 .....	253
Figure 66: Chlore libre et chlore total (mg/L) mesuré dans l'eau après traitement au niveau du site E entre juin 2010 et mai 2011 .....	254
Figure 67: Inhibition de la méthode de détection par PCR en temps réel (%) mesurée pour chaque prélèvement d'eau traitée du site E de juin 2010 à mai 2011 (n=2) .....	256
Figure 68: Concentrations en campylobacters dans les échantillons d'eau traitée retrouvés positifs et dans les échantillons d'eau de Moselle et d'eau de nappe correspondant à la même période.....	264
Figure 69: Concentrations en adénovirus humains dans les échantillons d'eau traitée retrouvés positifs et dans les échantillons d'eau de Moselle et d'eau de nappe correspondant à la même période.....	269
Figure 70: Perte de viabilité et dégradation du génome (ADN intracellulaire et ADN nu) de <i>C. jejuni</i> dans la Moselle à 4°C.....	276
Figure 71: Perte de viabilité et dégradation du génome (ADN intracellulaire et ADN nu) de <i>C. jejuni</i> dans la Moselle à 22°C.....	277
Figure 72: Perte de viabilité et dégradation du génome (ADN intracellulaire et ADN nu) de <i>C. jejuni</i> dans la nappe alluviale à 4°C .....	279
Figure 73: Perte de viabilité et dégradation du génome (ADN intracellulaire et ADN nu) de <i>C. jejuni</i> dans la nappe alluviale à 22°C .....	279
Figure 74: Evolution de la concentration en chlore (libre et total) dans l'eau traitée au cours du temps à 4°C (A) et 22°C (B).....	281
Figure 75: Perte de viabilité et dégradation du génome (ADN intracellulaire et ADN nu) de <i>C. jejuni</i> dans l'eau d'alimentation chlorée à 4 et 22°C.....	282
Figure 76: Inactivation des particules virales infectieuses et dégradation du génome (ADN encapsidé et ADN nu) dans la Moselle à 4°C .....	284
Figure 77: Inactivation des particules virales infectieuses et dégradation du génome (ADN encapsidé et ADN nu) dans la Moselle à 22°C .....	285
Figure 78: Inactivation des particules virales infectieuses et dégradation du génome (ADN encapsidé et ADN nu) dans la nappe alluviale à 4°C .....	286
Figure 79: Inactivation des particules virales infectieuses et dégradation du génome (ADN encapsidé et ADN nu) dans la nappe alluviale à 22°C .....	287
Figure 80: Inactivation des particules virales infectieuses et dégradation du génome (ADN encapsidé et ADN nu) de l'adénovirus 1 dans l'eau d'alimentation chlorée à 4°C et 22°C.....	289
Figure 81: Evolution de la quantité d'oocystes totaux et d'oocystes viables ainsi que de la quantité de génome (ADN intracellulaire et ADN nu) de <i>C. parvum</i> dans la Moselle à 4°C.....	291
Figure 82: Evolution de la quantité d'oocystes totaux et d'oocystes viables ainsi que de la quantité de génome (ADN intracellulaire et ADN nu) de <i>C. parvum</i> dans la Moselle à 22°C.....	292
Figure 83: Evolution de la quantité d'oocystes totaux et d'oocystes viables ainsi que de la quantité de génome (ADN intracellulaire et ADN nu) de <i>C. parvum</i> dans la nappe alluviale à 4°C .....	293

Figure 84: Evolution de la quantité d’oocystes totaux et d’oocystes viables ainsi que de la quantité de génome (ADN intracellulaire et ADN nu) de <i>C. parvum</i> dans la nappe alluviale à 22°C .....	294
Figure 85: Evolution de la quantité d’oocystes totaux et d’oocystes viables ainsi que de la quantité de génome (ADN intracellulaire et ADN nu) de <i>C. parvum</i> dans l’eau d’alimentation chlorée à 4°C .....	295
Figure 86: Evolution de la quantité d’oocystes totaux et d’oocystes viables ainsi que de la quantité de génome (ADN intracellulaire et ADN nu) de <i>C. parvum</i> dans l’eau d’alimentation chlorée à 22°C .....	296
Figure 87: Inactivation des particules viables de <i>C. jejuni</i> (en rouge) et <i>C. parvum</i> (en vert), et des particules infectieuses de l’adénovirus 1 (en bleu) dans les différents milieux hydriques, à 4°C et 22°C.....	303
Figure 88 : Logigramme d’interprétation d’un résultat positif par les techniques de biologie moléculaire .....	310



---

---

# **INTRODUCTION**

---

---



Selon l'Organisation Mondiale de la Santé, 3,4 millions de morts par an, dont essentiellement des enfants vivants dans des pays sous-développés, seraient liées à la consommation d'eaux contaminées par des agents pathogènes pour l'Homme (WHO, 2006). Le plus souvent, ces épidémies d'origine hydrique sont dues à des agents infectieux provenant du tube digestif d'individus ou d'animaux malades ou porteurs sains, qui sont excrétés dans l'environnement en très grande quantité via les matières fécales. Libérés dans l'environnement, ces pathogènes encore viables et infectieux, sont susceptibles de contaminer l'Homme si les traitements de potabilisation mis en place ne suffisent pas à les éliminer.

A ce jour, il existe un très grand nombre de pathogènes, d'origine bactérienne, virale ou parasitaire, qui peuvent présenter des caractéristiques morphologiques et des propriétés intrinsèques très différentes (Tableau 1).

Tableau 1: Principaux micro-organismes pathogènes pour l'Homme transmissibles par l'eau (WHO, 2006)

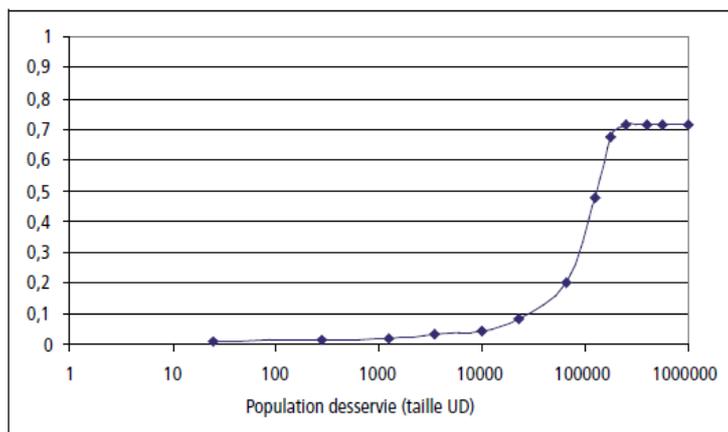
Pathogen	Health significance	Persistence in water supplies <sup>a</sup>	Resistance to chlorine <sup>b</sup>	Relative infectivity <sup>c</sup>	Important animal source
<b>Bacteria</b>					
<i>Burkholderia pseudomallei</i>	Low	May multiply	Low	Low	No
<i>Campylobacter jejuni</i> , <i>C. coli</i>	High	Moderate	Low	Moderate	Yes
<i>Escherichia coli</i> – Pathogenic <sup>d</sup>	High	Moderate	Low	Low	Yes
<i>E. coli</i> – Enterohaemorrhagic	High	Moderate	Low	High	Yes
<i>Legionella</i> spp.	High	Multiply	Low	Moderate	No
Non-tuberculous mycobacteria	Low	Multiply	High	Low	No
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> <sup>e</sup>	Moderate	May multiply	Moderate	Low	No
<i>Salmonella typhi</i>	High	Moderate	Low	Low	No
Other salmonellae	High	May multiply	Low	Low	Yes
<i>Shigella</i> spp.	High	Short	Low	Moderate	No
<i>Vibrio cholerae</i>	High	Short	Low	Low	No
<i>Yersinia enterocolitica</i>	High	Long	Low	Low	Yes
<b>Viruses</b>					
Adenoviruses	High	Long	Moderate	High	No
Enteroviruses	High	Long	Moderate	High	No
Hepatitis A virus	High	Long	Moderate	High	No
Hepatitis E virus	High	Long	Moderate	High	Potentially
Noroviruses and sapoviruses	High	Long	Moderate	High	Potentially
Rotaviruses	High	Long	Moderate	High	No
<b>Protozoa</b>					
<i>Acanthamoeba</i> spp.	High	Long	High	High	No
<i>Cryptosporidium parvum</i>	High	Long	High	High	Yes
<i>Cyclospora cayetanensis</i>	High	Long	High	High	No
<i>Entamoeba histolytica</i>	High	Moderate	High	High	No
<i>Giardia intestinalis</i>	High	Moderate	High	High	Yes
<i>Naegleria fowleri</i>	High	May multiply <sup>f</sup>	High	High	No
<i>Toxoplasma gondii</i>	High	Long	High	High	Yes
<b>Helminths</b>					
<i>Dracunculus medinensis</i>	High	Moderate	Moderate	High	No
<i>Schistosoma</i> spp.	High	Short	Moderate	High	Yes

En France, la production de l'eau destinée à l'alimentation représente environ 6 milliards de m<sup>3</sup>/an dont 2 milliards proviennent de ressources en eaux superficielles et 4 milliards sont puisés dans des eaux souterraines (AFSSA, 2007). Ces différentes ressources sont susceptibles d'être le réceptacle de nombreuses sources de pollutions pouvant contenir des substances chimiques ou microbiologiques. Le niveau de contamination des eaux brutes va dépendre (i) du type de ressource considéré et (ii) de son niveau de protection. Ainsi, par exemple, la qualité des eaux de surface sera largement influencée par des rejets pouvant provenir d'activités humaines, industrielles et agricoles menées dans le bassin versant. D'autres facteurs naturels, tels que ceux en lien avec la pluviométrie par exemple, peuvent entraîner des ruissellements importants de champs cultivés, et par conséquent, influencer le flux de micro-organismes. Pour les eaux souterraines, la nature géologique des sols conditionnera leur capacité à retenir ces pathogènes et donc limiter leur contamination avant d'être captées pour la production d'eau potable.

Compte tenu du nombre peu élevé d'épidémies d'origine hydrique relevées depuis 1998 par l'Institut de Veille Sanitaire (InVS), il peut être considéré que le risque d'infection lié à la consommation d'eau d'alimentation en France est faible. L'investigation des épidémies sur le terrain et la recherche des causes responsables de leur survenue a montré que, le plus souvent, un défaut dans le traitement de potabilisation et l'interconnexion entre le réseau de distribution et des eaux non traitées étaient en lien avec la survenue de ces épisodes (Beaudeau *et al.*, 2007). Néanmoins, eu égard à la complexité de la mise en évidence des signaux d'alertes et de la difficulté dans certains contextes de les faire remonter rapidement aux autorités en charge de la gestion des risques sanitaires dans ce domaine, il est possible que le nombre réel d'épidémies d'origine hydrique ait été sous-estimé. Comme le souligne le rapport de l'Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments (AFSSA) concernant le Bilan des connaissances relatives aux virus transmissibles à l'Homme par voie orale (AFSSA, 2007), « le risque endémique est non quantifié, mais semble être très en deçà de la proportion de 35% des gastro-entérites évoquée par Payment dans une grande ville canadienne où le traitement de l'eau se limitait surtout à une chloration dont on connaît les limites (Payment *et al.* 1991b) ». La mise en place et l'utilisation par l'InVS de nouveaux outils innovants basés sur l'exploitation des données de l'assurance maladie concernant la prescription et la vente de médicaments destinés à traiter des symptomatologies en lien avec des gastro-entérites, devrait à l'avenir préciser ce risque.

Les données concernant la présence et la circulation des pathogènes responsables d'épidémies d'origine hydrique dans l'environnement restent très fragmentaires et concernent en grande majorité les eaux de surface. En revanche pour les eaux de nappes ou les eaux distribuées, peu de données sont disponibles en dehors de contextes épidémiques avérés. De surcroît, quand elles existent, les informations obtenues sont parcellaires et ne sont pas suffisamment informatives pour évaluer avec précision un risque de contamination pour l'Homme (viabilité, quantité, typage des souches...). Une des raisons pouvant expliquer ce manque de données est en lien avec l'absence de recherche réglementaire de ces agents dans les eaux d'alimentation ou dans les ressources brutes. Bien qu'il soit stipulé au niveau européen, dans les textes de la directive 98/83/CE et du décret d'application français du 11 janvier 2007 sur la qualité des eaux distribuées, que les eaux rendues potables et distribuées au public ne doivent pas « contenir un nombre ou une concentration de micro-organismes, de parasites ou toutes autres substances constituant un danger potentiel pour la santé des personnes », leur recherche est très peu réalisée sauf dans des contextes épidémiologiques. Il faut d'emblée signaler qu'il est irréaliste de promouvoir la recherche en routine de ces différents agents dans les ressources et les eaux traitées compte tenu (i) du très grand nombre de pathogènes pouvant être véhiculés par la voie hydrique, (ii) de la complexité des méthodes analytiques à mettre en place pour les mettre en évidence et du manque de standardisation de ces dernières, (iii) des délais analytiques pouvant se révéler tardifs, et bien évidemment (iv) du coût analytique.

Le contrôle de la qualité microbiologique des eaux traitées et distribuées aux abonnés repose sur la recherche de paramètres indicateurs, témoins de la présence potentielle de substances ou de microbes dangereux. Dans ce cadre, les bactéries coliformes et *E. coli*, les entérocoques intestinaux et les spores de bactéries anaérobies sulfite-réductrices (ASR) sont employés soit comme des indicateurs témoins de contamination fécale, soit comme des indicateurs du bon fonctionnement du système de potabilisation mis en place pour traiter les eaux captées dans le milieu naturel, dans le cas des coliformes et des spores de bactéries ASR. Ce dispositif de contrôle basé sur la recherche de ces bactéries ainsi que d'autres paramètres de type physico-chimique (turbidité, Carbone Organique Total (COT)...), a permis de diminuer considérablement le nombre d'épidémies d'origine hydrique dans les pays l'ayant mis en place dans leur système de surveillance sanitaire. Cependant cette approche comporte certaines faiblesses qui se sont soldées dans le passé par des épidémies impressionnantes aux conséquences dramatiques, telle que celle survenue, par exemple, en 1993 aux Etats-Unis à Milwaukee, due à la présence d'oocystes de *Cryptosporidium* dans l'eau d'alimentation provoquant la mort de 69 personnes parmi les 403 000 malades, alors qu'aucun indicateur de la qualité des eaux ne dépassait les critères de potabilité établis (Mac Kenzie *et al.*, 1994). Il faut rappeler que la fréquence des contrôles n'a pas été à l'origine conçue dans le but de relever des alertes, mais plutôt comme un outil visant à vérifier la conformité de la qualité de l'eau au regard des limites de qualité établies par le code de la santé publique. Ainsi, si la pollution d'une eau est ponctuelle et se situe entre deux analyses, la pollution ne sera pas forcément détectée. Dans ce contexte, on s'aperçoit très rapidement que la probabilité de détection d'une pollution sera dépendante de la fréquence des analyses qui est elle-même (pour celle en lien avec le contrôle officiel) définie en fonction de la taille de la collectivité concernée (Figure 1). Seul l'autocontrôle additionnel, mis en place par l'exploitant visant à vérifier la qualité de l'eau en différents points du système de production et distribution, pourra augmenter la probabilité de détection et permettre des actions correctives efficaces pour limiter toute contamination humaine.



**Figure 1: Probabilité de détecter, grâce aux analyses du contrôle sanitaire, une pollution généralisée d'une unité de distribution d'une durée de 24 heures en fonction de la taille de la population desservie (Beaudeau *et al.*, 2007)**

S'il est clair que la probabilité de retrouver un agent pathogène augmente en présence d'indicateurs bactériens signalant la présence d'une contamination fécale, à l'inverse leur absence ne signifie pas complètement que l'eau analysée est exempt d'un pathogène. En effet, la notion au sens strict « d'indicateur » atteint ses limites notamment lorsque les agents pathogènes recherchés se comportent différemment de l'indicateur retenu dans le milieu hydrique. C'est par exemple le cas pour les parasites *Cryptosporidium* qui sont des micro-organismes très résistants au chlore, et qui ne seront pas inactivés aux doses employées lors du traitement des eaux, comparativement aux indicateurs bactériens très sensibles à ces oxydants. Ce dernier point pourrait être à l'origine de plusieurs résultats contradictoires obtenus dans des études ayant pour objectif de mettre en évidence des corrélations entre la présence des indicateurs et celle des pathogènes, notamment lorsque que les agents ciblés présentent des propriétés morphologiques et intrinsèques très différentes (virus et parasites versus bactéries).

Le manque de connaissances sur la présence et la circulation des différents agents pathogènes pour l'Homme dans les eaux brutes ou traitées constitue à ce jour un frein important à l'évaluation de risque en termes de santé publique. En effet, rappelons que ces données sont indispensables pour caractériser « l'exposition » du consommateur qui va permettre, en complément d'autres données (volume d'eau consommé, dose minimale infectante...), de mettre en place les démarches « d'Appréciation Quantitative du Risque » nommées AQR. Les AQR ont pour finalité de fournir aux gestionnaires du risque des outils d'évaluation permettant de limiter l'exposition des consommateurs vis-à-vis de ces pathogènes. Outre la notion de présence d'un pathogène dans l'eau, les informations en lien avec la viabilité et/ou l'infectiosité mais aussi la quantité des pathogènes retrouvée dans le milieu hydrique, le type de souche ou sérotype décelé, leur distribution dans les eaux (dispersée, agrégée, adsorbée aux matières en suspension), leur survie ainsi que leur comportement dans les milieux hydriques sont autant de données qui permettront de préciser le risque et donc fiabiliser les outils développés pour l'AQR.

Avec le développement des méthodes moléculaires permettant la recherche spécifique de la présence du génome des agents pathogènes dans les eaux, il est constaté, depuis plus d'une décennie, une recrudescence du nombre de données et donc, par voie de conséquence, une amélioration des connaissances sur la circulation des pathogènes dans les milieux hydriques. Ces méthodes très sensibles et spécifiques ont l'avantage de pouvoir fournir un résultat très rapidement. La standardisation des procédures dans les prochaines années devrait permettre de voir de plus en plus de laboratoires, réalisant des analyses de routine, les utiliser sur demande spécifique. Il faut préciser que pour certains pathogènes de type viral tel que les *Norovirus*, fréquemment impliqués dans des épidémies hydriques, ces outils moléculaires constituent pour le moment la seule méthodologie pouvant mettre en évidence leur présence dans un échantillon hydrique. Cependant, si l'absence de la détection de génome par ces méthodes moléculaires (PCR ou RT-PCR) peut théoriquement être la garantie de l'absence de pathogènes dans l'eau, leur présence, bien qu'elle signe une contamination de l'eau, ne peut permettre de caractériser un risque en termes de santé publique, en l'absence d'informations relatives à la viabilité et/ou l'infectiosité de l'agent décelé ou de cas humains suspectés d'être infectés. En effet, il faut rappeler que ces outils ne peuvent distinguer si le génome détecté provient d'un agent viable ou infectieux complètement intact, ou d'un agent inactivé ne présentant plus de risque d'infection, ou encore de génome libéré dans le milieu hydrique. En réalité, à ce jour, il n'existe pas de méthodologie universelle permettant d'acquérir ces différentes informations simultanément très simplement et à moindre coût.

L'objectif premier de l'étude présentée dans ce travail a consisté à déterminer le niveau de pollution fécale de différentes ressources hydriques (eaux de surface et eaux de nappes) employées pour produire de l'eau d'alimentation distribuée. Ce travail s'est déroulé au niveau du bassin hydrologique de la Moselle et s'est focalisé spécifiquement sur la mise en évidence de pathogènes reconnus comme responsables d'épidémies humaines de gastro-entérites d'origine hydrique tels que des espèces de *Campylobacter*, *C. jejuni* et *C. coli*, les adénovirus humains dont les adénovirus dits « entériques » (sérotypes 40 et 41), et les espèces de *Cryptosporidium* (*C. parvum*, *C. hominis* et *C. meleagridis*). Le plan d'échantillonnage mis en place a été différent selon le site étudié. Ainsi pour le seul site utilisant de l'eau brute issue du mélange d'eau de surface et d'eau de nappe (site situé dans le bassin Nancéen), un suivi bimensuel a été mis en place pendant une année, de juin 2010 à mai 2011, de manière à mettre en évidence un effet saison. Pour tous les autres sites, une campagne d'analyses a été organisée au mois de mars 2011.

Outre la recherche d'un signal traduisant la contamination du couple « eau brute et eau traitée », nous avons systématiquement recherché à déterminer (i) les quantités présentes dans l'eau en tenant compte de l'interférence du milieu et du rendement des méthodes employées et (ii) la viabilité ou l'infectiosité des espèces mises en évidence. Parallèlement, les bactéries indicatrices d'une pollution fécale (coliformes, *E coli* et Entérocoques) ainsi que les spores de bactéries ASR et différents paramètres physico-chimiques (turbidité, COT...) ont été également déterminés afin d'établir d'éventuelles corrélations.

La révélation de la présence de micro-organismes pathogènes pour l'Homme dans les milieux hydriques pose la question de leur comportement et de leur persistance aux traitements de potabilisation. Nous avons donc étudié, dans un second temps, le comportement d'une souche de *C. jejuni*, d'un adénovirus 1 et de l'espèce *C. parvum*, pris comme modèles, dans ces eaux traitées mais également dans les eaux brutes, représentatives des eaux étudiées.

La perte de la viabilité et de l'infectiosité de ces micro-organismes a été suivie au cours du temps, parallèlement à la perte du génome intracellulaire ou nu, de manière à préciser les processus de dégradation se produisant au cours du temps au niveau de ces pathogènes. Pour pouvoir réaliser ces différents travaux, il était indispensable en premier lieu de mettre en place un certain nombre d'outils permettant (i) de détecter les espèces ou sérotypes ciblés, (ii) d'indiquer leur quantité et (iii) de préciser leur état de viabilité ou d'infectiosité. Compte tenu de caractéristiques morphologiques très différentes selon le micro-organisme ciblé (bactéries, virus et parasite), mais également du type d'eau étudiée conférant des compositions physico-chimiques diverses, et de la dilution plus ou moins importante des eaux considérées selon le lieu de prélèvement et le niveau de traitement mis en place, il a été nécessaire de disposer de méthodes de concentration et de détection suffisamment sensibles et robustes pour chaque pathogène ciblé. Les différentes méthodes mises en place ont été évaluées en terme de performance de manière à tenir compte de leur rendement et de l'interférence de la matrice afin d'évaluer avec le plus de précision possible les quantités retrouvées dans ces milieux.

Préalablement à ces travaux, une étude bibliographique axée sur les campylobacters, les adénovirus et les parasites *Cryptosporidium*, et leur présence dans les eaux est présentée ci dessous.

---

# **ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE**

---



## 1. *CAMPYLOBACTER*

### 1.1. Description générale

#### 1.1.1. Historique et taxonomie du genre *Campylobacter*

##### 1.1.1.1. Historique

*Campylobacter* a été découvert pour la première fois en 1886 par Théodore Escherich à partir de selles d'enfants diarrhéiques. A l'origine, les bactéries du genre *Campylobacter* étaient classées dans le genre *Vibrio* en raison de leur aspect morphologique en spirale. En 1963, sur la base d'études du métabolisme fermentatif ainsi que de la composition en bases nucléotidiques, le genre *Campylobacter* est introduit par Sébald et Véron et comprend seulement deux espèces, *C. fetus* et *C. bubulus* (actuellement *C. sputorum*). Pourtant, la communauté scientifique continue à se référer à ces taxons en tant que *Vibrio fetus* et *Vibrio bubulus* jusqu'à ce qu'en 1973, des investigations supplémentaires soient réalisées sur le genre *Campylobacter* à partir d'analyses sérologiques et biochimiques ainsi que sur la composition des bases en ADN. La différenciation des deux genres est alors reconnue et la première taxonomie du genre *Campylobacter* est ainsi acceptée et publiée (Véron et Chatelain, 1973).

##### 1.1.1.2. Taxonomie

Les bactéries du genre *Campylobacter* font partie du domaine des *Eubactéries*, du phylum des *Proteobacteria*, de l'ordre des *Campylobacterales* et de la famille des *Campylobacteraceae*. Depuis sa création, la taxonomie du genre *Campylobacter* a subi de nombreux changements et certains aspects de la taxonomie restent encore un sujet de controverse (Vandamme *et al.*, 2005; Silva *et al.*, 2011). Ainsi, certains auteurs indiquent que le genre *Campylobacter* comprend 14 espèces (Debruyne *et al.*, 2005), d'autres mentionnent 20 espèces et sous-espèces (Fernández *et al.*, 2008) ou encore 16 espèces et 6 sous-espèces (On, 2001; Foster *et al.*, 2004) (Figure 2). Selon le Bergey's manual, le genre *Campylobacter* comprendrait 16 espèces et 6 sous-espèces: *C. jejuni* (*C. jejuni* subsp. *jejuni* et *C. jejuni* subsp. *doylei*); *C. coli*; *C. lari*; *C. upsaliensis*; *C. helveticus*; *C. fetus* (*C. fetus* subsp. *fetus*; *C. fetus* subsp. *venerealis*); *C. hominis*; *C. hyointestinalis* (*C. hyointestinalis* subsp. *hyointestinalis*; *C. hyointestinalis* subsp. *lawsonii*); *C. lanienae*; *C. sputorum*; *C. mucosalis*; *C. concisus*; *C. curvus*; *C. gracilis*; *C. rectus*; *C. showae*.

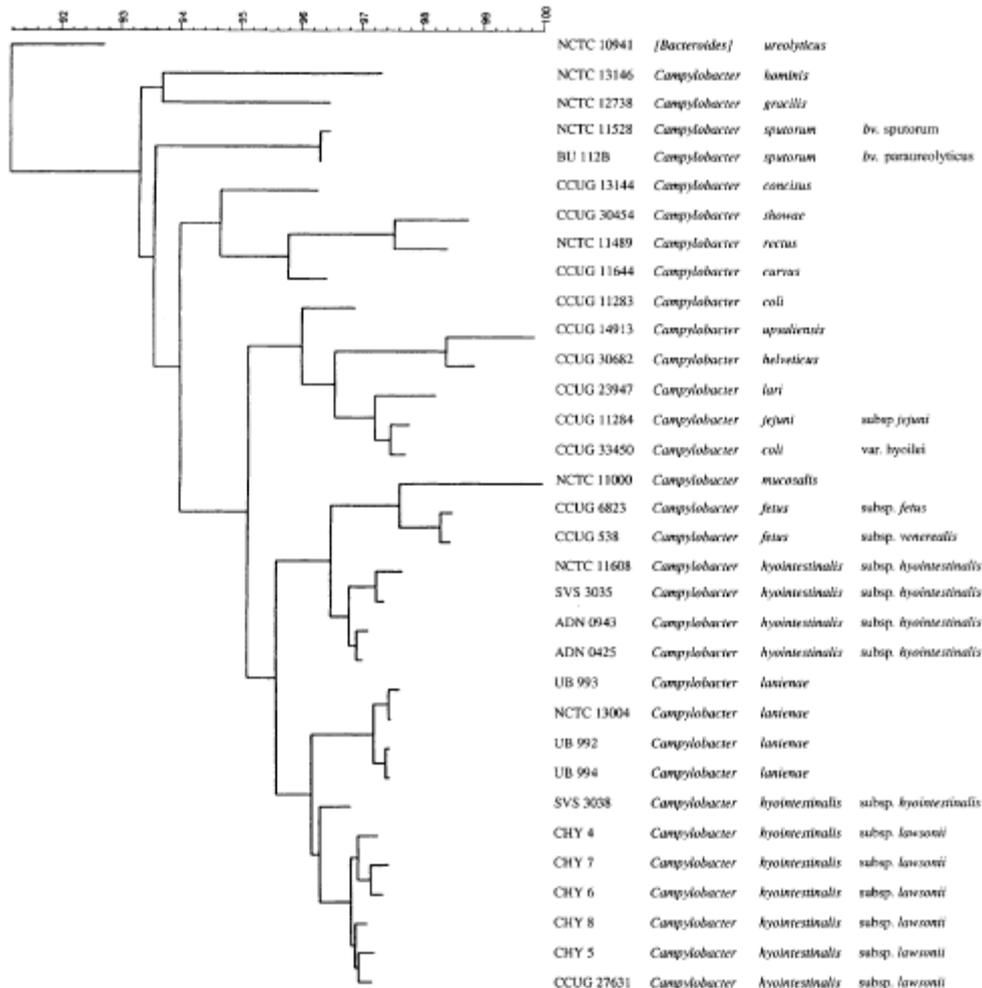


Figure 2: Dendrogramme montrant les relations entre les espèces de *Campylobacter spp.* par comparaison des séquences du gène ARN 16S (On, 2001)

### 1.1.2. Morphologie des campylobacters

*Campylobacter* (du grecque « bacteria »: bâton, latinisé en bacter; et « kampulos »: courbé devenu campylo), est un bacille gram négatif de 0,2 à 0,5  $\mu\text{m}$  de diamètre et de 0,5 à 5  $\mu\text{m}$  de longueur. Ces bactéries sont munies d'un flagelle à une extrémité qui leur permet d'être mobiles avec un déplacement souvent décrit «en tire-bouchon».

Les campylobacters sont des bactéries dites microaérophiles ce qui implique des conditions atmosphériques optimales de croissance à 5%  $\text{O}_2$ , 85%  $\text{N}_2$  et 10%  $\text{CO}_2$ . Toutes les espèces se développent à 37°C mais la culture à une température de 42°C constitue un caractère différentiel car seules les espèces *C. jejuni*, *C. coli*, *C. lari* et *C. upsaliensis* sont capables de se multiplier à cette température. Ces espèces sont alors dites thermotolérantes (On, 2001).

Dans l'eau, les cellules bactériennes peuvent se présenter sous deux formes morphologiques distinctes, vibroïde ou coccoïde, en fonction de leur âge et de leur état physiologique (Figure 3).

La forme vibrioïde est la forme classiquement observée. Les cellules sont spiralées, incurvées ou en forme de S. Associés à la présence d'un flagelle, les campylobacters présentent alors un fort potentiel de motilité (Ketley, 1997). Quant à la forme coccoïde, c'est la forme de résistance des campylobacters en conditions de stress ou en phase de dégénérescence (Dromigny, 2007). Sous cette dernière forme, la taille des bactéries est de l'ordre de 1  $\mu\text{m}$ .

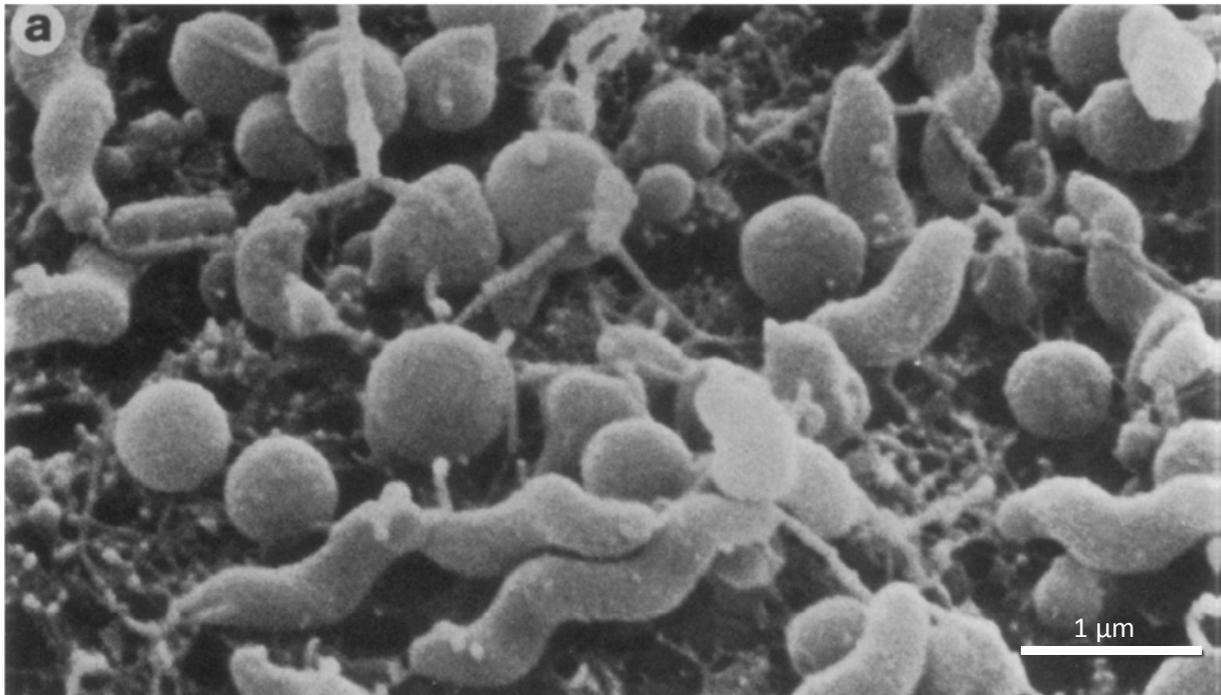


Figure 3: Photographie obtenue par microscopie électronique des différentes formes cellulaires au centre d'une colonie de *C. coli* (Ng *et al.*, 1985)

### 1.1.3. Génome des campylobacters

Le génome de la souche *C. jejuni* NCTC 11168 a été complètement séquencé et publié par Parkhill *et al.* (2000). La bactérie possède un chromosome circulaire de 1,64 Mb (30,6% de GC) codant pour 1654 protéines (Figure 4). Le génome présente la particularité de ne pas présenter de séquences d'insertion ou de séquences d'origine phagique, alors que des séquences hypervariables sont fréquemment retrouvées au niveau des gènes codant pour des enzymes de biosynthèse ou impliquant une modification des structures de surface, ainsi qu'au niveau de gènes dont la fonction est encore mal connue (Parkhill *et al.*, 2000).

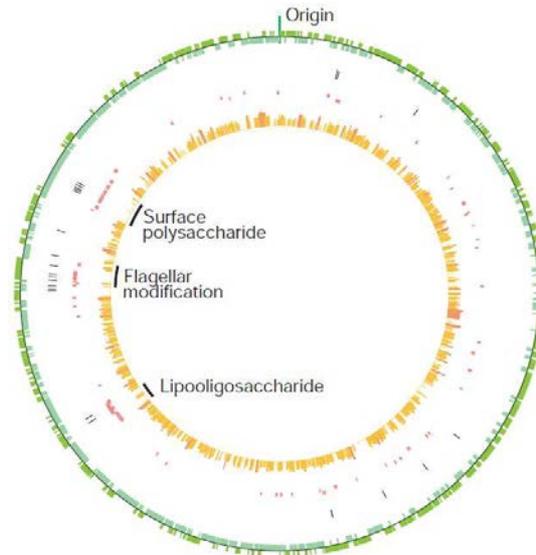


Figure 4: Représentation schématique du génome circulaire de *C. jejuni* NCTC 11168 (Parkhill *et al.*, 2000). En vert, les séquences codantes; en noir, les séquences hypervariables ; en rouge, les gènes impliqués dans la modification des structures de surface

## 1.2. Epidémiologie des infections à *Campylobacter* chez l'Homme

### 1.2.1. Signes cliniques de la campylobactériose

Les espèces *C. jejuni*, *C. coli*, *C. lari* et *C. upsaliensis* ont un tropisme intestinal et sont donc adaptées à la vie dans le mucus du tube digestif. Après ingestion par voie orale, les campylobacters se déplacent dans le mucus intestinal grâce à leur flagelle et adhèrent aux cellules épithéliales ce qui provoque une infection intestinale. La maladie la plus fréquemment associée aux campylobactérioses humaines est une entérite aiguë.

La durée d'incubation est assez longue, en moyenne de 1 à 7 jours. Les premiers signes cliniques de l'infection peuvent se caractériser par une forte fièvre, des malaises, des maux de tête et des douleurs musculaires ainsi que des vomissements (Ketley, 1997). Après 2 à 3 jours, des douleurs abdominales accompagnées de diarrhées apparaissent. Ces symptômes durent rarement plus de 3 à 4 jours, pourtant il est possible de détecter la présence de campylobacters dans les selles pendant encore plusieurs semaines (Kapperud *et al.*, 1992). Les signes cliniques observés sont fonction de l'âge et une fréquence plus importante est constatée chez les enfants de moins de 2 ans (Federighi, 1999; Dromigny, 2007).

Dans de rares cas, les bactéries peuvent être invasives et se retrouver dans le système circulatoire sanguin mais ce phénomène ne se réalise que dans 0,1% des cas (Skirrow *et al.*, 1993). Des complications comme des arthrites réactionnelles, des crises d'urticaire peuvent survenir dans moins de 1% des cas de campylobactérioses. Le syndrome post-infectieux le plus important à considérer est le syndrome de Guillain Barré. Cette atteinte neurologique, caractérisée par une paralysie le plus souvent réversible, survient chez 1 individu infecté sur 1000. Bien que la majorité des patients retrouve une mobilité complète ou partielle après plusieurs mois, dans 20% des cas, les patients gardent des séquelles neurologiques majeures. Le taux de mortalité du au syndrome de Guillain Barré est de 2 à 3% dans les pays industrialisés (Nachamkin *et al.*, 1998).

### 1.2.2. Dose infectieuse

Les infections causées par les campylobacters font suite à l'ingestion d'une quantité de cellules correspondant à une dose infectieuse égale ou supérieure à la dose minimale infectieuse (DMI). La DMI est donc la dose de cellules infectieuses nécessaire pour provoquer une campylobactériose, sachant que l'acidité gastrique de l'estomac détruit une partie de l'inoculum. La DMI peut être déterminée par des études d'ingestion sur des sujets volontaires, lors d'études chez l'animal ou lors d'études épidémiologiques.

La première étude d'ingestion sur sujet volontaire chez l'Homme a été réalisée par McDermott en 1978 qui ingère lui-même une culture de  $10^6$  cellules de *C. jejuni* dans un verre de lait. Après 3 jours d'incubation les premiers symptômes apparaissent et quatre semaines après une complète rémission, un nouvel épisode se déclare sans que la présence de *C. jejuni* ne soit mise en évidence dans les coprocultures (Steele et McDermott, 1978). Une étude effectuée sur 111 volontaires ayant ingérés 150 mL de lait artificiellement contaminé par  $8 \times 10^2$  à  $2 \times 10^9$  cellules a montré des résultats variables en fonction de la dose et de la souche de *C. jejuni* ingérée. Cette étude, menée par Black *et al.* (1988), rapporte que le taux de selles positives en coproculture s'accroît avec la dose de *C. jejuni*, contrairement aux symptômes qui semblent ne pas être dose-dépendants. Pour la dose la plus faible ( $8 \times 10^2$  cellules), sur 10 volontaires, un seul montrait des signes cliniques tels que de la fièvre ou une diarrhée alors que seulement 5 personnes infectées présentaient des selles positives en *C. jejuni* par coproculture. Concernant les essais réalisés en lien avec la souche de *C. jejuni* considéré (souche A3249 et 81-176), il s'est avéré que, pour une même dose ingérée ( $10^6$  cellules), des signes cliniques ont été observés à un taux variant entre 11% et 43% chez les volontaires participant aux expérimentations avec un taux de selles positives de 79% et 100%.

La probabilité d'obtenir une maladie après avoir ingéré un certain nombre de cellules a été estimée par le biais de modèles dose-réponse appliqués à *C. jejuni*. Ainsi, le modèle de dose réponse de Teunis *et al.* (2005), conciliant des données acquises lors d'expérimentations sur des volontaires mais également avec celles issues de campylobactérioses survenues au Royaume-Uni en 1994 (Evans *et al.*, 1996) et aux Pays-Bas en 2002 (Van den Kerkhof *et al.*, 2002), suite à une ingestion de lait contaminé, montre qu'une dose inférieure ou égale à 100 cellules peut induire une infection et une maladie dans 50% des cas.

### 1.2.3. Réservoirs et voies de contamination

Les campylobacters sont peu pathogènes pour les animaux, qui sont la plupart du temps «porteurs sains». L'infection humaine est une zoonose et la transmission principale semble se produire par la consommation d'aliments d'origine animale contaminés mal cuits. De ce fait, la consommation de viande de poulet et la contamination croisée provenant de cette source, ainsi que le contact avec le bétail, y compris la consommation de viande et de lait, représenteraient 90% des cas sporadiques (Wilson *et al.*, 2008). Les oiseaux sauvages et domestiques tels que les volailles sont considérés comme les principaux réservoirs de *C. jejuni* (65-95%), et dans une moindre mesure, de *C. coli*, alors que les porcins sont plus fréquemment colonisés par l'espèce *C. coli* (Harvey *et al.*, 1999; Young *et al.*, 2000; Burch, 2002; Miller *et al.*, 2009). Les autres sources de contamination peuvent provenir de contacts avec les oiseaux, de l'eau contaminée, des moutons et des animaux de compagnie (Dasti *et al.*, 2010) (Figure 5).

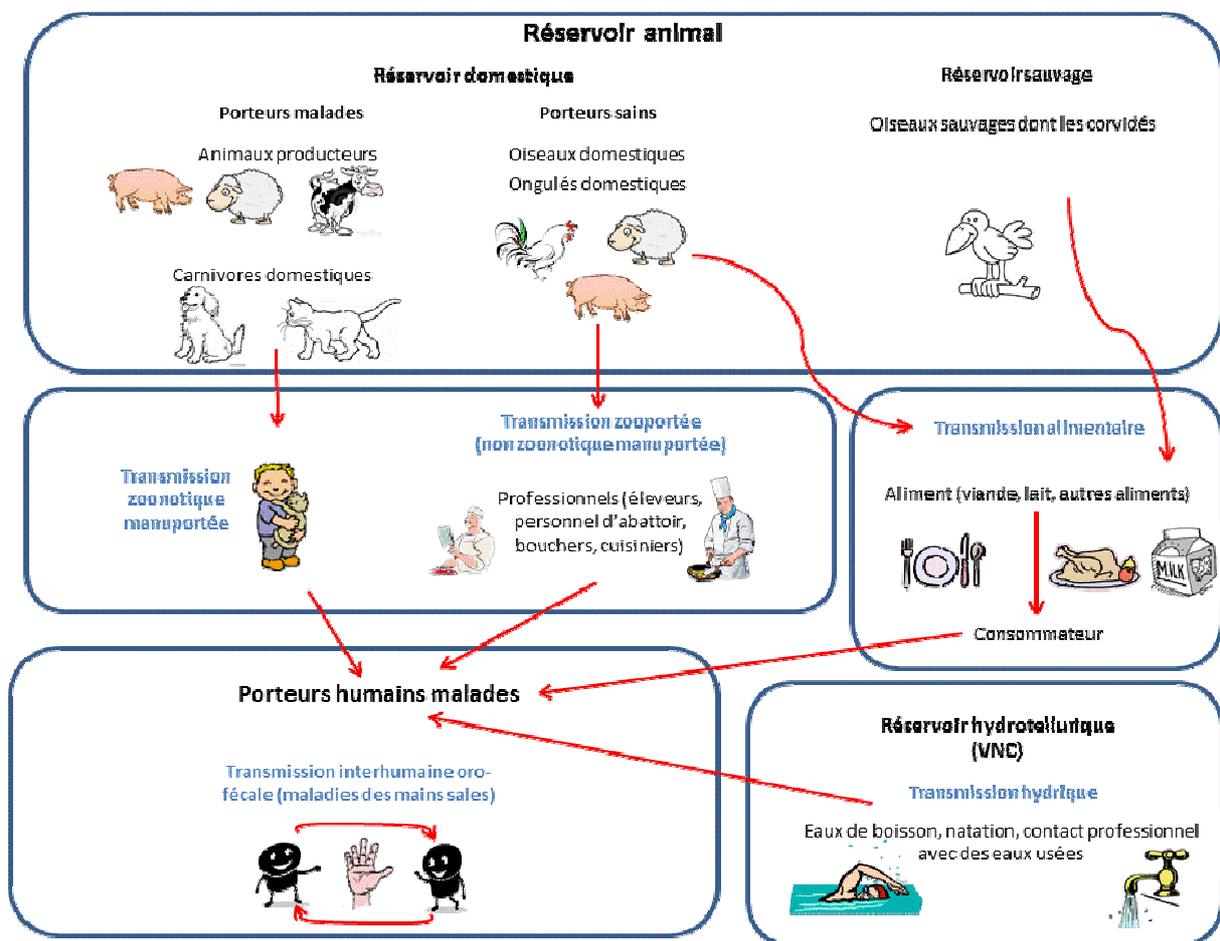


Figure 5: Mode de transmission des campylobacters à l'Homme (Dromigny, 2007)

#### 1.2.4. Incidence de la campylobactériose

Dans le monde le taux de campylobactérioses est variable selon le pays mais en augmentation dans la plupart d'entre eux. En 2005, la Nouvelle Zélande semblait être le pays dans lequel les cas d'infections dues à des campylobacters étaient les plus nombreux avec 396 cas pour 100000 individus.

En 2009 en Europe, 198252 cas de campylobactérioses ont été confirmés, soit une augmentation de 4% par rapport à 2008. En se basant sur le taux de mortalité (0,02%) et le nombre de cas confirmés, il a été estimé une quarantaine de décès dans l'union européenne dus à une campylobactériose. Les populations les plus touchées sont les enfants âgés de moins de 5 ans avec 128 cas pour 100000 individus. On estime que sur les 5550 épidémies d'origine alimentaire rapportées en 2009 dans toute l'union européenne, 31% sont causées par *Salmonella*, 18,8% par des virus, 10,1% par des toxines et 6% par *Campylobacter*. Parmi les espèces incriminées, *C. jejuni* est l'espèce prédominante (36,4%) suivie de *C. coli* (2,5%), *C. lari* (0,19%) et *C. upsaliensis* (0,01%) (EFSA, 2011).

En France, depuis 2002, la surveillance des infections à campylobacters repose sur un réseau de laboratoires d'analyses de biologie médicale et de laboratoires hospitaliers. Les laboratoires volontaires participants recherchent systématiquement les campylobacters dans toutes les coprocultures suspectes et envoient les souches isolées au Centre National de Référence des Campylobacters et des Helicobacters (CNRCH) avec une fiche d'information. Cette fiche collecte des informations épidémiologiques (département du laboratoire, date de naissance, sexe, notion de voyage à l'étranger dans les 15 jours précédant le début de la maladie, notion de cas groupés) et biologiques (nature de l'échantillon, date d'isolement, site de prélèvement). Aucune information sur les signes cliniques n'est recueillie, les souches pouvant être isolées chez des patients malades ou des porteurs asymptomatiques. Pour chaque souche reçue, le CNRCH de Bordeaux réalise une caractérisation de l'espèce et des tests de sensibilité aux antibiotiques (King *et al.*, 2008). Ainsi, entre 2003 et 2010, 22245 souches ont ainsi pu être isolées, avec une augmentation constante du nombre de souches reçues par le CNRCH chaque année (Figure 6). L'espèce *C. jejuni* a été isolée le plus fréquemment (79,3%) suivie de *C. coli* (15,2%), *C. fetus* (3,9%) et *C. lari* (0,4%).

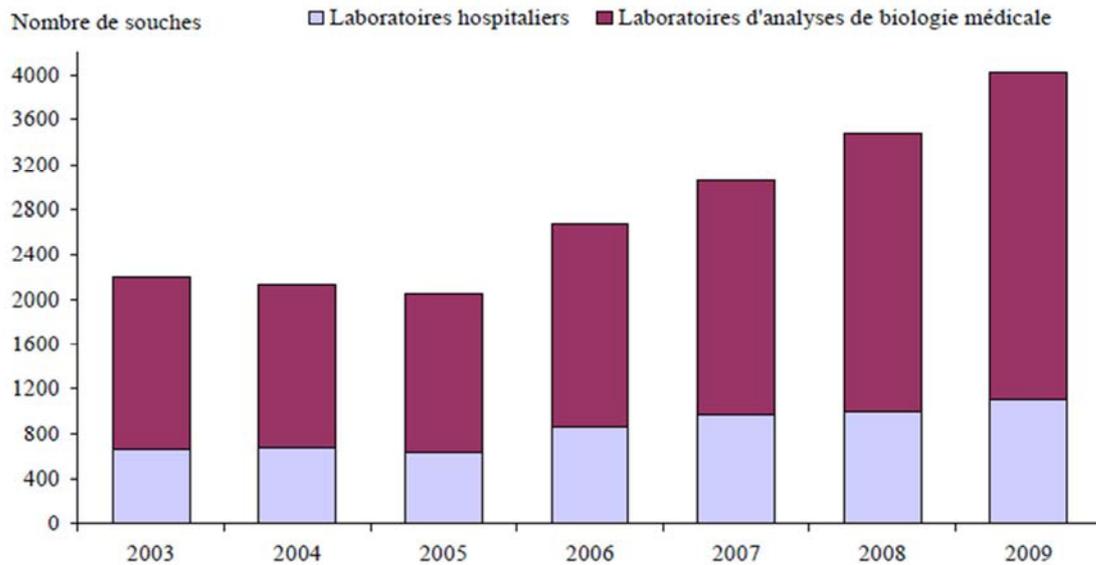
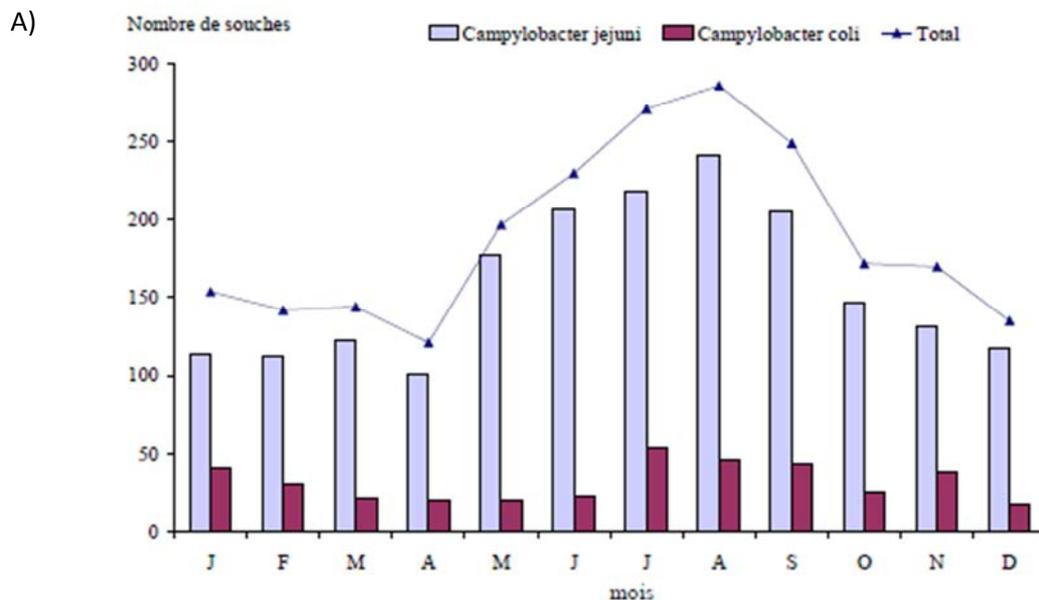


Figure 6: Nombre d'isolement de *Campylobacter* en France entre 2003 et 2009 en fonction du type de laboratoire (King *et al.*, 2008)

La compilation des données recueillies semble montrer une recrudescence des isollements de *Campylobacter* pendant la période estivale (Figure 7A-B-C-D). Cette saisonnalité est surtout marquée pour *C. jejuni*.



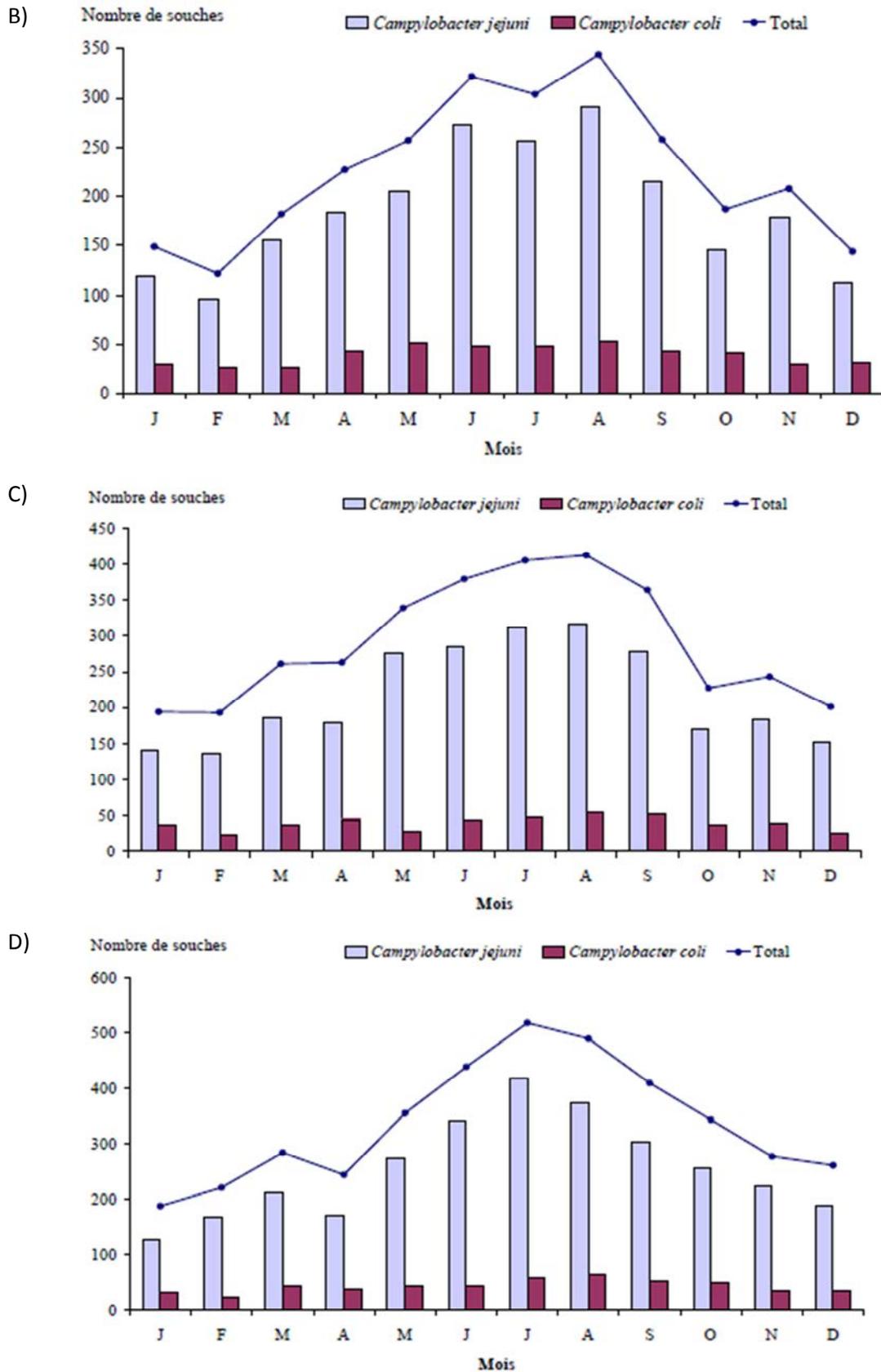


Figure 7: Nombre d'isollements de *Campylobacter* selon le mois de prélèvement biologique et l'espèce en France en 2006 (A), 2007 (B), 2008 (C) et 2009 (D) (Espié *et al.*, 2006; King *et al.*, 2007; King *et al.*, 2008; King *et al.*, 2009)

Les campylobactérioses d'origine hydrique peuvent potentiellement toucher un grand nombre d'individus notamment si les réseaux de distribution d'eau potable sont impliqués. La première grande épidémie hydrique relatée est celle survenue dans le Vermont (USA) en 1978 qui a fait près de 3000 malades (Vogt *et al.*, 1982).

Le Tableau 2 donne un aperçu des différentes épidémies liées à l'eau de distribution incriminant les campylobacters. Dans la plupart des épidémies hydriques, plusieurs agents pathogènes zoonotiques ont été détectés dans l'eau ainsi que dans les selles humaines en raison d'une contamination non spécifique, surtout si les eaux usées sont à l'origine de la contamination (Maurer et Sturchler, 2000; O'Reilly *et al.*, 2007). Les études cas-témoins, menées aux Etats-Unis et dans d'autres pays industrialisés, suggèrent que les facteurs de risque de campylobactérioses d'origine hydrique peuvent être la consommation d'eau d'alimentation contaminée (Michaud *et al.*, 2004; Neiman *et al.*, 2003; Schonberg-Norio *et al.*, 2004; Evans *et al.*, 2003), l'utilisation d'eau de surface non traitée (Kapperud *et al.*, 2003; Adak *et al.*, 1995; Ikram *et al.*, 1994; Carrique-Mas *et al.*, 2005), la consommation d'eau de puit ou d'eau de pluie (Neimann *et al.*, 2003; Schonberg-Norio *et al.*, 2004; Carrique-Mas *et al.*, 2005; Eberhart-Phillips *et al.*, 1997) (Tableau 3).

En France, parmi les 10 épidémies d'origine hydrique survenues entre 1998 et 2006, les campylobacters ont été incriminés dans deux cas. La première épidémie est survenue en 2000 suite à un défaut de chloration dans le système de traitement de potabilisation, et a touché 4900 habitants et 2200 touristes. Trois micro-organismes ont été incriminés, *C. coli*, des norovirus et des rotavirus (Gallay *et al.*, 2006). Dans la deuxième épidémie, survenue en 2003, 2000 à 35000 personnes semblent avoir été exposées à la consommation d'une eau de réseau contaminée par de l'eau de rivière. Des parasites de type *Cryptosporidium* spp. et des bactéries *C. jejuni* ont été identifiés comme étant à l'origine de cette épidémie (Beaudeau *et al.*, 2008).

Tableau 2: Quelques campylobactérioses liées à l'eau de distribution

Pays	Nombre de cas	Année	Pathogènes incriminés	Causes de la contamination	Référence
Islande	1450	2004	<i>C. jejuni</i> , norovirus, <i>S. typhimurium</i>	Contamination par les eaux d'égouts	O'Reilly <i>et al.</i> (2007)
Canada	>2000	2000	<i>Campylobacter</i> , <i>E. coli</i> O157/H7	Contamination par des fermes (rejets agricoles)	Clark <i>et al.</i> (2003); Holme (2003)
Etats-Unis	775	1999	<i>Campylobacter</i> , <i>E. coli</i> O157/H7	-	Bopp <i>et al.</i> (2003)
Norvège	330	-	<i>C. jejuni</i> / <i>C. coli</i>	Pas de chloration	Melby <i>et al.</i> (1991)
Norvège	105	2007	<i>Campylobacter</i>	-	Jakopanec <i>et al.</i> (2008)
Royaume - Uni	281	2000	<i>C. jejuni</i>	Contamination par les eaux de surface	Richardson <i>et al.</i> (2007)
Royaume-Uni	633	-	<i>Campylobacter</i> , <i>E. coli</i> O157/H7	Contamination par les eaux de surface	Jones et Roworth (1996)
France	>2600	2000	<i>C. coli</i> , rotavirus et norovirus	Défaut de chloration	Gallay <i>et al.</i> (2006)
France	2000 à 35000	2003	<i>Cryptosporidium</i> spp., <i>C. jejuni</i>	Contamination par de l'eau de rivière	Beauudeau <i>et al.</i> (2008)
Espagne	46	-	<i>C. jejuni</i>	Défaut de chloration	Godoy <i>et al.</i> (2002)
Suisse	1607	1998	<i>Campylobacter</i> , <i>Shigella</i> , virus	Contamination par les eaux d'égouts	Maurer et Sturchler (2000)
Japon	71	2006	<i>C. jejuni</i>	Défaut de chloration	Abe <i>et al.</i> (2008)

Tableau 3: Quelques études cas-témoins conduites dans différents pays sur des cas de campylobactérioses

Pays	Odds Ratio (IC 95%)	Référence
<b>Consommation d'eau d'alimentation</b>		
Canada	1,9, p=0,03	Michaud <i>et al.</i> (2004)
Danemark	4,23 (1,18-15,04)	Neimann <i>et al.</i> (2003)
Finlande	0,52 (0,26-1,02)	Schonberg-Norio <i>et al.</i> (2004)
Pays de Galle	1,51 (1,06-2,18)	Evans <i>et al.</i> (2003)
<b>Utilisation d'eau de surface non traitée</b>		
Norvège	2,5 (1,2-5,4)	Kapperud <i>et al.</i> (2003)
Royaume-Uni	4,1 (1,45-11,9)	Adak <i>et al.</i> (1995)
Nouvelle Zélande	2,7 (0,9-8,3)	Ikram <i>et al.</i> (1994)
Suède	7,4	Carrique-Mas <i>et al.</i> (2005)
<b>Consommation d'eau de puit</b>		
Danemark	2,09 (0,9-6,16)	Neimann <i>et al.</i> (2003)
Finlande	3,19 (1,58-6,15)	Schonberg-Norio <i>et al.</i> (2004)
Suède	2,6	Carrique-Mas <i>et al.</i> (2005)
<b>Consommation d'eau de pluie</b>		
Nouvelle Zélande	2,2 (1,04-4,65)	Eberhart-Phillips <i>et al.</i> (1997)
<b>Baignades dans les eaux de source naturelles</b>		
Finlande	0,52 (0,26-1,02)	Schonberg-Norio <i>et al.</i> (2004)

IC 95%: Intervalle de confiance à 95%

### 1.3. Niveau de contamination des eaux par les campylobacters

#### 1.3.1. Niveau de contamination des eaux de surface

De nombreuses études d'évaluation de la pollution fécale des eaux de surface par les campylobacters mettent en évidence que le pourcentage d'échantillons positifs est très variable et oscille entre de 0 à 90% (Tableau 4). Dans la majorité des cas, la détection des campylobacters s'effectue par culture avec une étape d'enrichissement et l'identification des colonies est réalisée par typage à l'aide de tests biochimiques (Martikainen *et al.*, 1990; Hörman *et al.*, 2004) ou par génotypage (Moore *et al.*, 2001a; Denis *et al.*, 2009; Rodríguez et Araujo, 2010). L'espèce prédominante retrouvée dans les eaux de surface semble être *C. jejuni* mais dans quelques rares études c'est l'espèce *C. coli* qui a été décelée en majorité (Moore *et al.*, 2001b; Rodríguez et Araujo, 2010). La prédominance de l'espèce *C. coli* serait liée à l'abondance de lisiers de porc dans la zone d'étude, le porc étant considéré comme le principal réservoir de l'espèce *C. coli*.

#### 1.3.2. Niveau de contamination des eaux faiblement turbides

Les données de contamination d'eaux souterraines sont relativement peu abondantes. Une étude menée en Nouvelle Zélande par Savill *et al.* (2001) dans une eau souterraine a révélé la présence de bactéries viables dans 75% des échantillons testés (n=18) avec des concentrations relativement faibles, comprises entre <0,06 à 0,72 NPP/100 mL. Diergaardt *et al.* (2004) et Cavereau *et al.* (2009) n'ont pu, pour leur part, détecter de campylobacters dans la plupart des eaux souterraines étudiées (respectivement dans 4 et 9 ressources).

Concernant les eaux de réseau de distribution ou les eaux du robinet il existe également peu de données et les différentes études menées ont conclu en l'absence de bactéries. Les concentrations mesurées dans les échantillons, lorsqu'ils sont déclarés positifs, sont faibles et oscillent entre < 0,06 et 0,3 NPP/100 mL (Mégraud et Cerceau, 1990; Delom et Munoz, 2000; Moore *et al.*, 2001a; Diergaardt *et al.*, 2004; Denis *et al.*, 2009).

#### 1.3.3. Corrélations avec les indicateurs de contamination fécale

Il n'existe pas de consensus réellement tranché sur la corrélation entre la présence d'indicateurs de contamination fécale dans les eaux et celle des campylobacters. Les résultats sont contradictoires selon les études (Tableau 5). Stelzer *et al.* (1989) ont montré une corrélation significative entre la concentration en campylobacters et en coliformes totaux dans une eau de rivière en Allemagne. Dans un modèle de régression logistique, Brennhovd *et al.* (1992) démontrent que la prévalence des campylobacters est étroitement liée à la quantité des indicateurs de contamination fécale dans des eaux de lacs et des eaux de rivière en Norvège. Ces études suggèrent que les indicateurs fécaux sont potentiellement de bons indicateurs de la présence potentielle de *Campylobacter*. Cependant, le plus souvent les études ne mettent pas en évidence de corrélation entre la densité des campylobacters mesurée dans l'eau et celle des indicateurs fécaux (Jones, 2001).

Tableau 4: Niveau de contamination des eaux superficielles en *Campylobacter*

Pays	Nature de l'échantillon	Méthode employée	Volume analysé	Résultats	Référence
Finlande	Eaux de rivière, lacs	- Filtration sur membrane - Culture avec enrichissement - Typage par tests biochimiques	100 mL	17,3% (24/139) - 45,8% <i>C. jejuni</i> - 25% <i>C. lari</i> - 4,2% <i>C. coli</i> - 25% indéterminée	Hörman <i>et al.</i> (2004)
Finlande	Eaux de lac	- Filtration sur membranes - Culture avec enrichissement (méthode NPP) - Typage par tests biochimiques et tests agglutination	10 mL, 100 mL, 1 L	16% (35/218) De 0,2 à 160 NPP/L 18% (28/157) dans eaux de surface rurales 11% (7/61) dans eaux de surface urbaines <i>C. jejuni</i> espèces dominante	Martikainen <i>et al.</i> (1990)
France	Eaux de surface	- Filtration sur membrane - Culture avec enrichissement (ISO 17995)	10 mL, 100 mL, 1 L	25% en été 44% en automne 19% en hiver	Cavereau <i>et al.</i> (2009)
France	Eau de rivière	- Filtration sur membrane - Culture avec enrichissement - Typage par PCR-PFGE	500 mL	50% (30/60) - 66% <i>C. jejuni</i> - 33% <i>C. coli</i> - 10% <i>C. lari</i>	Denis <i>et al.</i> (2009)
Espagne	Eau de rivière	- Filtration sur membrane - Culture avec enrichissement - Typage par PCR	1 mL à 1 L (méthode NPP)	82% (Moyenne $1,3 \times 10^0$ NPP/100 mL) - 43% <i>C. coli</i> - 28% <i>C. jejuni</i>	Rodríguez et Araujo (2010)
Royaume-Uni	Eaux de rivière, lacs, étangs	- Filtration sur membrane - Culture avec enrichissement - Typage par test biochimique ou PCR-ELISA		68,3% (41/60) par culture 61,7% (37/60) par culture PCR-ELISA (identification <i>C. coli</i> et <i>C. jejuni</i> )	Sails <i>et al.</i> (2002)
Angleterre	Eau d'étang	- Filtration sur membrane - Culture avec enrichissement	10 mL 100 mL 1 L	50% (9/18) 56% (10/18) 0% (0/18)	Abulreesh <i>et al.</i> (2005)
Irlande	Eau de rivière	- Filtration sur membrane - PCR directe	400 mL	0% (0/17)	Moore <i>et al.</i> (2001a)
Irlande	Eau de rivière	- Filtration sur membrane - Culture avec enrichissement - Typage par PCR	400 mL	87,5% (7/8) Identification <i>C. coli</i> et <i>C. jejuni</i> ( <i>C. coli</i> dominant)	Moore <i>et al.</i> (2001b)

Pays	Nature de l'échantillon	Méthode employée	Volume analysé	Résultats	Référence
<b>Australie</b>	Eaux de rivière, étangs	- Filtration sur membrane - PCRq directe	500 mL	25% (8/32) De $3 \times 10^1$ à $7 \times 10^1$ gènes/100 mL	Ahmed <i>et al.</i> (2009)
<b>Nouvelle Zélande</b>	Eaux de rivière	- Filtration sur membrane - Culture avec enrichissement - Typage par PCR-PFGE	/	55,3% (162/293) - 100% <i>C. jejuni</i> - 7,1% <i>C. coli</i>	Devane <i>et al.</i> (2005)
<b>USA</b>	Eaux de rivières, lacs, étangs	- Filtration sur membrane - Culture avec enrichissement	1 à 4 L	35,7% (5/14)	Carter <i>et al.</i> (1987)
<b>Canada</b>	Eaux de rivières, étangs	- Filtration sur membrane - Culture avec enrichissement - Typage par PCR	/	78,9%	Walters <i>et al.</i> (2007)

**Tableau 5: Corrélation entre les indicateurs de contamination fécale et les campylobacters**

Pays	Type d'eau	Indicateurs fécaux	Corrélation	Références
<b>Allemagne</b>	Eau de rivière	Coliformes totaux	Oui	Stelzer <i>et al.</i> (1989)
<b>Espagne</b>	Eau de mer	Coliformes fécaux et coliformes totaux	Non	Alonso et Alonso (1993)
<b>Espagne</b>	Eaux de rivière	Coliformes fécaux, <i>E. coli</i>	Non	Rodríguez et Araujo (2010)
<b>Pologne</b>	Eau de lac et eau de rivière	Coliformes fécaux et coliformes totaux	Oui	Daczowska-Kozon et Brzostek-Nowakowska (2001)
<b>Royaume-Uni</b>	Eau de rivière	Coliformes fécaux, streptocoques fécaux	Non	Obiri-Danso et Jones (1999a)
<b>Royaume-Uni</b>	Eau de mer	Coliformes fécaux et streptocoques fécaux	Non	Obiri-Danso et Jones (1999b)
<b>Finlande</b>	Eau de lac et eau de rivière	Coliformes thermotolérants, <i>E. coli</i> , <i>Clostridium perfringens</i>	Non	Hörman <i>et al.</i> (2004)
<b>Finlande</b>	Eaux de surface	Coliformes fécaux, coliformes totaux, streptocoques fécaux	Non	Martikainen <i>et al.</i> (1990)
<b>Norvège</b>	Eau de lac et eau de rivière	Coliformes totaux, streptocoques fécaux, bactérie anérobisulfite réductrices (ASR)	Oui	Brennhovd <i>et al.</i> (1992)
<b>Etats-Unis</b>	Eau de lac, étang et eau de rivière,	Coliformes fécaux, coliformes totaux, streptocoques fécaux	Non	Carter <i>et al.</i> (1987)
<b>Australie</b>	Eaux de surface	Entérocoques, <i>E. coli</i>	Non	Ahmed <i>et al.</i> (2009)

#### 1.4. Persistance des campylobacters dans l'environnement

Les campylobacters sont incapables de se multiplier en dehors de leur hôte, par conséquent, après avoir été excrétés dans l'environnement, leur concentration ne peut que rester stable ou diminuer au cours du temps. De nombreux facteurs environnementaux peuvent affecter leur persistance dans l'eau.

### **1.4.1. Principaux facteurs naturels impactant la survie des campylobacters**

#### 1.4.1.1. La température

La température est le paramètre le plus étudié dans les expérimentations de survie des campylobacters dans l'eau. D'une manière générale, les campylobacters persistent plus longtemps dans l'eau à basse température, de 4°C à 10°C. Toutefois les temps de survie peuvent être très variables notamment en fonction de la nature de l'eau, de l'espèce et de la souche utilisée, ainsi que des milieux de culture employés pour suivre l'inactivation des bactéries (Korhonen et Martikainen, 1991; Thomas *et al.*, 1999; Obiri-Danso *et al.*, 2001; Cools *et al.*, 2003; Tatchou-Nyamsi-König *et al.*, 2007; Guillou *et al.*, 2008) (Tableau 6).

Tableau 6: Persistance de *C. jejuni* et *C. coli* en fonction des conditions expérimentales

Température	Type d'eau	Espèce	Souches	Milieu de culture	Persistance (jours)	Référence
<b>4°C</b>						
	Eau stérile				0-14 (6/36) 14-21 (27/36) > 21 (3/36)	Talibart <i>et al.</i> (2000)
		<i>C. jejuni</i>	souches bovines, humaines, eau, volaille, n=36	Columbia		
		<i>C. jejuni</i>	souches de référence souches eau	Mueller Hinton	7 7	Obiri-Danso <i>et al.</i> (2001)
		<i>C. coli</i>	(souches bovines, humaines, eau, volaille), n=49	Columbia	0-14 (12/49) 14-21 (31/49) > 21 (6/49)	Talibart <i>et al.</i> (2000)
		<i>C. coli</i>	souches de référence souches eau	Mueller Hinton	8 6	Obiri-Danso <i>et al.</i> (2001)
	Eau du robinet autoclavée				9.5-11.5 6.5-9.1 9.1-9.6 6.5-7.9	Buswell <i>et al.</i> (1998)
		<i>C. jejuni</i>	souches de référence (n=3) souches humaines (n=5) souches de poulet (n=3) souches eau (n=3)	Columbia		
		<i>C. coli</i>	souches humaines (n=2)	Columbia	5-6.5	Buswell <i>et al.</i> (1998)
	Eau minérale filtrée	<i>C. jejuni</i>	souches humaines	Karmali	> 9	Tatchou-Nyamsi-König <i>et al.</i> (2007)
	Eau du robinet				15-43 8-15 36-57 29-43 29 15	Cools <i>et al.</i> (2003)
		<i>C. jejuni</i>	souches humaines (n=7) souches volailles (n=4) souches eau (n=4)	Columbia Karmali Columbia Karmali Columbia Karmali		
	Eau de mer	<i>C. jejuni</i>	souches de référence souches eau	Mueller Hinton	13 14	Obiri-Danso <i>et al.</i> (2001)
		<i>C. coli</i>	souches de référence souches eau	Mueller Hinton	14 13	Obiri-Danso <i>et al.</i> (2001)
<b>10°C</b>						
	Eau stérile	<i>C. jejuni</i>	souches de référence souches eau	Mueller Hinton	5 6	Obiri-Danso <i>et al.</i> (2001)
		<i>C. coli</i>	souches de référence souches eau	Mueller Hinton	6 5	Obiri-Danso <i>et al.</i> (2001)
	Eau du robinet autoclavée	<i>C. jejuni</i>	souches de référence (n=3) souches humaines (n=5) souches de poulet (n=3) souches eau (n=3)	Columbia	7-8 4,5-10 8-9,1 5	Buswell <i>et al.</i> (1998)

Température	Type d'eau	Espèce	Souches	Milieu de culture	Persistance (jours)	Référence
		<i>C. coli</i>	souches humaines (n=2)	Columbia	6	Buswell <i>et al.</i> (1998)
	Eau de mer					
		<i>C. jejuni</i>	souches de référence	Mueller Hinton	12	Obiri-Danso <i>et al.</i> (2001)
			souches eau		13	
		<i>C. coli</i>	souches de référence	Mueller Hinton	11	Obiri-Danso <i>et al.</i> (2001)
			souches eau		9	
<b>20°C</b>						
	Eau stérile					
		<i>C. jejuni</i>	souches de référence	Mueller Hinton	3	Obiri-Danso <i>et al.</i> (2001)
			souches eau		2	
		<i>C. coli</i>	souches de référence	Mueller Hinton	3	Obiri-Danso <i>et al.</i> (2001)
			souches eau		1,3	
	Eau de mer					
		<i>C. jejuni</i>	souches de référence	Mueller Hinton	4	Obiri-Danso <i>et al.</i> (2001)
			souches eau		4	
		<i>C. coli</i>	souches de référence	Mueller Hinton	4	Obiri-Danso <i>et al.</i> (2001)
			souches eau		3	
<b>22°C</b>						
	Eau du robinet autoclavée					
			souches de référence (n=3)		2	
		<i>C. jejuni</i>	souches humaines (n=5)	Columbia	1,2-2	Buswell <i>et al.</i> (1998)
			souches de poulet (n=3)		2	
			souches eau (n=3)		1,5-2	
		<i>C. coli</i>	souches humaines (n=2)	Columbia	1-1,5	Buswell <i>et al.</i> (1998)
<b>25°C</b>						
	Eau minérale filtrée					
		<i>C. jejuni</i>	souche humaine (n=1)	Karmali	4,5-6,5	Tatchou-Nyamsi-König <i>et al.</i> (2007)
<b>37°C</b>						
	Eau stérile					
		<i>C. jejuni</i>	souches de référence (n=1)	Mueller Hinton	1	Obiri-Danso <i>et al.</i> (2001)
			souches eau (n=1)		1	
		<i>C. coli</i>	souches de référence	Mueller Hinton	1	Obiri-Danso <i>et al.</i> (2001)
			souches eau		1	
	Eau du robinet autoclavée					
			souches de référence (n=3)		0,7-1	
		<i>C. jejuni</i>	souches humaines (n=5)	Columbia	0,6-1,5	Buswell <i>et al.</i> (1998)
			souches de poulet (n=3)		1	
			souches eau (n=3)		0,4-1,5	
		<i>C. coli</i>	souches humaines (n=2)	Columbia	0,7-1	Buswell <i>et al.</i> (1998)
	Eau de mer					
		<i>C. jejuni</i>	souches de référence	Mueller Hinton	1	Obiri-Danso <i>et al.</i> (2001)
			souches eau		1	
		<i>C. coli</i>	souches de référence	Mueller Hinton	1	Obiri-Danso <i>et al.</i> (2001)
			souches eau		1	

#### 1.4.1.2. Les rayonnements UV

Après la température, dans l'environnement, les rayonnements UV ont un impact important sur la survie des campylobacters. Ainsi, Obiri-Danso *et al.* (2001) ont montré qu'à une dose de 200 mW ms<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>, équivalent à la dose apportée par les rayonnements solaires en été, 90% de la population naturelle des campylobacters présente dans une eau de rivière n'étaient plus cultivables après 25 min d'exposition. Bien évidemment l'effet délétère des UV est dépendant de la profondeur à laquelle les bactéries sont retrouvées car les UV sont rapidement stoppés lors de leur pénétration dans l'eau. Signalons que pour minimiser l'effet des UV lors d'expérimentations spécifiques réalisées in vitro en laboratoire, la plupart des études sont effectuées à l'obscurité afin de s'affranchir de leur effet délétère pouvant interférer sur la persistance des campylobacters.

#### 1.4.1.3. La matière organique

La nature de l'échantillon, et notamment la présence de matière organique, va influencer sur la persistance des campylobacters dans l'eau. Les études comparatives de survie dans différents milieux hydriques montrent que la survie des campylobacters est altérée par la présence de matière organique (Pokorný, 1990; Tatchou-Nyamsi-König *et al.*, 2007).

Nous ne pouvons être exhaustifs sur l'ensemble des facteurs environnementaux pouvant avoir un effet sur la survie des campylobacters. On peut cependant citer par exemple des facteurs physico-chimiques tels que le pH, la salinité, mais également les facteurs microbiologiques, qui entreront en compétition vis-à-vis de la disponibilité d'éléments nutritifs ou tout simplement dans la prédation de ces bactéries.

### **1.4.2. Efficacité des traitements de potabilisation**

Il existe à ce jour un très grand nombre de traitements de potabilisation possibles pouvant être employés pour potabiliser des eaux brutes. Ces traitements seront d'autant plus complexes et coûteux que l'eau brute captée sera polluée.

Nous ne pouvons, dans le cadre de ce travail, évoquer tous les systèmes existants ainsi que leur efficacité. Nous avons focalisé notre attention sur les traitements les plus fréquemment employés. Le traitement conventionnel pour produire l'eau d'alimentation consiste en un traitement de coagulation-floculation-sédimentation et d'une filtration, suivi par la désinfection au chlore ou à l'ozone. Cette combinaison de traitements (physiques et chimiques) est appelée procédé multi-barrières. D'autres procédés existent tels que l'ultrafiltration, la nanofiltration, ... , mais ces systèmes ne seront pas abordés ci-dessous. En termes de mesure d'efficacité, les résultats ont été obtenus par le biais de bactéries coliformes telles que *E. coli* au titre des indicateurs classiquement mesurés.

#### 1.4.2.1. Le traitement primaire

Le processus de coagulation-floculation-sédimentation consiste à ajouter du fer ou de l'aluminium à l'eau brute comme du sulfate d'aluminium, du sulfate ferrique, ou du chlorure ferrique. Ces produits chimiques, appelés aussi coagulants, ont une charge positive qui va neutraliser la charge négative des particules dissoutes et suspendues dans l'eau. Les particules vont alors s'agglomérer entre elles et former des floccs. Ces agrégats, plus lourds, sédimenteront au fond des cuves de stockage avant d'être éliminés. La deuxième étape consiste à filtrer l'eau afin d'éliminer les particules les plus fines qui n'auraient pas sédimentées. Les trois principaux matériaux de filtration sont le sable, l'anhracite et le charbon actif.

Bell-Ajy *et al.* (2000) ont étudié l'efficacité d'élimination d'*E. coli* par la coagulation et ont observé une perte de 1 à 2  $\log_{10}$ . Quant au processus de coagulation-floculation-sédimentation, il permettrait d'éliminer 32 à 87% des bactéries (Gimbel et Clasen, 1998). Toutefois, de nombreux facteurs peuvent affecter l'efficacité du procédé tels que le pH, la température, la turbidité ou encore la quantité de matière organique.

#### 1.4.2.2. La désinfection

La désinfection est un processus visant à éliminer les micro-organismes pathogènes pour l'Homme n'ayant pas été retenus lors du traitement primaire. Dans la plupart des cas, la désinfection de l'eau est assurée par des oxydants chimiques tels que le chlore, le dioxyde de chlore, l'ozone, et dans un certain nombre de cas par un procédé physique comme les rayonnements UV, mais ce dernier ne sera pas décrit dans cette partie. L'efficacité d'un traitement chimique vis-à-vis de l'élimination des micro-organismes dépend principalement de la concentration du désinfectant [C], et du temps de contact [T]. Pour un micro-organisme donné, le produit de ces deux valeurs est voisin d'une constante  $CT = [C] \times [T]$ , exprimée en mg/L.min.

D'une manière générale, le chlore est un bon bactéricide. Blaser *et al.* (1986) ont montré qu'une dose de 0,1 mg/L de chlore induisait une perte de 1,4  $\log_{10}$  à plus de 4,5  $\log_{10}$  en 30 sec à 25°C en fonction de la souche de *C. jejuni* et de 2,7  $\log_{10}$  à plus de 4,7  $\log_{10}$  pour les mêmes souches à 4°C.

Concernant l'ozone, peu d'études ont été réalisées sur l'efficacité de l'ozone sur l'élimination des campylobacters. Il semblerait néanmoins que l'effet de l'ozone sur les campylobacters soit similaire à celui sur *E. coli* (Smeets *et al.*, 2006). De nombreuses études ont été réalisées sur l'inactivation d'*E. coli* par l'ozone (Finch *et al.*, 1988; Zhou et Smith, 1994; Hunt et Marinas, 1997; Hijnen *et al.*, 2001) et les résultats de certaines d'entre elles sont présentés dans le Tableau 7.

Tableau 7: Valeurs de CT (mg/L.min) pour obtenir une inactivation d'*E. coli* de 3,5 log<sub>10</sub> à 3,7 log<sub>10</sub> par l'ozone

Température		Référence
2-5°C	15-21°C	
/	0,02	Finch <i>et al.</i> (1988)
0,34	0,05	Zhou et Smith (1994)
0,0025	0,001	Hunt et Marinas (1997)
2,2	/	Hijnen <i>et al.</i> (2001)

### 1.4.3. Mécanismes de survie des campylobacters

#### 1.4.3.1. Les formes viables non cultivables (VNC)

Les bactéries, dans un état viable non cultivable (VNC), sont incapables de se reproduire dans ou sur des milieux de culture, même lorsque les conditions de croissance sont optimales, mais conservent une faible activité métabolique. Dans la littérature, cet état physiologique a été décrit chez de nombreuses bactéries (Tableau 8).

Tableau 8: Bactéries capables d'entrer dans un état de VNC (Oliver, 2005)

<i>Aeromonas salmonicida</i>	<i>Lactobacillus plantarum</i>	<i>Serratia marcescens</i>
<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	<i>Lactococcus lactis</i>	<i>Shigella dysenteriae</i>
<i>Alicycobaculum</i>	<i>Legionella pneumophila</i>	<i>S. flexneri</i>
<i>Aquaspirillum</i> sp.	<i>Listeria monocytogenes</i>	<i>S. sonnei</i>
<i>Burkholderia cepacia</i>	<i>Micrococcus flavus</i>	<i>Sinorhizobium meliloti</i>
<i>B. pseudomallei</i>	<i>M. luteus</i>	<i>Streptococcus faecalis</i>
<i>Campylobacter coli</i>	<i>M. varians</i>	<i>Tenacibaculum</i> sp.
<i>C. jejuni</i>	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	<i>Vibrio anguillarum</i>
	<i>M. smegmatis</i>	
<i>C. lari</i>	<i>Pasteurella piscicida</i>	<i>V. campbellii</i>
<i>Cytophaga allerginae</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>V. cholerae</i>
<i>Enterobacter aerogenes</i>	<i>P. fluorescens</i>	<i>V. fischeri</i>
<i>E. cloacae</i>	<i>P. putida</i>	<i>V. harveyi</i>
<i>Enterococcus faecalis</i>	<i>P. syringae</i>	<i>V. mimicus</i>
<i>E. hirae</i>	<i>Ralstonia solanacearum</i>	<i>V. natriegens</i>
<i>E. faecium</i>	<i>Rhizobium leguminosarum</i>	<i>V. parahaemolyticus</i>
<i>Escherichia coli</i> (including EHEC)	<i>R. meliloti</i>	<i>V. proteolytica</i>
<i>Francisella tularensis</i>	<i>Rhodococcus rhodochrous</i>	<i>V. shiloi</i>
<i>Helicobacter pylori</i>	<i>Salmonella enteritidis</i>	<i>V. vulnificus</i> (types 1 & 2)
<i>Klebsiella aerogenes</i>	<i>S. typhi</i>	<i>Xanthomonas campestris</i>
<i>K. pneumoniae</i>	<i>S. typhimurium</i>	
<i>K. planticola</i>		

L'état «viable non cultivable» chez *Campylobacter* a été décrit par Rollins et Colwell (1986) et repris par la suite par de nombreux auteurs (Ng *et al.*, 1985; Jones *et al.*, 1991; Federighi *et al.*, 1998; Harvey et Leach, 1998; Tholozan *et al.*, 1999; Oliver, 2005). En conditions stressantes, il a été montré que la cultivabilité des bactéries décline rapidement alors que le nombre total de cellules et le nombre de cellules viables restent constants au cours du temps (Figure 8). Simultanément, une transition de la majorité des formes vibroïdes vers des formes coccoïdes est observée par microscopie. Du point de vue biochimique et physiologique, des réductions au niveau du transport de nutriments, de la respiration cellulaire et de la synthèse de macromolécules (Oliver, 2000) sont observées mais le taux d'ATP reste constant (Federighi *et al.*, 1998). Les formes coccoïdes procureraient aux bactéries la possibilité de conserver leur caractère infectieux et une activité métabolique résiduelle lorsque que les conditions ne sont plus favorables (Rollins et Colwell, 1986).

La réversion vers la forme cultivable est possible et a été mise en évidence par inoculation à des souris ou des poulets (Talibart *et al.*, 2000; Baffone *et al.*, 2006) ou encore avec des embryons de poulet (Cappelier *et al.*, 1999). Toutefois dans quelques études, la réversibilité de la cultivabilité de *C. jejuni* par inoculation à des animaux n'a pu être obtenue (Beumer *et al.*, 1992; Medema *et al.*, 1992), alimentant ainsi des controverses déjà existantes quant à la capacité des campylobacters à entrer en état de VNC. En effet, certains scientifiques rejettent le concept de VNC des bactéries en suggérant que les VNC sont des cellules mortes et que la revivification ne serait due qu'à des cellules cultivables survivantes (Morgan *et al.*, 1991; Weichart *et al.*, 1992; Bogosian *et al.*, 1998). Cependant, Tholozan *et al.* (1999) ont montré que seul un nombre limité de souches de *Campylobacter* étaient capables d'entrer en formes VNC. Ils évoquent alors la possibilité que le succès de réversibilité serait souche-dépendante ce qui expliquerait que dans certains cas, la réversion n'a pu être obtenue.

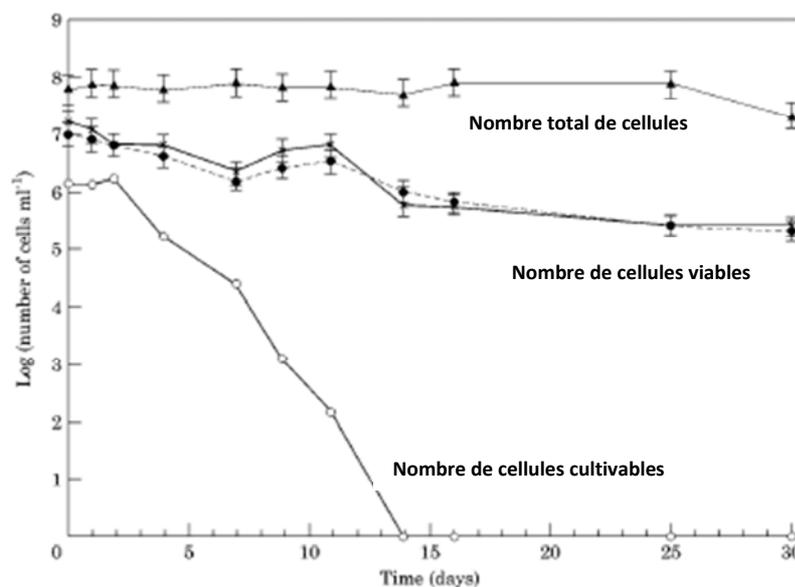


Figure 8: Mise en évidence des différents états physiologiques de *C. jejuni* au cours du temps dans un microcosme d'eau (Federighi *et al.*, 1998)

#### 1.4.3.2. La formation de biofilm

Les campylobacters sont capables de former des biofilms dans un environnement aqueux. L'environnement créé au sein du biofilm protégerait les campylobacters de l'oxygène atmosphérique (Trachoo *et al.*, 2002). Les biofilms joueraient donc un rôle dans la persistance des campylobacters dans l'environnement (Lehtola *et al.*, 2006). Cette hypothèse est confirmée par l'étude de Joshua *et al.* (2006), qui montrent que la survie de *C. jejuni*, dans un bouillon de culture à température ambiante en atmosphère aérobie, est deux fois plus importante lorsque les cellules forment un biofilm comparée aux cellules individualisées. Ainsi, dans le bouillon contenant les cellules individualisées, une perte de 9 log<sub>10</sub> est observée en 12 jours alors qu'il faut 24 jours pour obtenir cette même perte lorsque les cellules forment un biofilm.

#### 1.4.3.3. L'internalisation dans les protozoaires

La présence de protozoaires tels que *Tetrahymena pyriformis* ou *Acanthamoeba castellanii* peuvent permettre à *C. jejuni* de persister plus longtemps dans l'environnement s'ils sont internalisés dans ces micro-organismes. Par exemple, Snelling *et al.* (2005) ont montré que l'internalisation de *C. jejuni* dans les protozoaires *Tetrahymena pyriformis* ou *Acanthamoeba castellanii* permettait à la bactérie de conserver sa viabilité plus de 36 heures supplémentaires que lorsqu'elle se trouve sous forme libre dans l'eau. Cette capacité d'infection jouerait également un rôle important dans la résistance des bactéries à l'action de désinfectants utilisés dans les systèmes de traitement de l'eau potable. Ainsi, une exposition au chlore à 1 mg/L pendant 50 minutes est nécessaire pour inactiver 99% des campylobacters internalisés dans le protozoaire *Tetrahymena pyriformis*, alors que sous forme libre ces mêmes bactéries sont inactivées en moins d'une minute (King *et al.*, 1988).

### 1.5. Méthodes de détection des campylobacters dans l'eau

Dans le milieu hydrique, les campylobacters se trouvent en général en faible quantité. Il est donc indispensable de procéder à une étape de concentration pour pouvoir les détecter. Cette étape a pour but de concentrer sous un faible volume les bactéries présentes dans l'échantillon à analyser.

### 1.5.1. Méthodes de concentration des campylobacters

La méthode de concentration la plus utilisée est la rétention des bactéries sur membrane. Le principe repose sur la filtration de l'échantillon sur un support membranaire dont la taille des pores est inférieure à celle des bactéries. Ainsi, l'eau et les particules dont la taille est inférieure à la taille des pores de la membrane passent à travers celle-ci, alors que celles ayant une taille supérieure sont retenues sur la membrane. Différentes études ont évalué les méthodes de concentration par filtration aussi bien dans les eaux de surface que dans les eaux d'alimentation (Tableau 9). Malgré une grande variabilité des résultats d'une étude à l'autre, il semblerait que les membranes en nylon ainsi que les membranes en ester de cellulose soient les supports les plus adaptés pour la concentration des campylobacters (Mathewson *et al.*, 1983; El-Sherbeeney *et al.*, 1985). Toutefois, Oyofe et Rollins (1993) déconseillent l'utilisation des membranes en ester de cellulose en combinaison avec la PCR car l'ADN des bactéries s'adsorbent aux membranes empêchant leur détection par amplification génique.

Les techniques de concentration autres que la filtration sur membrane sont rares. Khan *et al.* (2009) ont comparé la méthode de filtration à la technique de centrifugation et il s'avère que cette dernière permet de détecter plus fréquemment les espèces *C. coli* (17%) et d'autres espèces de *Campylobacter spp.* (13%) contre respectivement 11% et 3% avec la méthode de filtration sur membrane.

Tableau 9: Evaluation des techniques de concentration des campylobacters dans l'eau

Support	Type d'échantillon			Méthode de détection	Résultats	Référence
	Nature	Volume	Quantité inoculée dans l'échantillon			
<b>Membrane en Ester de cellulose</b>						
- porosité 0,22 µm	Eau de surface	100 mL	2,4 à 5,5 x 10 <sup>4</sup> UFC	Culture (dépôt de la membrane sur gélose)	Sensibilité: 2,4 à 20 UFC/100ml	El-Sherbeeny <i>et al.</i> (1985)
	Eau distillée	167 mL	1,6 à 2,3 x 10 <sup>6</sup> UFC	Culture (dépôt de la membrane sur gélose)	Sensibilité: 1,6 à 1800 UFC (75% et 100% des échantillons)	Blaser et Cody (1986)
	Eau distillée	167 mL	1,6 à 2,3 x 10 <sup>6</sup> UFC	Culture par enrichissement	Sensibilité: 18 à 1800 UFC (16,7% et 100% des échantillons)	Blaser et Cody (1986)
	Eau distillée	100 mL	1 à 7,5 UFC	Culture par enrichissement	Sensibilité: 1,5 UFC/100 mL	El-Sherbeeny <i>et al.</i> (1985)
	Eau du robinet	100 mL	25 à 50 UFC	Culture (dépôt de la membrane sur gélose)	22% n=12	Mathewson <i>et al.</i> (1983)
- porosité 0,45 µm	Eau du robinet	100 mL	25 à 50 UFC	Culture (dépôt de la membrane sur gélose)	33% n=12	Mathewson <i>et al.</i> (1983)
	Eau de surface	250 mL	0,3 à 3 x 10 <sup>4</sup> UFC	Culture (dépôt de la membrane sur gélose)	Sensibilité: 0,3 à 30 UFC (20% et 100% des échantillons)	Blaser et Cody (1986)
	Eau de surface	100 mL	25 à 50 UFC	Culture (dépôt de la membrane sur gélose)	43% n=12	Mathewson <i>et al.</i> (1983)
	Eau de rivière	100 mL	1 à 7,5 UFC	Culture (dépôt de la membrane sur gélose)	Sensibilité: 1,5 à 2,5 UFC/100 mL	El-Sherbeeny <i>et al.</i> (1985)
	Eau de rivière	100 mL	2,4 à 5,5 x 10 <sup>4</sup> UFC	Culture (dépôt de la membrane sur gélose)	Sensibilité: 2,4 à 3,6 UFC/100 mL	El-Sherbeeny <i>et al.</i> (1985)
	Eau de surface	100 mL	25 à 50 UFC	Culture (dépôt de la membrane sur gélose)	33% n=12	Mathewson <i>et al.</i> (1983)
<b>Membrane en Nylon</b>						
	Eau du robinet	100 mL	25 à 50 UFC	Culture (dépôt de la membrane sur gélose)	59% n=12	Mathewson <i>et al.</i> (1983)
	Eau de surface	100 mL	2,4 à 5,5 x 10 <sup>4</sup> UFC	Culture (dépôt de la membrane sur gélose)	Sensibilité: 2,4 à 3,6 UFC/100 mL	El-Sherbeeny <i>et al.</i> (1985)
- porosité 0,45 µm	Eau de surface	250 mL	1 x 10 <sup>2</sup> à 1 x 10 <sup>4</sup> UFC/mL	Elution puis culture sans enrichissement	Sensibilité: 100 à 1000 UFC/mL (66,6% et 100% des échantillons)	Brassard <i>et al.</i> (2011)
	Eau de surface	250 mL	1 x 10 <sup>2</sup> à 1 x 10 <sup>4</sup> UFC/mL	Elution et détection par PCR	Sensibilité: 100 à 1000 UFC/mL (33,3% et 100% des échantillons)	Brassard <i>et al.</i> (2011)
	Eau de surface	100 mL	25 à 50 UFC	Culture (dépôt de la membrane sur gélose)	66% n=12	Mathewson <i>et al.</i> (1983)
- porosité 0,65 µm	Eau du robinet	100 mL	250 UFC	Elution puis culture sans enrichissement	88,9% n=6	Mathewson <i>et al.</i> (1983)
	Eau de surface	100 mL	250 UFC	Elution puis culture sans enrichissement	88,1% n=6	Mathewson <i>et al.</i> (1983)

Support	Type d'échantillon			Méthode de détection	Résultats	Référence
	Nature	Volume	Quantité inoculée dans l'échantillon			
- porosité 1 µm	Eau du robinet	100 mL	250 UFC	Détection par culture sans enrichissement	20% n=6	Mathewson <i>et al.</i> (1983)
	Eau de surface	100 mL	250 UFC	Détection par culture sans enrichissement	16% n=6	Mathewson <i>et al.</i> (1983)
<b>Membrane en Polycarbonate</b>						
- porosité 0,2 µm	Eau de rivière	100 mL	2,4 à 5,5 x 10 <sup>4</sup> UFC	Culture: dépôt de la membrane sur gélose	Sensibilité: 6,2 à 5,5 x 10 <sup>4</sup> UFC/100 mL	El-Sherbeeney <i>et al.</i> (1985)
- porosité 0,4 µm	Eau de rivière	100 mL	2,4 à 5,5 x 10 <sup>4</sup> UFC	Culture: dépôt de la membrane sur gélose	Sensibilité: 3,6 à 6,2 UFC/100 mL	El-Sherbeeney <i>et al.</i> (1985)

Le volume d'eau à analyser selon l'origine est un facteur également primordial à prendre en compte. En effet, dans les eaux brutes telles que les eaux de surface, qui sont le réceptacle de nombreuses contaminations microbiologiques, de fortes concentrations en campylobacters peuvent être retrouvées ce qui sous-entend qu'il n'est pas nécessaire d'analyser de grands volumes d'eau. Ainsi, dans ces milieux, des volumes analysés de 100 mL à 1 L sont suffisants pour pouvoir détecter les campylobacters. Par contre, dans les eaux naturellement épurées ou traitées spécifiquement par des traitements physico-chimiques, la concentration en campylobacters est plus faible et des volumes d'eau à analyser plus importants sont nécessaires pour augmenter la probabilité de détection. Toutefois, dans la plupart des études, les volumes employés dans l'analyse de ces eaux n'excèdent pas 1 à 5 L ce qui, pour certains auteurs comme Hänninen *et al.* (2003), semblent insuffisants pour mettre en évidence une contamination par les campylobacters. En effet, dans leur étude, 4 à 10 L d'eau du robinet et d'eau souterraine suspectées d'être à l'origine d'épidémies de gastro-entérites ont été utilisés avec succès pour détecter *C. jejuni* et *C. coli*. Cependant, l'analyse de grands volumes d'eau n'est pas sans conséquence sur la détection des bactéries car elle peut également induire une concentration plus importante de la flore interférente, qui peut inhiber la croissance des campylobacters. L'augmentation du volume des bouillons d'enrichissement à 500 mL ou 1 L, au lieu d'un volume de 100 mL à 150 mL généralement utilisé, pourrait être une solution afin de limiter cette compétition (Abulreesh *et al.*, 2005).

### 1.5.2. Méthodes de détection des campylobacters

De nombreuses méthodes sont employées pour (i) détecter et quantifier les campylobacters et (ii) estimer leur viabilité ou leur infectiosité. Toutefois, dans cette partie de l'étude bibliographique, nous décrirons seulement les méthodes les plus utilisées.

#### 1.5.2.1. Détection et isolement des campylobacters

##### 1.5.2.1.1. Détection par la méthode de culture

Dans les échantillons hydriques, l'utilisation de méthodes de détection suffisamment sensibles est indispensable afin de pouvoir détecter les campylobacters présents en faible quantité parmi une flore bactérienne abondante.

La méthode de détection la plus employée est la méthode de culture. Après concentration des campylobacters sur une membrane, les bactéries sont alors isolées sur des milieux gélosés soit directement après la concentration, soit après une étape d'enrichissement. L'isolement direct a été proposé par Blaser et Cody (1986) pour la recherche des campylobacters dans des échantillons d'eau poly-microbiens. Cette méthode consiste à filtrer l'échantillon sur une membrane et à déposer celle-ci directement sur un milieu gélosé sélectif. Les campylobacters étant mobiles, ils sont alors capables de traverser la membrane. Après 12 h d'incubation, la membrane est retirée et le milieu est réincubé pendant 48 h. Cette technique est employée aussi bien dans des eaux de rivière, les lacs (Arvanitidou *et al.*, 1995b) que dans les eaux de mer (Arvanitidou *et al.*, 1995a). Les milieux sélectifs sont des géloses au sang additionnées de plusieurs antibiotiques qui vont inhiber la flore saprophyte de l'échantillon d'eau.

L'enrichissement consiste à inoculer un échantillon dans des bouillons de culture plus ou moins sélectifs pendant 24 à 48 h à 37°C. L'étape d'enrichissement favorise la détection des campylobacters dans les matrices où ces bactéries sont en faible quantité et/ou dans un état de stress physiologique, en leur permettant de se développer tout en supprimant ou en inhibant plus ou moins fortement d'autres micro-organismes. Cette étape est largement utilisée pour la détection des campylobacters dans les échantillons environnementaux (Carter *et al.*, 1987; Sails *et al.*, 2002; Diergaardt *et al.*, 2004; Hörman *et al.*, 2004; Devane *et al.*, 2005; Walters *et al.*, 2007; Denis *et al.*, 2009). L'étape d'enrichissement est recommandée dans la procédure normalisée ISO 17995 (2005) pour la détection des campylobacters thermotolérants dans les échantillons hydriques.

L'intérêt d'un enrichissement pour la détection des campylobacters dans l'eau est largement documenté (Fricker, 1987; Humphrey, 1989; Stanley *et al.*, 1998) et semble fonction de la nature de l'échantillon. Ainsi, dans les eaux de faible turbidité, il a été montré que la méthode d'inoculation directe sur milieu gélosé est plus sensible (Blaser et Cody, 1986), alors qu'au contraire, dans les eaux de surface, le taux de recouvrement des campylobacters est meilleur lorsque l'étape d'enrichissement est effectuée (Rosef *et al.*, 2001; Abulreesh *et al.*, 2006). Toutefois, dans les échantillons environnementaux, la flore interférente, présente en grande quantité, est susceptible d'être co-concentrée en même temps que les campylobacters. Ainsi, dans les bouillons d'enrichissement, la croissance des campylobacters peut être inhibée du fait de la compétition pour les nutriments du milieu (Fricker, 1987). Il est donc impératif d'utiliser des milieux qui permettront la détection des campylobacters de manière sélective en éliminant une partie de la flore interférente. Le plus souvent ces milieux sont composés de sang défibriné ou lysé, de charbon ou de pyruvate de sodium. La sélection se fait par l'ajout d'antibiotiques qui vont inhiber la croissance de la microflore pour permettre celle des campylobacters. Dans certains cas, des résultats faussement négatifs, dus aux antibiotiques pouvant également inhiber la croissance des campylobacters, ont été relevés (Baylis *et al.*, 2000). Par conséquent, il convient de choisir judicieusement les milieux avec lesquels on souhaite mettre en évidence la présence de ces bactéries. L'utilisation de deux bouillons d'enrichissement sélectifs, dont l'un inhibe la croissance de la microflore mais qui peut également induire une inhibition de quelques souches de *Campylobacter*, et l'autre permettant la croissance de toutes les souches de *Campylobacter* mais qui n'est pas assez sélectif pour la microflore, semble être un bon compromis pour augmenter la probabilité de détection de ces micro-organismes dans les échantillons de l'environnement. L'emploi de deux bouillons d'enrichissement est d'ailleurs recommandé dans la norme ISO 17995 (2005).

#### 1.5.2.1.2. Détection par biologie moléculaire

La technique de PCR (Polymerase Chain Reaction) est une technique sensible, spécifique et rapide, pour la détection des campylobacters dans les milieux naturels. A ce jour de nombreux protocoles de PCR ont été développés pour mettre en évidence la présence de *Campylobacter* spp. directement dans l'échantillon ou après enrichissement dans des bouillons de culture. Il s'agit par exemple de PCR conventionnelles (Wegmüller *et al.*, 1993; Moreno *et al.*, 2001; Moreno *et al.*, 2003), de nested et semi-nested PCR (Waage *et al.*, 1999), des PCR multiplex (Denis *et al.*, 1999; Winters et Slavik, 2000), de RT-PCR (Sails *et al.*, 1998), ou encore de PCR en temps réel (Logan *et al.*, 2001; Cheng et Griffiths, 2003; Sails *et al.*, 2003; Josefsen *et al.*, 2004; LaGier *et al.*, 2004; Abu-Halaweh *et al.*, 2005; Ménard *et al.*, 2005).

Parmi ces protocoles, certains sont employés directement, sans étape de culture préalable, pour la détection de campylobacters dans les eaux potables, les eaux souterraines, les eaux de surface (Kirk et Rowe, 1994; Moore *et al.*, 2001a; Yang *et al.*, 2003; Ahmed *et al.*, 2009). Après concentration, les bactéries sont récupérées et l'ADN est extrait avant d'être amplifié par PCR. La détection des campylobacters par la technique de PCR est rapide puisque quelques heures sont nécessaires pour obtenir une réponse contre 2 à 5 jours par la méthode de culture. Ces méthodes sont également plus sensibles, et peuvent détecter spécifiquement des espèces ciblées de *Campylobacter* par l'emploi d'amorces et de sondes nucléotidiques spécifiques. Toutefois, la mise en évidence du génome de campylobacter dans l'échantillon d'eau par PCR ne permet pas d'affirmer de la présence de bactéries viables et donc d'attester d'un risque infectieux pour le consommateur.

#### 1.5.2.1.3. Typage des campylobacters

Les méthodes de typage sont appliquées en complément des méthodes de détection et visent à classer les campylobacters en catégories ou groupes en fonction du critère étudié. Les résultats obtenus par les méthodes de typage permettent d'apporter des informations épidémiologiques de ces pathogènes notamment dans les études des voies de transmission des campylobacters à l'Homme, du suivi de la distribution géographique et temporelle des espèces, ainsi que pour déterminer l'origine d'une contamination en cas d'épidémie.

Les différentes méthodes de typage incluent les méthodes phénotypiques (biotypage, sérotypage, lysotypage) et génotypiques (génomotypage). Le choix de la méthode doit se faire en fonction de l'information recherchée.

- Les méthodes phénotypiques
  - Le phénotypage

Le biotypage est généralement basé sur des tests biochimiques comme l'hydrolyse de l'hippurate, la catalase, l'oxydase. Cette méthode est largement employée pour l'identification des campylobacters issus d'échantillons environnementaux (Delom et Munoz, 2000; Brown *et al.*, 2004; Hörman *et al.*, 2004; Abulreesh *et al.*, 2005). Cependant, bien que les espèces *C. coli* et *C. jejuni* soient relativement bien identifiées, la confirmation est souvent limitée au genre et des résultats faussement négatifs ou au contraire faussement positifs peuvent être générés (On, 1996). Ainsi, dans l'étude de Diergaardt *et al.* (2004), il a été rapporté que les tests biochimiques avaient permis la confirmation de 22 colonies comme étant des campylobacters alors que le séquençage avait mis en évidence la présence de campylobacters pour seulement 3 colonies. Il s'est avéré que les 19 autres colonies, confirmées comme *Campylobacter* par les tests biochimiques, étaient en fait des *Arcobacter butzleri* (espèces appartenant à la même famille que *Campylobacter*).

- Le sérotypage

Les méthodes de sérotypage sont basées sur le principe d'agglutination spécifique d'antigène avec des anticorps et sont souvent utilisées en complément des tests biochimiques. Ainsi, les différents agents ayant le même jeu d'antigènes sont regroupés ensemble. Il semblerait toutefois que l'identification des souches environnementales est parfois difficile (Brennhovd *et al.*, 1992).

- Le lysotypage

Cette méthode permet de distinguer les souches bactériennes en fonction de leur sensibilité à divers types de bactériophages. Des schémas de lysotypage ont été décrits pour certaines espèces de *Campylobacter* comme *C. jejuni* (Federighi, 1999).

- Les méthodes génotypiques

- Le génotypage

Ces méthodes peuvent porter sur l'ensemble ou sur seulement quelques gènes. Ces techniques, basées sur la détection des séquences génétiques, sont de plus en plus utilisées dans les laboratoires pour l'identification des campylobacters présents dans des échantillons hydriques. Elles peuvent porter soit sur l'ensemble du chromosome bactérien par la comparaison de profils génétiques, comme c'est le cas pour l'électrophorèse en champs pulsés (PFGE) (Hänninen *et al.*, 2003; Lucey *et al.*, 2004; Devane *et al.*, 2005; Denis *et al.*, 2009); soit sur la détection spécifique de gènes telle que les méthodes de PCR, PCR-RFLP (PCR- Restriction Fragment Length Polymorphism) (Waage *et al.*, 1999; Savill *et al.*, 2001; Josefsen *et al.*, 2004), ou l'hybridation in-situ (Moreno *et al.*, 2003).

- Le ribotypage

Sur le chromosome bactérien, plusieurs copies du gène de l'ARN ribosomique sont présentes (ARN 5S, ARN 16S, ARN 23S). La technique la plus employée consiste en une digestion enzymatique de l'ADN suivie d'une hybridation Southern Blot avec une sonde spécifique des gènes de l'ARN ribosomal. Les enzymes permettant la digestion du chromosome bactérien sont diverses et peuvent être employées seules ou combinées. Toutefois, l'inconvénient majeur de cette méthode est qu'elle est limitée à l'identification de l'espèce et les différences dans les enzymes de restriction et les sondes utilisées entravent généralement les comparaisons directes des profils obtenus dans différents laboratoires (Wassenaar et Newell, 2000).

- Le séquençage

Le séquençage peut être réalisé avec ou sans amplification par PCR. Cette méthode, de plus en plus utilisée, présente l'avantage d'être hautement reproductible (Owen et Hernandez, 1993; Jackson *et al.*, 1996). Toutefois, les données complexes et le pouvoir discriminant élevé rendent l'interprétation des résultats extrêmement dépendant des programmes et des logiciels employés (Wassenaar et Newell, 2000). Le séquençage portant sur le locus de la flagelline a été utilisé dans certaines études (Meinersmann *et al.*, 1997).

Le Tableau 10 présente une comparaison des techniques de typage génotypiques utilisées pour l'identification des campylobacters avec leurs avantages et leurs inconvénients relatifs.

Tableau 10: Comparaison des différentes méthodes génotypiques (Wassenaar et Newell, 2000; Foxman *et al.*, 2005)

Méthode	Pouvoir discriminant	% de souches typables	Reproductibilité	Répétabilité	Part du génome analysé	Temps nécessaire	Coût	Disponibilité
<b>PFGE</b>	élevé	100	moyenne à élevée	moyenne à élevée	génomome entier	3-4 jours	moyen	bonne
<b>PCR-RFLP</b>	moyen à élevé (multiplex)	100	moyenne	moyenne à élevée	gènes	<1 jours	raisonnable	bonne
<b>Séquençage d'un ou plusieurs gènes</b>	moyen à très élevé en fonction du gène choisi	100	élevée	élevée	gène(s)	2-3 jours	élevé	limitée
<b>Typage par séquençage sur plusieurs loci (MLST)</b>	très élevé	100	élevée	élevée	gènes	> 3 jours	élevé	limitée
<b>Séquençage total du génome</b>	très élevé	100	élevée	élevée	génomome entier	de plusieurs mois à plusieurs années	très élevé	très limitée
<b>Ribotypage</b>	faible	100	élevée	élevée	gène (s)	3-4 jours	moyen	méthode complexe

### 1.5.2.2. Les méthodes d'estimation de la viabilité ou de l'infectiosité des campylobacters

Le point clé dans le concept des VNC est l'estimation de la viabilité. En effet, bien que la méthode de culture soit la technique la plus employée pour mettre en évidence la présence des campylobacters dans l'eau, elles ne peuvent mettre en évidence les formes viables non cultivables de ces bactéries qui pourtant représentent un risque en termes de santé publique. Un certain nombre de méthodes ont été proposées pour évaluer la viabilité de ces bactéries. Ces méthodes évaluent la viabilité des cellules par l'un des trois critères: l'activité métabolique, l'intégrité des structures cellulaires ou des tests d'expression génique.

Les principales méthodes de mise en évidence d'un maintien d'une activité métabolique sont la bioluminescence, le test de viabilité DVC (Direct Viable Count), et le test de la réduction du tétrazolium.

Le test de viabilité DVC a été décrit pour la première fois par Kogure *et al.* (1979). Le principe repose sur l'incubation d'une suspension bactérienne dans un milieu riche en nutriments en présence d'antibiotique, l'acide nalidixique, qui inhibe la division cellulaire des bactéries. A la suite de cette incubation, les cellules actives (viables) sont allongées ce qui permet de les distinguer des cellules inactives par microscopie. L'efficacité de la détection des formes allongées est variable notamment en fonction de la souche. En effet, il a été montré que le temps d'incubation pouvait varier entre 8 et 36 h et la concentration en acide nalidixique entre 5 et 10 µg/mL en fonction de la souche (Höller et Martin, 1998).

Le test de réduction du tétrazolium, décrit par Zimmerman *et al.* (1978), repose sur le principe de l'utilisation du CTC (5-cyano-2,3-ditoyl tétrazolium), composé qui est réduit en un précipité rouge (CTC-formazan) par les déshydrogénases (enzyme de la chaîne respiratoire). Le CTC-formazan insoluble dans l'eau est alors détecté par microscopie seulement dans les cellules viables. Le DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole), colorant vital se liant à l'ADN de toutes les cellules (viables et non viables), est généralement couplé à l'utilisation du CTC afin de déterminer la proportion de cellules viables parmi l'ensemble des cellules présentes dans l'échantillon.

La bioluminescence est employée pour mesurer l'Adenosine TriPhosphate (ATP), une molécule de stockage d'énergie présente dans toutes les cellules vivantes. Le résultat de cette mesure traduit donc une activité microbienne globale dans l'échantillon analysé.

Ces méthodes longues et fastidieuses sont employées généralement dans les études de mise en évidence des formes VNC ou dans les études de persistance des campylobacters dans les milieux hydriques (Ng *et al.*, 1985; Bovill et Mackey, 1997; Federighi *et al.*, 1998; Cappelier *et al.*, 1999; Trachoo *et al.*, 2002).

La détection des cellules viables peut être réalisée par biologie moléculaire et notamment par la détection de l'ARNm, dont la synthèse est réalisée uniquement par les cellules viables. Les deux principales méthodes d'amplification pour la détection de l'ARNm sont la RT-PCR et la méthode NASBA (Nucleic Acid Sequence Based Amplification). Sails *et al.* (1998) ont développé la technique de RT-PCR pour la détection des campylobacters thermotolérants. Le principe de la RT-PCR (reverse transcriptase-polymerase chain reaction) repose sur une étape de rétro-transcription des ARN synthétisés en ADN complémentaire qui est ensuite amplifié par PCR.

La technique NASBA a été développée par Cools *et al.* (2006) pour la détection de l'ARNm de *C. jejuni*. Cette technique isotherme repose sur le même principe que la RT-PCR mais présente l'avantage d'être plus rapide car il n'est pas nécessaire de procéder à une étape de dénaturation de l'ADN. La limite de détection de la méthode a été estimée à 100 cellules/réaction.

Depuis quelques années, une approche combinant la méthode de PCR avec un colorant vital, l'EMA (Ethidium Monoazide) ou le PMA (Propidium Monoazide) a été développée pour discriminer les cellules viables chez différents micro-organismes. L'EMA est une molécule qui pénètre seulement dans les cellules mortes ou les cellules endommagées, se lie de façon covalente à l'ADN et bloque l'amplification de la séquence cible pendant l'étape de PCR. Ainsi, seul un signal de fluorescence peut être interprété comme la présence de cellules viables dans l'échantillon. Des études ont été réalisées sur *Cryptosporidium* (Brescia *et al.*, 2009), *Listeria monocytogenes* (Flekna *et al.*, 2007) et les résultats sont très variables en fonction des études. Concernant la détection des campylobacters viables, les études réalisées par Rudi *et al.* (2005) et He et Chen (2010) mettent en évidence une inhibition incomplète du signal de fluorescence lors de l'amplification de cellules mortes, ceci en raison d'une possible perméabilité membranaire affectant la pénétration de l'EMA, d'un problème dans l'affinité de l'ADN et de l'EMA. Par ailleurs, la méthode d'EMA-PCR met en évidence l'intégrité membranaire des cellules mais ne peut fournir d'informations sur la cultivabilité, l'activité métabolique ou l'infectiosité des cellules.

## 2. LES VIRUS PATHOGENES A TRANSMISSION HYDRIQUE

Dans le cadre de ce travail de thèse, nous nous sommes focalisés principalement sur la mise en évidence et l'étude du comportement des adénovirus dans les milieux hydriques retenus. Ces virus font actuellement l'objet d'une attention particulière car, pour certains auteurs, ils seraient de bons indicateurs de pollution virale (Pina *et al.*, 1998; Griffin *et al.*, 2001; Jiang *et al.*, 2005).

Il faut rappeler qu'il existe plus de 140 sérotypes de virus entériques susceptibles d'être retrouvés dans le milieu hydrique (Gantzer *et al.*, 1998a). Ces virus appartiennent à différentes familles et genres et peuvent être divisés en trois groupes en fonction des pathologies provoquées: les virus responsables des hépatites, les virus ayant un large spectre d'infections et les virus responsables de gastro-entérites. Dans la suite de cette bibliographie nous décrivons succinctement les différents virus appartenant à ces trois groupes.

### 2.1. Virus des hépatites

#### 2.1.1. Le virus de l'hépatite A

Le virus de l'hépatite A appartient à la famille des *Picornaviridae* et au genre *Hepatovirus* dont il est le seul représentant. C'est un virus non enveloppé constitué d'une capsidie icosaédrique de 28 à 30 nm de diamètre. Le génome viral est un ARN de 7,5 kb linéaire monocaténaire de polarité positive. 7 génotypes ont pu être identifiés mais seuls les génotypes I, II et III sont responsables d'infections humaines. Près de 90% des souches humaines appartiennent au génotype I et les 10% restantes appartiennent au génotype III.

L'hépatite A est une infection cosmopolite et endémique. La transmission du virus est toujours féco-orale et la contamination peut se faire par l'intermédiaire d'aliments ou d'eaux contaminés. Après ingestion, le virus de l'hépatite A atteint les cellules de l'intestin grêle et se réplique avant de gagner le foie dans lequel il se multiplie. Les particules virales nouvellement formées sont alors transportées dans la circulation générale sanguine. Bien que l'infection soit bénigne et sans séquelle dans 95% des cas, la sévérité des symptômes augmente avec l'âge. En effet, l'infection est asymptomatique chez 90% des enfants infectés de moins de 5 ans, alors que 70% à 80% des adultes ont une symptomatologie clinique avec une forme ictérique observée dans plus de la moitié des cas. La période d'incubation est d'environ 1 mois (15 à 50 jours) et la maladie dure en moyenne 95 jours mais peut aller jusqu'à 6 mois dans 10 à 15% des cas (Bower *et al.*, 2000). La dose infectieuse n'est pas connue, mais elle est estimée entre 10 et 100 particules virales (AFSSA, 2007).

### 2.1.2. Le virus de l'hépatite E

Le virus de l'hépatite E appartient à la famille des *Hepeviridae*, au genre *Hepevirus* dont il est le seul représentant. C'est un virus sphérique non enveloppé de 27 à 33 nm de diamètre avec un matériel génétique constitué d'un ARN monocaténaire de 7,2 kb à polarité positive. Le site de réplication du virus de l'hépatite E est le cytoplasme des hépatocytes.

La transmission du virus se fait essentiellement par voie orale par ingestion d'eau contaminée favorisée par un faible niveau sanitaire (Worm *et al.*, 2002). Le virus de l'hépatite E est endémique dans de nombreuses régions du monde notamment dans les pays en voie de développement (Koopmans *et al.*, 2002), et de fréquentes épidémies d'origine hydrique ont été rapportées telles que celles survenues au Vietnam (Corwin *et al.*, 1996), au Pakistan (Rab *et al.*, 1997), en Inde (Sailaja *et al.*, 2009). Dans les pays développés, la plupart des cas d'hépatite E ont été retrouvés chez les personnes ayant séjournées dans des pays où la maladie est endémique (Lavanchy *et al.*, 1994).

Le virus est responsable d'hépatites aiguës caractérisées par un syndrome pseudo-grippal dont les signes précurseurs sont de la fièvre, de la fatigue, de l'anorexie et des malaises. L'excrétion du virus dans les selles précède de 4 à 8 jours la phase ictérique de la maladie. Des études de dose-réponse effectuées chez des singes ou des porcs ont pu mettre en évidence une dose infectieuse de 100 particules virales et une  $DI_{50}$  de  $10^{3,5}$  particules, respectivement (Williams *et al.*, 2001).

## 2.2. Les virus provoquant des infections multiples

Les virus entériques provoquant des infections multiples sont les entérovirus et les paréchovirus. Ces virus appartiennent à la famille des *Picornoviridae* qui est divisée en 9 genres dont le genre *Enterovirus* et le genre *Parechovirus*. Dans cette étude bibliographique, nous nous intéresserons seulement aux entérovirus dont il existe 9 espèces et plus de 80 sérotypes (Tableau 11).

Tableau 11: Classification actuelle des entérovirus (King *et al.*, 1999)

Espèces d'entérovirus	Nombres de sérotypes
Entérovirus humains A	12
Entérovirus humains B	36
Entérovirus humains C	11
Entérovirus humains D	2
Poliovirus	3
Entérovirus bovins	2
Entérovirus porcins A	1
Entérovirus porcins B	2
Entérovirus simiens	20

Les entérovirus humains sont des virus non enveloppés avec une capsidie icosaédrique de 24 à 30 nm de diamètre constituée d'un assemblage de 60 capsomères composés chacun de 4 protéines structurales appelées VP1, VP2, VP3 et VP4 (Rueckert, 1996). A l'intérieur de la capsidie, le génome est un ARN monocaténaire de polarité positive de 7500 nucléotides.

Les entérovirus humains sont des pathogènes largement ubiquitaires. Le mode de transmission principal est oro-fécal ce qui explique sa forte prévalence chez les jeunes enfants. Après ingestion du virus, le premier site de réplication se situe au niveau des tissus lymphoïdes des amygdales. Par la suite le virus peut diffuser dans la circulation lymphatique et peut passer dans la circulation sanguine pour atteindre les organes cibles tels que la moëlle épinière, le cerveau, le myocarde. En parallèle, le virus peut aussi diffuser par voie entérique: après avoir franchi la barrière stomacale, la réplication s'effectue dans l'intestin grêle au niveau des plaques de Peyer. Là aussi il diffuse par la voie lymphatique mais peut aussi diffuser dans la circulation sanguine. La plupart des infections à entérovirus sont asymptomatiques, et seulement 1% des personnes infectées manifestent des symptômes qui peuvent être très divers du fait d'une large cible d'organes (Nicand *et al.*, 1998). Ainsi des méningites, poliomyélites, myocardites, encéphalites, conjonctivites hémorragiques peuvent survenir en fonction des espèces. La durée moyenne d'excrétion fécale est d'environ 1 mois et peut débuter 4 à 5 jours avant l'apparition des symptômes.

Les données de contamination du milieu hydrique par les entérovirus sont nombreuses et des pics de contamination sont observés en été, contrairement à ce que l'on peut observer avec les virus responsables de gastro-entérites (Pianetti *et al.*, 2000). Par contre, ces virus sont rarement incriminés dans les épidémies d'origine hydrique.

### **2.3. Les virus responsables de gastro-entérites**

Les principaux virus responsables de gastro-entérites chez l'Homme sont les rotavirus, les norovirus, les astrovirus et les adénovirus entériques (Glass *et al.*, 2001).

Les gastro-entérites touchent la population mondiale du fait du caractère ubiquitaire des virus entériques et de leur forte capacité de transmission (Koopmans *et al.*, 2002). Les cas de morbidité et de mortalité sont plus importants dans les pays en voie de développement, alors que dans les pays développés la plupart des infections sont bénignes. Toutefois les personnes immunodéprimées, les enfants en bas âges, les personnes âgées et les femmes enceintes représentent le groupe à risque de complications liées à l'infection virale (Gerba *et al.*, 1996). Après une période d'incubation de quelques heures à plusieurs jours, les signes cliniques tels que les diarrhées et les vomissements apparaissent et persistent de quelques heures à plusieurs jours en fonction du virus. Dans les cas les plus graves, une hospitalisation est nécessaire suite à une sévère déshydratation.

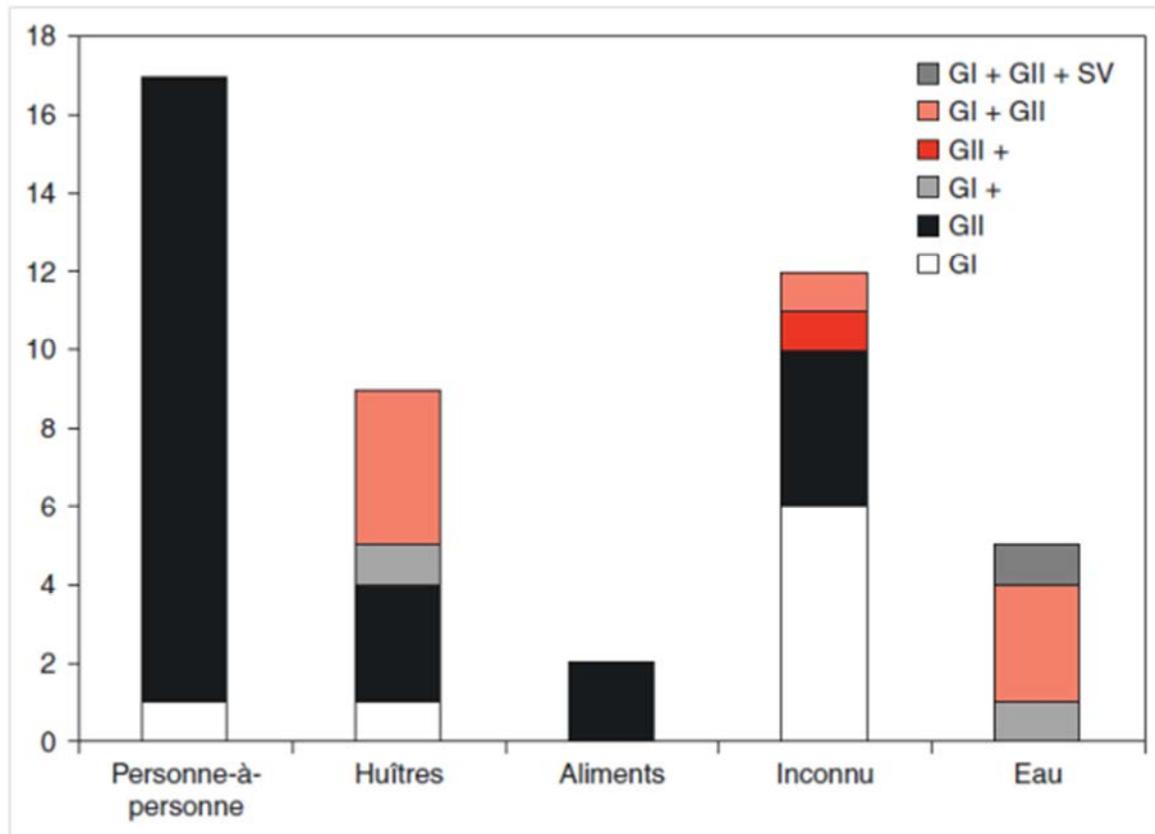
### 2.3.1. Les calicivirus

Les calicivirus appartiennent à la famille des *Caliciviridae* qui comprend quatre genres: les deux genres, *Lagovirus* et *Vesivirus* qui infectent seulement les animaux, et les deux autres genres *Norovirus* et les *Sapovirus* qui infectent les humains. Dans ce paragraphe, nous nous intéresserons seulement aux *Caliciviridae* humains.

Ce sont des virus constitués d'une capsidie icosaédrique dépourvue d'enveloppe, de 30 à 34 nm de diamètre formée de 90 dimères de la protéine VP1. Le génome est un ARN linéaire monocaténaire d'environ 7,7 kb de polarité positive. Ils comprennent les norovirus et les sapovirus.

#### 2.3.1.1. Les norovirus

Les norovirus sont divisés en 5 génogroupes parmi lesquels les génogroupes I, II et IV peuvent infecter l'Homme. Du fait d'une variabilité génétique importante, chaque génogroupe est divisé en génotypes. Les génogroupes I et II sont prédominants dans les infections humaines, mais il semblerait que la répartition soit dépendante du mode de transmission de l'infection (Kohli *et al.*, 2005). Ainsi les épidémies d'origine environnementale seraient souvent associées à plusieurs souches, alors que les épidémies pour lesquelles le mode de contamination se fait de personne à personne ne seraient associées qu'à une seule souche (Figure 9).



**Figure 9: Distribution des souches de calicivirus détectées dans des épidémies de gastro-entérites en France de décembre 1998 à février 2004 selon le mode de transmission (Bon *et al.*, 2005). SV: sapovirus, GI, GII: seules les souches GI ou GII ont été isolées; GI+, GII+, GI+GII: au moins une souche de norovirus appartenant au génogroupe GI ou GII détectée**

Les norovirus sont reconnus comme la cause majeure de gastro-entérites virales toutes classes d'âges confondues. Ils sont à l'origine de plus de 90% des épidémies de gastro-entérites non bactériennes survenues au sein de collectivités telles que les crèches, les restaurants, les écoles,... (Green *et al.*, 2001). L'incidence chez les enfants de moins de 5 ans est au moins égale à celle des rotavirus. Le mode de transmission se fait principalement de personne à personne par voie féco-orale. D'un point de vue clinique, la période d'incubation varie de 1 à 2 jours. Les principaux symptômes sont des vomissements, des crampes abdominales ainsi que des diarrhées. Ces dernières peuvent durer jusqu'à 7 à 10 jours avec une excrétion de  $10^7$  à  $10^{10}$  particules virales infectieuses par gramme de selles. La dose infectieuse des norovirus n'est pas connue mais elle est estimée à 10 particules virales (Moe *et al.*, 2004).

Des épidémies à norovirus d'origine hydrique ont été décrites dans de nombreux pays dans le monde tels que la Finlande (Kukkula *et al.*, 1997; Kukkula *et al.*, 1999), la Norvège (Nygård *et al.*, 2004), la Suisse (Häfliger *et al.*, 2000), l'Italie (Boccia *et al.*, 2002), la Corée (Kim *et al.*, 2005), l'Australie (McAnulty *et al.*, 1993), le Canada (Payment *et al.*, 1994; Beller *et al.*, 1997), les Etats-Unis (Kaplan *et al.*, 1982; Lawson *et al.*, 1991; Anderson *et al.*, 2003).

En France, parmi les 9 épidémies d'origine hydrique survenues entre 2000 et 2006, quatre d'entre elles ont impliqué les *Caliciviridae* (Beaudeau *et al.*, 2007). Si dans l'épidémie survenue à Gourdon dans le Lot en 2000, les rotavirus et les *Caliciviridae* ont été isolés des selles des patients dans respectivement 71% et 21% des échantillons, pour les trois autres, survenues en Isère (38) en Novembre 2002, à Pont de Roide (25) en Février 2004 et à Arc 1800 (73) en Février 2006, les norovirus ont été identifiés comme les agents principaux mis en cause (Tableau 12).

**Tableau 12: Epidémies de gastro-entérites virales d'origine hydrique investiguées en France par l'InVS entre 2000 et 2006 (Beaudeau *et al.*, 2007)**

Epidémies	Date	Cause	Pathogènes incriminés	Taille de la population exposée
<b>Gourdon (46)</b>	Août 2000	Infiltration au forage d'eau de rivière + dysfonctionnement des systèmes de chloration	Rotavirus et <i>Caliciviridae</i>	4900 personnes + 2200 touristes
<b>Isère (38)</b>	Novembre 2002	Fortes précipitations provoquant une inondation du captage + dysfonctionnement de la station d'épuration située en amont du captage	Norovirus I et II	5600 personnes
<b>Pont de Roide (25)</b>	Février 2004	Interconnexion entre la station d'épuration et le réseau d'eau potable	Norovirus	4800 personnes
<b>Arc 1800 (73)</b>	Février 2006	Epanchage de fosse septique ou neige artificielle contaminée + défaut de chloration	Norovirus I	6100 résidents + 18000 touristes

#### 2.3.1.2. Les sapovirus

Les sapovirus sont divisés en 5 génogroupes: les souches appartenant aux génogroupes 1, 2, 4 et 5 infectent les humains alors que les souches du génogroupe 3 infectent les animaux (Farkas *et al.*, 2004). Les sapovirus sont responsables de gastro-entérites infantiles dans les cas sporadiques mais ne représentent que des agents mineurs de ce type d'infection, environ 30% des cas d'infections de *Caliciviridae* (Kohli *et al.*, 2005). La dose infectieuse n'est pas connue mais elle pourrait être comparable à celle des norovirus, de l'ordre de 10 particules virales.

#### 2.3.2. Les rotavirus

Les rotavirus appartiennent à la famille des *Reoviridae*. Ils sont divisés en 7 groupes sur la base des caractéristiques de la protéine VP6. Seuls les groupes A, B et C sont impliqués dans les infections humaines. Les rotavirus du groupe A sont responsables de la plupart des gastro-entérites à rotavirus.

Ce sont des virus non enveloppés, à capsidie icosaédrique d'environ 70 nm de diamètre constituée de trois couches superposées. Le génome viral est composé de 11 brins d'ARN double brin qui codent six protéines structurales nommées VP1 à VP6 et six protéines non structurales nommées NSP1 à NSP6.

La multiplication virale se situe au niveau des entérocytes de l'intestin grêle mais peut, dans de rares cas, avoir une diffusion générale. La transmission se fait principalement par la voie féco-orale, toutefois une transmission par voie aérienne est possible notamment lors de vomissements. Après une période d'incubation de 2 à 3 jours, surviennent les diarrhées dont la quantité et l'aspect peuvent être variables. Des vomissements et des douleurs abdominales peuvent apparaître avec un épisode fébrile. L'excrétion fécale est estimée à  $10^{11}$  particules virales par gramme de selles. La dose infectieuse chez l'Homme a été déterminée à partir d'une étude de dose-réponse effectuée chez le singe, et elle est estimée à 1 particule infectieuse (Ward *et al.*, 1984; Ward *et al.*, 1986).

Les rotavirus sont la cause principale de gastro-entérites chez les jeunes enfants. On estime à 524 000 décès en 2004 chez les enfants de moins de 5 ans infectés par les rotavirus (WHO, 2011). En France, ils seraient responsables chaque année d'environ 300 000 épisodes de diarrhées aiguës chez les enfants de moins de 5 ans dont 160 000 diarrhées sévères avec en moyenne 13 à 14 décès annuels. Un tiers des hospitalisations pour des gastro-entérites virales aiguës sont dues aux rotavirus. Des pics épidémiques surviennent dans la période hivernale où le taux d'isolement de ces virus atteint jusqu'à 50% (DGS, 2006).

Dans les épidémies d'origine hydrique, ils sont beaucoup moins fréquemment incriminés que les norovirus mais ont pu être détectés par exemple lors d'épidémies survenues en France (InVS & CIRE SudOuest, 2000), en Turquie (Koroglu *et al.*, 2011), en Chine (Hung *et al.*, 1983) et aux Etats-Unis (Hopkins *et al.*, 1984).

### 2.3.3. Les astrovirus

Ces virus appartiennent à la famille des *Astroviridae* où ils sont les seuls membres. La capside virale est icosaédrique de 28 à 30 nm de diamètre qui renferme un génome constitué d'un ARN monocaténaire positif d'environ 6,8 kb. La taille et le nombre de protéines structurales de la capside semblent fonction des souches et des études: entre 2 et 5 protéines pour les souches animales et entre 3 et 4 protéines pour les souches humaines (Monroe *et al.*, 1991; Willcocks *et al.*, 1994). Huit sérotypes d'astrovirus humains ont pu être identifiés mais le sérotype 1 est le plus fréquemment isolé (Noel *et al.*, 1999).

Il semblerait que les astrovirus soient responsables de gastro-entérites chez les enfants, les personnes âgées et les personnes immunodéprimées mais seraient peu pathogènes pour l'adulte sain. La fréquence de détection des astrovirus dans les cas de gastro-entérites infantiles est de 2,5 à 9% en fonction des études. Des pics épidémiques apparaissent en hiver et les infections sont surtout d'origine communautaire ou nosocomiale (Lewis *et al.*, 1989; Oishi *et al.*, 1994; Belliot *et al.*, 1997; Silva *et al.*, 2001). Les signes cliniques tels que des diarrhées aqueuses, avec ou non des douleurs abdominales et des vomissements, apparaissent après 1 à 4 jours d'incubation. Cependant, l'excrétion virale pouvant précéder les symptômes, il existe de nombreux porteurs asymptomatiques qui peuvent véhiculer le virus. A ce jour la dose minimale infectieuse n'est pas encore connue.

### 2.3.4. Les adénovirus

Ces virus appartiennent à la famille des *Adenoviridae* qui comprend quatre genres divisés en deux groupes: les genres *Mastadenovirus* et *Aviadenovirus* dont les hôtes sont les mammifères ou les oiseaux et les genres *Atadenovirus* et *Siadenovirus* qui ont un large éventail d'hôtes (Davison *et al.*, 2003).

Les adénovirus humains (HadV) font partie du genre des *Mastadenovirus*. 51 sérotypes ont été décrits chez l'Homme, répartis en six sous-groupes nommés de A à F en fonction de leurs propriétés biologiques comme l'héماغlutination, leur homologie de génome ainsi que de leur teneur en bases nucléotidiques G+C. Les adénovirus sont des virus non enveloppés de 70 à 90 nm de diamètre. La capside est icosaédrique constituée de 3 protéines majeures qui sont l'hexon, le penton, la fibre et de nombreuses protéines mineures nommées VI, VIII, IX, IIIa et IVa2 (Russell, 2000) (Figure 10). Le génome viral est un ADN linéaire double brin de 35,9 kb qui code pour 45 protéines.

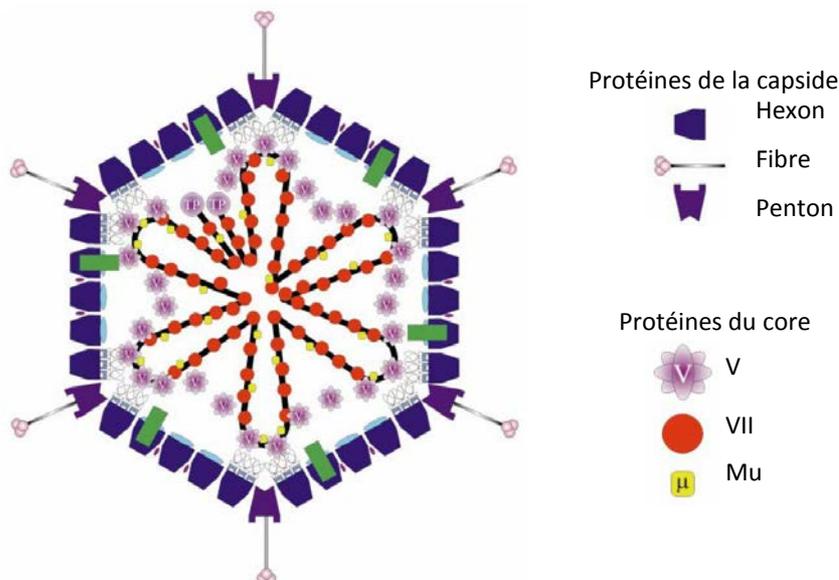


Figure 10: Représentation schématique de la structure des adénovirus (Russell, 2000)

Les infections causées par les adénovirus sont variées et les sites d'infection semblent fonction du sous-groupe (Tableau 13). Parmi tous les sérotypes responsables de troubles digestifs chez l'Homme, les sérotypes 40 et 41 sont les plus étudiés. Les signes cliniques observés sont des vomissements et des diarrhées qui surviennent après une période d'incubation de 8 à 10 jours et l'excrétion virale peut durer entre 5 et 12 jours. Les infections asymptomatiques étant fréquentes, il est parfois difficile d'incriminer les adénovirus dans les cas d'épidémies de gastro-entérites (Jiang, 2006). Cependant, on estime que les adénovirus sont responsables de 2 à 15% des gastro-entérites nécessitant une hospitalisation chez les jeunes enfants, et dans 2/3 des cas, ce sont les sérotypes 40 et 41 qui sont incriminés (Logan *et al.*, 2006; Meqdam et Thwiny, 2007). Ils présentent un pic épidémique dans la saison hivernale (Durepaire *et al.*, 1995). La dose infectieuse pour les adénovirus n'est pas connue.

Des épidémies d'origine hydrique impliquant des adénovirus entériques ou non ont été rapportées dans des eaux de piscine (Turner *et al.*, 1987; Papapetropoulou et Vantarakis, 1998), l'eau potable (Kukkula *et al.*, 1999; Divizia *et al.*, 2004; Nygård *et al.*, 2004).

Depuis quelques années, les adénovirus sont considérés comme des virus émergents en raison de leur fréquence de détection dans les milieux hydriques aussi bien dans les eaux environnementales que dans les eaux d'alimentation.

**Tableau 13: Sites d'infections des différents sérotypes des adénovirus (Jiang, 2006)**

Sous-groupes des adénovirus	Sérotypes	Site de l'infection
<b>A</b>	12, 18, 31	Tractus gastro-intestinal
<b>B</b>	3, 7, 11, 14, 16, 21, 34, 35, 50	Poumons, système urinaire
<b>C</b>	1, 2, 5, 6	Système respiratoire
<b>D</b>	8, 9, 10, 13, 15, 17, 19, 22, 23, 24, 26, 27, 30, 32, 33, 36, 37, 38, 39, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 51	Tractus gastro-intestinal, yeux
<b>E</b>	4	Système respiratoire
<b>F</b>	40, 41	Tractus gastro-intestinal

## 2.4. Contamination virale du milieu hydrique

### 2.4.1. Concentration des virus entériques dans l'eau

Après multiplication dans le tractus gastro-intestinal humain, ces pathogènes sont rejetés dans les eaux usées par excrétion fécale et peuvent se retrouver dans les eaux environnementales. L'Homme est alors le contamineur du milieu hydrique mais peut également être le récepteur final de ces agents pathogènes notamment lors de la consommation d'eau contaminée (Figure 11).

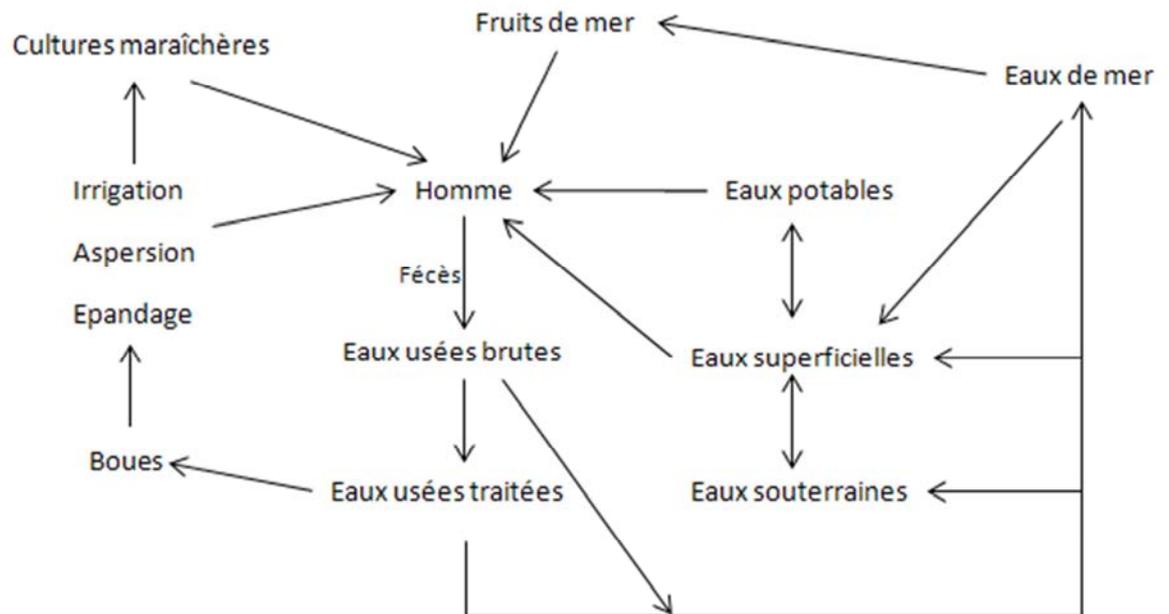


Figure 11: Cycle de contamination virale du milieu hydrique (Schwartzbrod et Bosch, 1991)

On estime que 80 à 90% des eaux usées brutes contiennent des virus entériques à des concentrations comprises entre  $10^2$  à  $10^3$  particules virales/L (Schwartzbrod, 2000). Les quantités peuvent être extrêmement variables notamment en fonction de nombreux paramètres, tels que les facteurs géographiques, socio-économiques, saisonniers, ou encore la proportion d'enfants. Ainsi, plus le niveau sanitaire d'un pays est faible et plus la proportion d'enfants est grande, plus les quantités de virus entériques mesurées dans les eaux usées sont importantes. En l'absence de station d'épuration, les eaux sont rejetées directement dans le milieu naturel, ce qui peut engendrer de fortes concentrations virales dans l'environnement.

Le Tableau 14 rend compte du niveau de contamination de quelques eaux de surface par les virus entériques dans différents pays. En fonction des études une grande variabilité est constatée. A titre d'exemple, le pourcentage d'échantillons positifs varie de 16 à 100% pour les adénovirus, de 11,1 à 58% pour les norovirus et de 0 à 76% pour le virus de l'hépatite A.

Tableau 14: Niveau de contamination des eaux de surface par les virus entériques

Pays	Nature de l'échantillon	Méthode d'analyse	Résultats	Référence
France	Eau de surface	Filtration 1 L sur membrane en nylon PCR	Virus entériques: 58,3% (28/48) adénovirus majoritaire suivi des norovirus et rotavirus	Cavereau <i>et al.</i> (2009)
France	Eau de rivière	Filtration 10 L sur laine de verre Floculation organique PCR	adénovirus humains: 100% (3,13 ± 0,47 log <sub>10</sub> génomes/100 mL)	Ogorzaly <i>et al.</i> (2009)
France	Eaux de rivière	Filtration 20 L sur laine de verre Précipitation au PEG RT-PCR Culture cellulaire sur cellules BGMK	Entérovirus: 88,2% (60/68) par PCR Autres virus entériques à ARN: 5,9% (4/68) Entérovirus infectieux: 2,9% (2/68) (6 à 33 NPPUC/L)	Hot <i>et al.</i> (2003)
Espagne	Eau de rivière	Filtration 50 L sur membrane Zetaplus Ultracentrifugation PCR ou RT-PCR	Adénovirus humains: 65% (15/23) Hépatite A: 43% (10/23) Entérovirus: 22% (5/23)	Pina <i>et al.</i> (1998)
Etats-Unis	Eaux de surface	Filtration sur membrane 1-MDS ICC-PCR sur cellules BGMK	Virus entériques infectieux: 65,5% (19/29) Adénovirus 40-41 infectieux: 37,9% (11-29) Astrovirus infectieux: 27,5% (8/29) Entérovirus infectieux: 20,6% (6/29)	Chapron <i>et al.</i> (2000)
Etats-Unis	Eaux de rivière	Filtration tangentielle PCR culture cellulaire sur cellules A549 et HEK293	Adénovirus: 16% (1 x 10 <sup>2</sup> à 1 x 10 <sup>4</sup> génomes/L) par PCR Adénovirus infectieux: 0% Entérovirus: 7% par RT-PCR	Choi et Jiang (2005)
Etats-Unis	Eau rivière	Filtration 1500 L sur membrane 1-MDS avec pré-filtre Floculation organique RT-PCR	Virus entériques: 83,3% (10/12) Rotavirus: 66,7% (8/12) Entérovirus: 41,7% (5/12) Norovirus: 8,3% (1/12) Hépatite A: 0% (0/12)	Borchardt <i>et al.</i> (2004)
Etats-Unis	Eaux de rivière	Ultrafiltration ou VFF PCR	Hépatite A: 76% (16/21) Entérovirus: 62% (13/21) Adénovirus humains: 52% (11/21)	Jiang et Chu (2004)
Japon	Eau de rivière	Filtration 500 mL sur membrane HA prétraitée à AICl <sub>3</sub> Ultracentrifugation PCR	Norovirus: 58% (37/64) (0,087 à 0,61 génomes/mL) Adénovirus humains: 45% (29/64) Entérovirus: 9% (6/64)	Haramoto <i>et al.</i> (2005)
Japon	Eau de rivière	Filtration 500 mL sur membrane HA prétraitée à AICl <sub>3</sub> Ultracentrifugation PCR	Adénovirus humains: 81% (29/36) Adénovirus 40-41: 81% (29/36)	Haramoto <i>et al.</i> (2007)

Pays	Nature de l'échantillon	Méthode d'analyse	Résultats	Référence
Afrique du Sud	Eau de rivière	Filtration 25 L sur laine de verre	Adénovirus humains: 20 à 22% (9-10/45)	Van Heerden <i>et al.</i> (2005)
		Précipitation au PEG PCR	Présence d'adénovirus 40, 41, 2 et D	
Ghana	Eau de surface	Ultrafiltration de 100 L	Adénovirus humains: 22,2% (1/9)	Gibson <i>et al.</i> (2011)
		Ultracentrifugation	Norovirus: 11,1% (1/9)	
		PCR ou RT-PCR	Entérovirus: 0% (0/9)	
			Polyomavirus: 0% (0/9)	
			Hépatite E: 0% (0/9)	

Bien qu'elles soient considérées comme protégées des contaminations d'origine fécale, les eaux souterraines peuvent être contaminées par les eaux de surface (Kukkula *et al.*, 1997; Borchardt *et al.*, 2003; Nygård *et al.*, 2004), notamment en fonction de leur type. Ainsi les nappes alluviales, qui se trouvent à proximité des cours d'eau, ou les nappes karstiques, que l'on rencontre dans des zones où la roche calcaire prédomine, sont des ressources en connexion hydraulique avec le cours d'eau ce qui implique que la qualité microbiologique et physico-chimique de ces ressources dépend de celle de la rivière. Au contraire, les nappes captives, ou encore appelées nappes profondes, isolées de la surface du sol par une formation géologique imperméable, sont relativement protégées d'une éventuelle pollution. D'une manière générale, il faut noter que les concentrations mesurées dans les échantillons positifs sont plus faibles que dans les eaux de surface du fait d'une épuration naturelle (Tableau 15).

Dans les eaux d'alimentation, la détection des virus est plus rare et les concentrations mesurées dans les échantillons positifs sont faibles. Peu d'études rendent compte de la contamination virale des eaux potables en dehors des épidémies d'origine hydrique. Le Tableau 16 présente les résultats des rares études de contamination des eaux potables, en dehors des épidémies d'origine hydrique.

Tableau 15: Présence des virus entériques dans les eaux souterraines

Pays	Nature de l'échantillon	Méthode d'analyse	Résultats	Référence
France	Eau de nappe alluviale	Filtration 1 L sur membrane en nylon PCR ou RT-PCR	Virus entériques: 23,1% (25/108) Adénovirus majoritaire suivi de Norovirus et Rotavirus	Cavereau <i>et al.</i> (2009)
Etats-Unis	Eau de puit	Filtration 1500 L sur membrane 1-MDS Floculation organique RT-PCR Culture cellulaire sur cellules BGМК et Caco-2	Virus entériques: 2,6% (5/194) Hépatite A: 1,54% (3/194) Entérovirus: 0,5% (1/194) Rotavirus: 0,5% (1/194) Norovirus: 0,5% (1/194) Virus infectieux: 0%	Borchardt <i>et al.</i> (2003)
Etats-Unis	Eau de puit	Filtration 1500 L sur membrane 1-MDS Floculation organique PCR ou RT-PCR Culture cellulaire sur cellules BGМК et Caco-2 (Hépatite A et Entérovirus)	Virus entériques: 50% (24/48) Entérovirus: 41,7% (20/48) Rotavirus: 20,8% (10/48) Hépatite A: 8,3% (4/48) Norovirus: 4,2% (2/48) Entérovirus infectieux: 0% Hépatite A infectieux: 75%	Borchardt <i>et al.</i> (2004)
Etats-Unis	Eau de puit	Filtration sur membrane 1-MDS Ultracentrifugation RT-PCR	Virus entériques: 16% (50/321) Réovirus: 10% (33/321) Entérovirus: 5% (15/321) Norovirus: 3% (9/321) Hépatite A: 1% (4/321) Rotavirus: 0% (0/321)	Fout <i>et al.</i> (2003)
Etats-Unis	Eau de puit	Filtration 1512 L sur membrane 1-MDS Floculation organique RT-PCR Culture cellulaire sur cellules BGM (Entérovirus)	Entérovirus: 26,7% (40/150) Hépatite A: 8% (12/150) Rotavirus: 5,3% (8/150) Entérovirus infectieux: 8,7% (13/150)	Abbaszadegan <i>et al.</i> (1999)

Pays	Nature de l'échantillon	Méthode d'analyse	Résultats	Référence
<b>Etats-Unis</b>	Eau de puit	Filtration de 1448 L en moyenne (844 à 1889L) sur membrane 1-MDS Précipitation au PEG RT-PCR	Entérovirus: 23% (7/30) Rotavirus: 0% (0/30) Hépatite A: 0% (0/30) Norovirus: 0% (0/30)	Borchardt <i>et al.</i> (2007)
<b>Corée</b>	Eaux souterraines	Filtration 1500 L sur membrane 1-MDS Floculation organique RT-PCR pour Norovirus, Astrovirus et Sapovirus ELISA pour Adénovirus et Rotavirus	Rotavirus: 4,8% (3/62) Adénovirus: 3,2% (2/62) Norovirus: 3,2% (2/62) Sapovirus: 0% (0/62) Astrovirus: 0% (0/62)	Park <i>et al.</i> (2010)
<b>Ghana</b>	Eau souterraine	Ultrafiltration de 100 L Ultracentrifugation PCR ou RT-PCR	Adénovirus humains: 16,7% (1/6) Entérovirus: 0% (0/6) Norovirus: 0% (0/6) Polyomavirus: 0% (0/6) Hépatite E: 0% (0/6)	Gibson <i>et al.</i> (2011)

Tableau 16: Présence et concentration des virus entériques dans les eaux potables

Pays	Nature de l'échantillon	Méthode d'analyse	Résultats	Référence
Etats-Unis	Eaux du robinet	Filtration 9,8 à 756 L sur membrane 1-MDS Floculation organique Culture cellulaire sur cellules BGМК	Virus entériques: 89% (19/23)	Keswick <i>et al.</i> , (1984)
Nouvelle-Zélande	Eau traitée	Filtration 200 L sur filtre polysulfone Haemiflow Précipitation PEG Nested PCR ICC-Nested PCR sur cellules A549 PCR en temps réel	Adénovirus - 27% (3/11) par nested-PCR - 36% (4/11) par ICC-Nested PCR - 18% (2/11) par PCR en temps réel	Dong <i>et al.</i> , (2010)
Chine	Eau traitée	Filtration 2 L par ultrafiltration tangentielle Centriprep 100 RT-PCR	Rotavirus: 22,4% (32/143)	He <i>et al.</i> , (2009)
Chine	Eau du robinet	Filtration 2 L par ultrafiltration tangentielle Centriprep 100 RT-PCR	Rotavirus: 11,7% (9/77)	He <i>et al.</i> , (2009)
Corée du Sud	Eaux du robinet	Filtration de 1000 L à 3000 L sur membrane 1-MDS Précipitation au PEG ICC-PCR ou ICC-RT-PCR sur cellules BGМК	- Entérovirus infectieux: 47,8% (11/23) - Adénovirus infectieux: 39,1% (9/23) - Adénovirus + Entérovirus infectieux: 21,7% (5/23)	Lee et Kim (2002)
Corée du Sud	Eau du robinet	Filtration 1000-3000 L sur membrane 1-MDS Précipitation au PEG Culture cellulaire sur cellules BGМК ICC-nested PCR multiplex	Adénovirus-Entérovirus - 46% (23/50) par culture cellulaire - 58% (29/59) par ICC nested PCR multiplex (1,2 à 28,9 NPPUC/1000L) Adénovirus: - 16% (8/50) par culture cellulaire - 28% (14/59) par ICC nested PCR multiplex Entérovirus: - 16% (8/50) par culture cellulaire - 16% (8/59) par ICC nested PCR multiplex	Lee <i>et al.</i> , (2005)

Pays	Nature de l'échantillon	Méthode d'analyse	Résultats	Référence
Afrique du Sud	Eau traitée	Filtration 100-1000 L sur laine de verre Précipitation du PEG ICC-nested PCR sur cellules PLC/PLF5 et CaCo-2	Adénovirus: 29,8% (59/198)	Van Heerden <i>et al.</i> , (2004)
Afrique du Sud	Eau potable	Filtration 200 L sur laine de verre Précipitation au PEG PCR	- Adénovirus humains: 3,7 à 5,3% (7-10/188) - Présence d'adénovirus 40, 41, 2 et D	Van Heerden <i>et al.</i> (2005)
Afrique du Sud	Eau traitée	Filtration 100-1000 L sur laine de verre ICC-PCR sur cellules BGMK, PLC/PLF5 et CaCo-2	- Adénovirus: 4% (16/413) - Entérovirus: 17% (70/413) - Hépatite A: 3% (12/413)	Grabow <i>et al.</i> , (2001)
Ghana	Eau potable	Ultrafiltration de 100 L Ultracentrifugation PCR ou RT-PCR	- Norovirus: 25% (1/4) - Polyomavirus: 25% (1/4) - Entérovirus: 0% (0/4) - Adénovirus humains: 0% (0/4) - Hépatite E: 0% (0/4)	Gibson <i>et al.</i> (2011)

#### 2.4.2. Virus entériques et indicateurs de contamination fécale

De nombreux critères sont indispensables à réunir pour qu'un indicateur (quel qu'il soit) soit représentatif d'une contamination virale: (i) ne pas se multiplier dans l'environnement, (ii) être au moins aussi résistant aux traitements de désinfection et aux conditions environnementales, (iii) être détectable et quantifiable à faible coût, (iv) être distribué de manière aléatoire dans l'échantillon à analyser, (v) être fortement corrélé à la présence des virus (Armon et Kott, 1996).

Depuis plus d'un siècle, ce sont les indicateurs bactériens qui sont employés pour estimer la contamination microbiologique d'une eau, qu'elle soit bactérienne, parasitaire ou virale. Ces indicateurs sont principalement *E. coli*, les coliformes totaux, fécaux et thermotolérants, Entérocoques, *Clostridium perfringens*. Bien qu'il ait été démontré que la présence de bactéries indicatrices traduit un risque de contamination pour l'Homme, l'absence de ces bactéries n'implique pas forcément l'absence de virus dans le milieu. Ainsi de nombreuses études ont mis en évidence d'une part l'absence de corrélation entre la présence des indicateurs bactériens et celle des virus pathogènes (Borchardt *et al.*, 2004; Hörman *et al.*, 2004), et d'autre part, une plus grande résistance des virus face aux traitements de désinfection et aux conditions environnementales (Payment *et al.*, 1985; Wait et Sobsey, 2001).

Les bactéries indicatrices de contamination fécale étant considérées comme de médiocres indicateurs de contamination virale, les scientifiques se sont alors intéressés à des modèles de virus. Parmi eux, les bactériophages tels que les coliphages somatiques, les bactériophages ARN F-spécifiques et les bactériophages de *Bacteroides fragilis*. L'intérêt de ces virus comme indicateurs de pollution virale a été largement étudié ces dernières années et nombre de ces études mettent en évidence des corrélations entre la concentration en bactériophages et celles des virus (Simkova et Cervenka, 1981; Havelaar *et al.*, 1993; Gantzer *et al.*, 1998a), ou avec les indicateurs bactériens (Beaudeau et Bertin, 1999; Sundram *et al.*, 2002; Hörman *et al.*, 2004). A l'inverse, certains scientifiques mettent en doute l'intérêt de ces virus en tant qu'indicateurs de contamination fécale soit en raison d'un manque de corrélation avec les virus pathogènes (Vilagines *et al.*, 1997; Jiang *et al.*, 2001; Borchardt *et al.*, 2004), soit en raison d'une possible capacité de multiplication dans l'environnement, notamment pour les coliphages somatiques (Havelaar, 1993).

Certains auteurs ont proposé l'utilisation de virus pathogènes comme indicateurs de pollution virale (Sellwood *et al.*, 1981). Le premier virus proposé pour remplir cette fonction a été l'entérovirus de par sa facilité à être cultivé et quantifié sur des systèmes cellulaires, mais il a été ensuite suggéré d'inclure l'adénovirus. En effet, comparés aux entérovirus, les adénovirus ont l'avantage d'être plus présents (Pina *et al.*, 1998; Haramoto *et al.*, 2005; Gibson *et al.*, 2011) et plus résistants dans les milieux hydriques (Enriquez *et al.*, 1995; Thurston-Enriquez *et al.*, 2003). En outre, la méthode de détection par biologie moléculaire est plus simple du fait de l'absence d'une étape de rétro-transcription. Toutefois, la recherche de virus pathogènes comme indicateurs de contamination présente également des inconvénients tels que la nécessité de réaliser une étape de concentration pour pouvoir les détecter dans l'eau, ou encore la fluctuation de leur concentration dans le milieu hydrique liée au caractère saisonnier des maladies virales à transmission hydrique (Tani *et al.*, 1995; Jiang *et al.*, 2007).

## 2.5. Persistance des virus pathogènes pour l'Homme dans l'eau

### 2.5.1. Survie des virus entériques dans les conditions environnementales

Les virus entériques ne se multipliant que dans le tractus intestinal d'un hôte, une fois excrétés dans l'environnement, leur concentration ne peut que rester stable ou diminuer au cours du temps. De nombreux paramètres peuvent influencer sur la survie des virus (Tableau 17) et plus particulièrement sur le génome ou la capsid virale. Si l'un des deux constituants est altéré, il en résulte une inactivation virale et le virus est incapable d'infecter les cellules intestinales de l'hôte en cas d'ingestion. Ainsi, il est possible de détecter des particules virales dont la capsid est altérée alors que le génome est resté intact et inversement.

Certains facteurs environnementaux comme la lumière, la salinité, les températures élevées, peuvent favoriser l'inactivation virale alors que d'autres, comme les phénomènes d'aggrégation/adsorption, la présence de matière organique ou la formation de biofilm peuvent les protéger.

Tableau 17: Facteurs influençant la persistance des virus dans l'environnement (Bosch *et al.*, 2006)

Facteurs	Effets
Température	Inactivation positivement corrélée à la température
Lumière	Germicide notamment les rayonnements ultra-violet
Aggrégation/adsorption	Protection à l'inactivation
Pression	Pression haute induit une inactivation
pH	Survie plus faible à pH extrêmes
Salinité	Virucide à de fortes concentrations
Matière organique	Protection à l'inactivation par adsorption
Activité microbienne	Contribution à l'inactivation
Biofilms	Protection à l'inactivation quand adsorption aux biofilms
Type de virus	Inactivation en fonction du virus et de la souche

### 2.5.1.1. La température

Parmi tous les facteurs présentés dans le Tableau 17, la température est probablement le facteur reconnu comme ayant le plus d'influence sur la persistance des virus dans l'eau. L'effet de la température sur la persistance virale dans l'eau peut induire plusieurs mécanismes qui peuvent être la dénaturation des acides nucléiques ou des protéines virales, ou une réaction enzymatique qui aura pour conséquence la dégradation de la capsid virale (Dimmock, 1967).

L'influence de la température sur la persistance des virus entériques a été largement étudiée. Le Tableau 18 présente quelques valeurs de  $T_{90}$  et  $T_{99}$  pour différents virus en fonction de la température et la matrice hydrique. Les valeurs de  $T_{90}$  ou  $T_{99}$  correspondent au temps nécessaire pour observer une inactivation respective de 90% ( $1 \log_{10}$ ) ou 99% ( $2 \log_{10}$ ) de la suspension virale initiale.

Quel que soit le virus étudié, l'inactivation virale est plus rapide lorsque la température est élevée aussi bien dans les eaux souterraines (Yates *et al.*, 1985; Nasser *et al.*, 1993b; Gordon et Toze, 2003; Ogorzaly *et al.*, 2010; Rigotto *et al.*, 2011), que dans les eaux de surface (Noble *et al.*, 2004), dans l'eau de mer (Enriquez *et al.*, 1995; Gantzer *et al.*, 1998a; Noble *et al.*, 2004) ou encore dans l'eau d'alimentation (Enriquez *et al.*, 1995; Gassilloud *et al.*, 2003). A titre d'exemple, Enriquez *et al.* (1995), dans une étude de comparaison de persistance de l'adénovirus 41, du poliovirus et du virus de l'hépatite A, observent un  $T_{99}$  respectif de 304 jours, 56 jours et 41 jours dans l'eau de réseau à 4°C. A 23°C, dans les mêmes conditions, ces valeurs sont respectivement de 84 jours, 27 jours et 11 jours.

Des facteurs tels que le pH, la présence de sels ou de la flore bactérienne affectent la survie des virus dans l'eau. Ainsi, les virus survivent plus longtemps dans l'eau douce ou l'eau d'alimentation que dans l'eau de mer (Girones *et al.*, 1989; Enriquez *et al.*, 1995), en l'absence de microflore (Gordon et Toze, 2003).

Tableau 18: Persistance du pouvoir infectieux de quelques virus en fonction de la température et de la nature de la matrice hydrique

Virus	Température (°C)	Matrice hydrique	T <sub>90</sub> -T <sub>99</sub> (jours) ou Inactivation (log <sub>10</sub> )	Référence
Adénovirus 2	4	Eau souterraine	T <sub>90</sub> :131,6	Ogorzaly <i>et al.</i> (2010)
Adénovirus 2	19	Eau souterraine	T <sub>90</sub> :161	Rigotto <i>et al.</i> (2011)
Adénovirus 2	20	Eau souterraine	T <sub>90</sub> :35,6	Ogorzaly <i>et al.</i> (2010)
Adénovirus 40	4	Eau du robinet	T <sub>99</sub> : 92	Enriquez <i>et al.</i> (1995)
Adénovirus 40	15	Eau du robinet	T <sub>99</sub> : 87	Enriquez <i>et al.</i> (1995)
Adénovirus 40	15	Eau de mer	T <sub>99</sub> : 77	Enriquez <i>et al.</i> (1995)
Adénovirus 40	23	Eau du robinet	T <sub>99</sub> : 60	Enriquez <i>et al.</i> (1995)
Adénovirus 41	4	Eau du robinet	T <sub>99</sub> : 304	Enriquez <i>et al.</i> (1995)
Adénovirus 41	15	Eau du robinet	T <sub>99</sub> : 124	Enriquez <i>et al.</i> (1995)
Adénovirus 41	15	Eau de mer	T <sub>99</sub> : 85	Enriquez <i>et al.</i> (1995)
Adénovirus 41	19	Eau souterraine	T <sub>90</sub> :161	Rigotto <i>et al.</i> (2011)
Adénovirus 41	19	Eau de rivière	T <sub>90</sub> :161	Rigotto <i>et al.</i> (2011)
Adénovirus 41	23	Eau du robinet	T <sub>99</sub> : 84	Enriquez <i>et al.</i> (1995)
Astrovirus	15	Eau souterraine	T <sub>99</sub> :30	Espinosa <i>et al.</i> (2008)
Bactériophage GA	4	Eau souterraine	T <sub>90</sub> :19,9	Ogorzaly <i>et al.</i> (2010)
Bactériophage GA	20	Eau souterraine	T <sub>90</sub> :1,2	Ogorzaly <i>et al.</i> (2010)
Bactériophage MS2	4	Eau souterraine	0,012 log <sub>10</sub> à 0,064 log <sub>10</sub> /jours	Yates <i>et al.</i> (1985)
Bactériophage MS2	4	Eau souterraine	T <sub>90</sub> :23,4	Ogorzaly <i>et al.</i> (2010)
Bactériophage MS2	12	Eau souterraine	0,03 log <sub>10</sub> à 0,162 log <sub>10</sub> /jours	Yates <i>et al.</i> (1985)
Bactériophage MS2	20	Eau souterraine	T <sub>90</sub> :1,4	Ogorzaly <i>et al.</i> (2010)
Bactériophage MS2	23	Eau souterraine	0,187 log <sub>10</sub> à 0,578 log <sub>10</sub> /jours	Yates <i>et al.</i> (1985)
Coliphages somatiques	4	Eau de rivière	T <sub>90</sub> :20	Skraber (2003)
Coliphages somatiques	4	Eau de rivière	T <sub>90</sub> :26	Skraber (2003)
Coliphages somatiques	18	Eau de rivière	T <sub>90</sub> :7,2	Skraber (2003)
Coliphages somatiques	18	Eau de rivière	T <sub>90</sub> :6,8	Skraber (2003)
Coliphages somatiques	25	Eau de rivière	T <sub>90</sub> :4	Skraber (2003)
Coliphages somatiques	25	Eau de rivière	T <sub>90</sub> :4,2	Skraber (2003)
Coxsackievirus B1	15	Eau souterraine filtrée	T <sub>90</sub> :528	Gordon et Toze (2003)
Coxsackievirus B1	15	Eau souterraine	T <sub>90</sub> :10,5-165,8	Gordon et Toze (2003)
Coxsackievirus B1	28	Eau souterraine	T <sub>90</sub> :10,2	Gordon et Toze (2003)
Coxsackievirus B1	28	Eau souterraine filtrée	T <sub>90</sub> :109,4	Gordon et Toze (2003)
Coxsackievirus B3	25	PBS, pH 7.2	T <sub>90</sub> : 15	Gantzer <i>et al.</i> (1998b)
Echovirus 1	12	Eau souterraine	0,051 log <sub>10</sub> à 0,186 log <sub>10</sub> /jours	Yates <i>et al.</i> (1985)
Echovirus 1	23	Eau souterraine	0,188 log <sub>10</sub> à 0,628 log <sub>10</sub> /jours	Yates <i>et al.</i> (1985)
Feline Calicivirus f9	10	Eau minérale + MO	T <sub>90</sub> :11,5	Gassilloud (2003)
Feline Calicivirus f9	20	Eau minérale + MO	T <sub>90</sub> :1,1	Gassilloud (2003)
Feline Calicivirus f9	30	Eau minérale + MO	T:0,7	Gassilloud (2003)
Hépatite A	4	Eau du robinet	T <sub>99</sub> : 56	Enriquez <i>et al.</i> (1995)
Hépatite A	10	PBS, pH 7.2	0 log <sub>10</sub> en 30 jours	Nasser <i>et al.</i> (1993a)
Hépatite A	10	Eau souterraine	1,3 log <sub>10</sub> en 30 jours	Nasser <i>et al.</i> (1993b)
Hépatite A	20	PBS, pH 7.2	1,2 log <sub>10</sub> en 30 jours	Nasser <i>et al.</i> (1993a)
Hépatite A	20	Eau souterraine	0 log <sub>10</sub> en 30 jours	Nasser <i>et al.</i> (1993b)

Virus	Température (°C)	Matrice hydrique	T <sub>90</sub> -T <sub>99</sub> (jours) ou Inactivation (log <sub>10</sub> )	Référence
Hépatite A	23	Eau du robinet	T <sub>99</sub> : 27	Enriquez <i>et al.</i> (1995)
Hépatite A	25	Eau de mer artificielle	T <sub>90</sub> : 9	Arnal <i>et al.</i> (1998)
Hépatite A	30	PBS, pH 7.2	2,8 log <sub>10</sub> en 30 jours	Nasser <i>et al.</i> (1993a)
Hépatite A	30	Eau souterraine	0,7 log <sub>10</sub> en 30 jours	Nasser <i>et al.</i> (1993b)
Poliovirus 1	4	Eau du robinet	T <sub>99</sub> : 41	Enriquez <i>et al.</i> (1995)
Poliovirus 1	4	Eau de rivière	T <sub>90</sub> :3,6	Skraber (2003)
Poliovirus 1	4	Eau de rivière	T <sub>90</sub> :6,2	Skraber (2003)
Poliovirus 1	10	PBS, pH 7.2	0,2 log <sub>10</sub> en 30 jours	Nasser <i>et al.</i> (1993a)
Poliovirus 1	10	Eau minérale + MO	T <sub>90</sub> :345	Gassilloud (2003)
Poliovirus 1	10	Eau souterraine	0 log <sub>10</sub> en 30 jours	Nasser <i>et al.</i> (1993b)
Poliovirus 1	12	Eau souterraine	0,035 log <sub>10</sub> à 0,138 log <sub>10</sub> /jours	Yates <i>et al.</i> (1985)
Poliovirus 1	15	Eau du robinet	T <sub>99</sub> : 24	Enriquez <i>et al.</i> (1995)
Poliovirus 1	15	Eau souterraine filtrée	T <sub>90</sub> :NS	Gordon et Toze (2003)
Poliovirus 1	15	Eau souterraine	T <sub>90</sub> :5-10	Gordon et Toze (2003)
Poliovirus 1	15	Eau de mer	T <sub>99</sub> : 18	Enriquez <i>et al.</i> (1995)
Poliovirus 1	18	Eau de rivière	T <sub>90</sub> :0,6	Skraber (2003)
Poliovirus 1	18	Eau de rivière	T <sub>90</sub> :3,4	Skraber (2003)
Poliovirus 1	20	PBS, pH 7.2	T <sub>90</sub> :34,3	Gassilloud (2003)
Poliovirus 1	20	PBS, pH 7.2	0 log <sub>10</sub> en 30 jours	Nasser <i>et al.</i> (1993a)
Poliovirus 1	20	Eau minérale + MO	T <sub>90</sub> :54,3	Gassilloud (2003)
Poliovirus 1	20	Eau souterraine	0,5 log <sub>10</sub> en 30 jours	Nasser <i>et al.</i> (1993b)
Poliovirus 1	23	Eau du robinet	T <sub>99</sub> : 11	Enriquez <i>et al.</i> (1995)
Poliovirus 1	23	Eau souterraine	0,357 log <sub>10</sub> à 0,676 log <sub>10</sub> /jours	Yates <i>et al.</i> (1985)
Poliovirus 1	25	Eau de rivière	T <sub>90</sub> :0,5	Skraber (2003)
Poliovirus 1	25	Eau de rivière	T <sub>90</sub> :1	Skraber (2003)
Poliovirus 1	28	Eau souterraine filtrée	T <sub>90</sub> :164,8	Gordon et Toze (2003)
Poliovirus 1	28	Eau souterraine	T <sub>90</sub> :1-29	Gordon et Toze (2003)
Poliovirus 1	30	PBS, pH 7.2	1,7 log <sub>10</sub> en 30 jours	Nasser <i>et al.</i> (1993a)
Poliovirus 1	30	Eau minérale + MO	T <sub>90</sub> :4,7	Gassilloud (2003)
Poliovirus 1	30	Eau souterraine	1,5 log <sub>10</sub> en 30 jours	Nasser <i>et al.</i> (1993b)
Rotavirus	15	Eau souterraine	T <sub>99</sub> :90	Espinosa <i>et al.</i> (2008)
Rotavirus	20	Eau de mer artificielle	T <sub>90</sub> : 11	Dubois (1995)

MO: Matière Organique

Par ailleurs, de nombreuses études se sont intéressées à l'inactivation du virus infectieux comparativement à la dégradation de son génome, et la plupart d'entre elles s'accordent à dire que le génome persiste plus longtemps que la particule virale qui lui est associée (Gantzer *et al.*, 1998b; Gassilloud, 2003; Skraber, 2003; Espinosa *et al.*, 2008; de Roda Husman *et al.*, 2009 ; Ogorzaly *et al.*, 2010) (Tableau 19). Ainsi, Gassilloud *et al.* (2003) observent un abattement de 4 log<sub>10</sub> de l'infectiosité du Poliovirus 1 après 19 jours d'incubation dans une eau minérale à 35°C, alors que celui du génome n'est que de 2 log<sub>10</sub> au bout de 140 jours, dans les mêmes conditions expérimentales. Dans une eau souterraine à 4°C, Ogorzaly *et al.* (2010) étudient la persistance de l'adénovirus 2 infectieux et de son génome viral et obtiennent des valeurs respectives de T<sub>90</sub> de 131,6 jours et de plus de 400 jours.

**Tableau 19: Inactivation des particules infectieuses et dégradation du génome viral de quelques virus en fonction du milieu hydrique et de la température d'incubation**

Virus	Matrice	Température (°C)	Inactivation du pouvoir infectieux	Dégradation du génome	Référence
<b>Adénovirus 1</b>	Eau souterraine	4	T <sub>90</sub> =131,6 jours	NS	Ogorzaly <i>et al.</i> (2010)
<b>Adénovirus 1</b>	Eau souterraine	20	T <sub>90</sub> =35,6 jours	T <sub>90</sub> =278 jours	Ogorzaly <i>et al.</i> (2010)
<b>Coxsackievirus B3</b>	PBS, pH 7,2	15	T <sub>90</sub> =15 jours	T <sub>90</sub> =30-47 jours	Gantzer <i>et al.</i> (1998b)
<b>Coxsackievirus B4</b>	Eau souterraine artificielle	4	0,0081 log <sub>10</sub> /jours	0 log <sub>10</sub> /jours	de Roda Husman <i>et al.</i> (2009)
<b>Coxsackievirus B4</b>	Eau souterraine artificielle	22	0,068 log <sub>10</sub> /jours	0,037 log <sub>10</sub> /jours	de Roda Husman <i>et al.</i> (2009)
<b>Coxsackievirus B4</b>	Eau de surface artificielle	4	0,01 log <sub>10</sub> /jours	0 log <sub>10</sub> /jours	de Roda Husman <i>et al.</i> (2009)
<b>Coxsackievirus B4</b>	Eau de surface artificielle	22	0,05 log <sub>10</sub> /jours	0,005 log <sub>10</sub> /jours	de Roda Husman <i>et al.</i> (2009)
<b>Poliovirus 1</b>	Eau minérale +MO		1 log <sub>10</sub> en 49 jours	0,3 log <sub>10</sub> en 90 jours	Gassilloud (2003)
<b>Poliovirus</b>	Eau souterraine	4	0,02 ± 0,06 log <sub>10</sub> /jours	0,02 ± 0,05 log <sub>10</sub> /jours	Bae et Schwab (2008)
<b>Poliovirus 1</b>	Eau souterraine	25	2,4 log <sub>10</sub> en 49 jours	1 log <sub>10</sub> en 60 jours	Sobsey <i>et al.</i> (1998)
<b>Poliovirus</b>	Eau souterraine	25	0,09 ± 0,07 log <sub>10</sub> /jours	0,05 ± 0,05 log <sub>10</sub> /jours	Bae et Schwab (2008)
<b>Poliovirus 1</b>	Eau souterraine artificielle	4	0,0072 log <sub>10</sub> /jours	0 log <sub>10</sub> /jours	de Roda Husman <i>et al.</i> (2009)
<b>Poliovirus 1</b>	Eau souterraine artificielle	22	0,026 log <sub>10</sub> /jours	0 log <sub>10</sub> /jours	de Roda Husman <i>et al.</i> (2009)
<b>Poliovirus 2</b>	Eau souterraine artificielle	4	0,0072 log <sub>10</sub> /jours	0 log <sub>10</sub> /jours	de Roda Husman <i>et al.</i> (2009)
<b>Poliovirus 2</b>	Eau souterraine artificielle	22	0,051 log <sub>10</sub> /jours	0,0065 log <sub>10</sub> /jours	de Roda Husman <i>et al.</i> (2009)
<b>Poliovirus 1</b>	Eau de rivière	4	T <sub>90</sub> =6,2	T <sub>90</sub> =13	Skraber (2003)
<b>Poliovirus 1</b>	Eau de rivière	4	T <sub>90</sub> =3,6	T <sub>90</sub> =4,3	Skraber (2003)
<b>Poliovirus 1</b>	Eau de rivière	18	T <sub>90</sub> =3,4	T <sub>90</sub> =5,8	Skraber (2003)
<b>Poliovirus 1</b>	Eau de rivière	18	T <sub>90</sub> =0,6	T <sub>90</sub> =1,1	Skraber (2003)
<b>Poliovirus 1</b>	Eau de rivière	25	T <sub>90</sub> =1	T <sub>90</sub> =2,5	Skraber (2003)
<b>Poliovirus 1</b>	Eau de rivière	25	T <sub>90</sub> =0,5	T <sub>90</sub> =0,8	Skraber (2003)
<b>Poliovirus</b>	Eau de surface	4	0,14 ± 0,02 log <sub>10</sub> /jours	0,1 ± 0,02 log <sub>10</sub> /jours	Bae et Schwab (2008)
<b>Poliovirus</b>	Eau de surface	25	0,19 ± 0,03 log <sub>10</sub> /jours	0,14 ± 0,02 log <sub>10</sub> /jours	Bae et Schwab (2008)
<b>Poliovirus 1</b>	Eau de surface artificielle	4	0,0054 log <sub>10</sub> /jours	0 log <sub>10</sub> /jours	de Roda Husman <i>et al.</i> (2009)
<b>Poliovirus 1</b>	Eau de surface artificielle	22	0,028 log <sub>10</sub> /jours	0 log <sub>10</sub> /jours	de Roda Husman <i>et al.</i> (2009)
<b>Poliovirus 2</b>	Eau de surface artificielle	4	0,003 log <sub>10</sub> /jours	0 log <sub>10</sub> /jours	de Roda Husman <i>et al.</i> (2009)
<b>Poliovirus 2</b>	Eau de surface artificielle	22	0,016 log <sub>10</sub> /jours	0,0041 log <sub>10</sub> /jours	de Roda Husman <i>et al.</i> (2009)
<b>Feline Calicivirus</b>	Eau souterraine	4	0,06 ± 0,13 log <sub>10</sub> /jours	0,02 ± 0,11 log <sub>10</sub> /jours	Bae et Schwab (2008)
<b>Feline Calicivirus</b>	Eau souterraine	25	0,12 ± 0,28 log <sub>10</sub> /jours	0,06 ± 0,09 log <sub>10</sub> /jours	Bae et Schwab (2008)
<b>Feline Calicivirus</b>	Eau de surface	4	0,19 ± 0,05 log <sub>10</sub> /jours	0,15 ± 0,11 log <sub>10</sub> /jours	Bae et Schwab (2008)
<b>Feline Calicivirus</b>	Eau de surface	25	0,4 ± 0,14 log <sub>10</sub> /jours	0,11 ± 0,04 log <sub>10</sub> /jours	Bae et Schwab (2008)
<b>Rotavirus</b>	Eau de mer artificielle	20	T <sub>90</sub> =2 jours	T <sub>90</sub> =16 jours	Dubois (1995)

### 2.5.1.2. Les rayonnements solaires

Les rayonnements solaires, par l'intermédiaire des UV, agissent sur la persistance des virus dans l'environnement. D'une manière générale, les virus survivent plus longtemps en l'absence de lumière (Hurst, 1988; Johnson *et al.*, 1997; Fujioka et Yoneyama, 2002; Noble *et al.*, 2004). Par exemple, un abattement d'inactivation d' $1 \log_{10}$  du poliovirus est observé au bout de 24h en l'absence de lumière, alors qu'il est de  $2 \log_{10}$  en présence de rayonnements solaires (Johnson *et al.*, 1997).

Un grand nombre d'autres paramètres physico-chimiques ou microbiologiques sont reconnus comme pouvant avoir un impact sur la survie des virus entériques. Cependant, dans le cadre de cette thèse, il n'est pas possible d'être exhaustif et de tous les décrire.

## 2.5.2. Persistance des virus face aux traitements de potabilisation

Comme nous l'avons précédemment précisé, le choix du traitement est conditionné par les caractéristiques des ressources employées pour la production d'eau potable. Le traitement conventionnel pour le traitement des eaux de surface consiste en un traitement physique de coagulation-floculation-sédimentation-filtration suivie d'une désinfection. Dans le cas d'eaux plus propres, telles que les eaux de nappe, qui sont naturellement filtrées, une désinfection au chlore ou à l'ozone est suffisant.

### 2.5.2.1. Traitement primaire

Les traitements primaires, ou aussi appelés traitements physiques, ont pour but d'éliminer les particules en suspension et les micro-organismes par des procédés de rétention. Les deux procédés décrits dans cette étude bibliographique sont la filtration naturelle sur berge et le traitement conventionnel de clarification.

#### 2.5.2.1.1. La filtration sur berge.

La filtration sur berge consiste en une filtration naturelle de l'eau brute par la végétation située sur les berges. L'efficacité de cette filtration latérale n'est peut-être pas comparable avec une filtration verticale utilisée lors du traitement de l'eau, mais de nombreux travaux ont été publiés sur l'avantage de cette technique pour l'épuration des micro-organismes et de la matière organique (Kuehn et Mueller, 2000; Schubert, 2002; Shamrukh et Abdel-Wahab, 2008). L'étude de Irmscher et Teermann (2002) montre l'avantage de cette technique pour l'élimination des virus. Ainsi, le nombre d'échantillon positifs détectés dans l'eau brute avant filtration et après filtration sur berge sont respectivement de 65% et 1% pour les adénovirus, 32% et 2% pour les entérovirus, 8% et 0% pour les norovirus et de 72% et 2% pour les rotavirus. D'une manière générale, il est estimé que la filtration sur berge permet un abattement de  $3 \log_{10}$  pour une eau dont la turbidité est inférieure ou égale à 0,3 NFU (AFSSA, 2007).

#### 2.5.2.1.2. La clarification

La clarification (coagulation/floculation/sédimentation) consiste à ajouter dans l'eau brute des coagulants, qui sont des produits chimiques tels que le sulfate d'aluminium, le sulfate ferrique, le chlorure ferrique. Ces coagulants ont une charge positive qui va neutraliser la charge négative des particules suspendues dans l'eau. Cette réaction entraîne une agglomération des particules qui vont former un floc. Les particules plus grosses et plus lourdes se déposent au fond et sont éliminées. L'eau décantée est ensuite généralement filtrée sur des lits de sable. L'abattement estimé pour l'élimination des entérovirus par la méthode de coagulation/floculation/sédimentation/filtration est de  $2 \log_{10}$  pour une eau de turbidité inférieure ou égale à 0,3 NFU (AFSSA, 2007).

#### 2.5.2.2. La désinfection

L'efficacité de la désinfection sur l'inactivation des micro-organismes dépend essentiellement de la concentration du désinfectant (C) et du temps de contact (T). Parmi les différents biocides utilisés dans les processus de traitement de l'eau potable, seules l'ozonation et la chloration, les plus communément employées, seront abordées dans cette partie.

Le chlore est considéré comme un bon virucide mais son efficacité dépend de nombreux paramètres liés à l'eau tels que la température, le pH et la turbidité. Le traitement au chlore est plus efficace lorsque la température de l'eau est élevée, avec un taux d'élimination 3 à 4 fois plus important pour une augmentation de température de 10°C. Concernant le pH, une élimination plus importante est observée lorsque le pH de l'eau est compris entre 6 et 7, et l'efficacité du chlore libre diminue lorsque le pH devient alcalin (Engelbrecht *et al.*, 1980; Grabow *et al.*, 1983; Thurston-Enriquez *et al.*, 2003; Cromeans *et al.*, 2010). Les résultats d'efficacité d'inactivation du chlore libre sur quelques virus, sont indiqués dans le Tableau 20. Le mécanisme d'inactivation du chlore n'est pas bien connu même si certaines études ont montré des changements de la structure de la capsid de l'échovirus 1, sous certaines conditions (Young et Sharp, 1985). Les acides nucléiques sont également la cible du chlore ce qui va produire une fragmentation du génome.

Les adénovirus sont plus sensibles que les entérovirus ou les norovirus, avec une résistance plus importante pour les échovirus (Liu *et al.*, 1971; Cromeans *et al.*, 2010). Cependant, il faut également prendre en compte que les différences de CT obtenues en fonction des études peuvent être dues aux caractéristiques physico-chimiques de l'eau utilisée dans les expérimentations ainsi que de la méthode de détection employée (Sharp *et al.*, 1980; Shin et Sobsey, 2008).

Depuis très longtemps, l’ozone est connu pour son action virucide. Généralement un abattement de 2 log<sub>10</sub> à 4 log<sub>10</sub> est obtenu pour une dose de 0,4 mg/L pendant un temps de contact de 4 minutes. Ainsi, il a été montré qu’une exposition à 0,15 mg/L d’ozone pendant 30 secondes induit une inactivation de 2 log<sub>10</sub> du poliovirus (Ellis, 1991) alors que le norovirus est réduit de plus de 3 log<sub>10</sub> à une dose de 0,37 mg/L pendant 10 secondes (Shin et Sobsey, 2003); l’adénovirus de 3 log<sub>10</sub> pour une dose d’ozone de 0,3 mg/L pendant 30 secondes (Thurston-Enriquez *et al.*, 2005) et le virus de l’hépatite A est réduit de 5 log<sub>10</sub> lorsqu’il est exposé pendant 1 minute à 1 mg/L d’ozone (Vaughn *et al.*, 1990).

Par ailleurs les études comparatives d’efficacité du chlore et de l’ozone ont montré que l’ozone est plus efficace d’au moins 1 log<sub>10</sub> pour inactiver les virus (Tyrrell *et al.*, 1995).

**Tableau 20: Valeurs de CT (mg.min/L) nécessaires pour l'obtention d'un abattement d'inactivation de 2 log<sub>10</sub> (99%) de différents virus par le chlore libre à 5°C dans du PBS en fonction du pH**

Virus	pH	CT (mg/L .min)	Référence
Adénovirus 2	7	0,02	Cromeans <i>et al.</i> (2010)
Adénovirus 2	8	0,04	Cromeans <i>et al.</i> (2010)
Adénovirus 40	6	0,05	Thurston-Enriquez <i>et al.</i> (2003)
Adénovirus 40	7	<0,02	Cromeans <i>et al.</i> (2010)
Adénovirus 40	7	0,11	Thurston-Enriquez <i>et al.</i> (2003)
Adénovirus 40	8	<0,02	Cromeans <i>et al.</i> (2010)
Adénovirus 40	8	0,22	Thurston-Enriquez <i>et al.</i> (2003)
Adénovirus 41	7	0,005	Cromeans <i>et al.</i> (2010)
Adénovirus 41	8	<0,02	Cromeans <i>et al.</i> (2010)
Coxsackievirus A9	6	0,14-0,15	Engelbrecht <i>et al.</i> (1980)
Coxsackievirus A9	10	0,24-0,25	Engelbrecht <i>et al.</i> (1980)
Coxsackievirus B3	7	0,97	Cromeans <i>et al.</i> (2010)
Coxsackievirus B3	8	0,65	Cromeans <i>et al.</i> (2010)
Coxsackievirus B5	7	3,6	Cromeans <i>et al.</i> (2010)
Coxsackievirus B5	8	4,7	Cromeans <i>et al.</i> (2010)
Coxsackievirus B5	6	13,23-13,37	Engelbrecht <i>et al.</i> (1980)
Coxsackievirus B5	7,8	10,5-10,92	Engelbrecht <i>et al.</i> (1980)
Coxsackievirus B5	10	33-33,66	Engelbrecht <i>et al.</i> (1980)
Echovirus 1	6	0,58-0,61	Engelbrecht <i>et al.</i> (1980)
Echovirus 1	7	0,96	Cromeans <i>et al.</i> (2010)
Echovirus 1	7,8	0,49-0,64	Engelbrecht <i>et al.</i> (1980)
Echovirus 1	8	0,99	Cromeans <i>et al.</i> (2010)
Echovirus 1	10	0,99-1,03	Engelbrecht <i>et al.</i> (1980)
Echovirus 5	6	0,86-0,94	Engelbrecht <i>et al.</i> (1980)
Echovirus 5	7,8	0,6-0,66	Engelbrecht <i>et al.</i> (1980)
Echovirus 5	10	2,16-2,25	Engelbrecht <i>et al.</i> (1980)
Echovirus 11	7	0,82	Cromeans <i>et al.</i> (2010)
Echovirus 11	8	0,54	Cromeans <i>et al.</i> (2010)
Poliovirus 1	6	0,72-0,75	Engelbrecht <i>et al.</i> (1980)
Poliovirus 1	6	0,93	Thurston-Enriquez <i>et al.</i> (2003)
Poliovirus 1	7	2,87	Thurston-Enriquez <i>et al.</i> (2003)
Poliovirus 1	7,8	47,04-48,96	Engelbrecht <i>et al.</i> (1980)
Poliovirus 1	8	6,36	Thurston-Enriquez <i>et al.</i> (2003)
Poliovirus 1	10	30,72-32	Engelbrecht <i>et al.</i> (1980)
Poliovirus 2	6	1,73-1,77	Engelbrecht <i>et al.</i> (1980)
Poliovirus 2	10	0,56-0,59	Engelbrecht <i>et al.</i> (1980)

## 2.6. Détection des virus entériques dans l'eau

En raison d'une faible quantité dans l'environnement, la détection des virus dans les milieux hydriques est réalisée en deux étapes: (i) la concentration des virus sous un faible volume et (ii) la détection à proprement parlé.

### 2.6.1. Méthodes de concentration des virus entériques

#### 2.6.1.1. Les méthodes de concentration primaire

Dans l'environnement, les virus excrétés par l'Homme se trouvent généralement en faible quantité et il est difficile de les détecter directement. Par conséquent, une étape de concentration doit être mise en œuvre. Le but de la concentration est d'obtenir tous les virus de l'échantillon à analyser sous un faible volume. Actuellement il n'existe pas de méthodes universelles capables de concentrer tous les virus à partir des différents milieux hydriques. Les principales méthodes de concentration reposent sur le principe d'adsorption-élution des virions sur différents supports qui peuvent être à charge positive, négative ou mixte.

##### 2.6.1.1.1. La laine de verre

La méthode de concentration sur laine de verre est la méthode de concentration préconisée dans la norme expérimentale XP T90-451 (AFNOR, 1996) pour la recherche des entérovirus dans les matrices hydriques. Le principe repose sur la filtration de l'échantillon d'eau à travers une cartouche contenant de la laine de verre sodocalcique compactée et les particules virales sont éluées à l'aide d'une solution éluante composée d'extrait de bœuf et de glycine. Ce type de support présente l'avantage d'être peu coûteux, et permet de traiter des échantillons de grands volumes (jusqu'à 1000 L en fonction de la nature de l'eau) ou des échantillons riches en matières en suspension car le colmatage est moins rapide qu'avec les membranes plates. Cette méthode présente l'avantage d'être rapide et peu coûteuse, et permet l'analyse de grands volumes d'eau plus ou moins fortement turbide. Toutefois, le rendement de cette technique peut être extrêmement variable en fonction du virus. Ainsi, des taux de récupération compris entre 31 et 98% ont été mesurés avec le poliovirus, entre 15 et  $62,4 \pm 11,7\%$  avec des échovirus, entre 12 et  $75,2 \pm 4,4\%$  avec des coxackievirus, entre 0,71 et 28% avec des adénovirus et entre <0,95 et 45% avec des norovirus (Tableau 21 et Tableau 22).

Tableau 21: Rendements de concentration des virus entériques avec la laine de verre dans des matrices hydriques faiblement turbides

Concentration primaire		Concentration secondaire	Détection	Type d'échantillon				Rendement	Référence
Prétraitement	Elution			Nature	Volume	Virus	Quantité inoculée		
/	0,5% BE-0,05M gly, pH9,5	/	Culture cellulaire sur cellules BGM	Eau réseau	100 L	Poliovirus	2,5 x 10 <sup>3</sup> à 1,2 x 10 <sup>6</sup> UFP/100 L	77 ± 6 (n=12)	Vilaginès <i>et al.</i> (1993)
/	0,5% BE-0,05M gly, pH9,5	Floculation organique	Culture cellulaire sur cellules BGM	Eau réseau	400 L	Poliovirus	96 à 2592 UFP/400 L	72 ± 19,7 (n=6)	Vilaginès <i>et al.</i> (1993)
/	0,5% BE-0,05M gly, pH9,5	Floculation organique	Culture cellulaire sur cellules BGM	Eau réseau	1000 L	Poliovirus	470 à 2070 UFP/1000 L	61,6 ± 24,5 (n=5)	Vilaginès <i>et al.</i> (1993)
/	0,5% BE-0,05M gly, pH9,5	Floculation organique	Culture cellulaire sur cellules BGM	Eau réseau	100 L	Echovirus	/	62,4 ± 11,7 (n=10)	Vilaginès <i>et al.</i> (1993)
/	0,5% BE-0,05M gly, pH9,5	Floculation organique	Culture cellulaire sur cellules BGM	Eau réseau	100 L	Coxsackievirus	/	72,3 ± 8,1 à 75,2 ± 4,4 (n=10)	Vilaginès <i>et al.</i> (1993)
/	0,5% BE-0,05M gly, pH9,5	Floculation organique	Culture cellulaire sur cellules BGM	Eau réseau	100 L	Rotavirus	/	64,9 ± 11,1 (n=10)	Vilaginès <i>et al.</i> (1993)
/	0,5% BE-0,05M gly, pH9,5	Floculation organique	Culture cellulaire sur cellules BGM	Eau réseau	100 L	Poliovirus	/	70,5 ± 7,9 (n=10)	Vilaginès <i>et al.</i> (1993)
/	3% BE-0,5M gly, pH9,5	Précipitation par PEG	RT-PCR	Eau robinet	10 L	Poliovirus	3,5 x 10 <sup>5</sup> à 3,8 x 10 <sup>5</sup>	98% (n=12)	Lambertini <i>et al.</i> (2008)
/	3% BE-0,5M gly, pH9,5	Précipitation par PEG	RT-PCR	Eau robinet	10-1500 L	Adénovirus 41	8,5 à 1,7 x 10 <sup>3</sup>	28% (n=16)	Lambertini <i>et al.</i> (2008)
/	3% BE-0,5M gly, pH9,5	Précipitation par PEG	RT-PCR	Eau robinet	20 L	Norovirus GII	1,30 x 10 <sup>3</sup>	30% (n=3)	Lambertini <i>et al.</i> (2008)
/	3% BE-0,05M gly, pH9,5	Floculation organique	qPCR	Eau robinet + eau distillée (50% v/v)	10 L	Adénovirus 2	2,63 x 10 <sup>7</sup> copies de génome	0,7-1,36, moy 0,95% (n=5)	Albinana-Gimenez <i>et al.</i> (2009)
/	3% BE-0,05M gly, pH9,5	Floculation organique	qPCR	Eau robinet + eau distillée (50% v/v)	10 L	Norovirus GII	1,2 x 10 <sup>7</sup> copies de génome	<0,95% (n=5)	Albinana-Gimenez <i>et al.</i> (2009)
/	3% BE-0,05M gly, pH9,5	Floculation organique	qPCR	Eau robinet + eau distillée (50% v/v)	50 L	Adénovirus 2	2,63 x 10 <sup>7</sup> copies de génome	0,71-1,57, moy 1,21% (n=5)	Albinana-Gimenez <i>et al.</i> (2009)
/	3% BE-0,05M gly, pH9,5	Floculation organique	qPCR	Eau robinet + eau distillée (50% v/v)	50 L	Norovirus GII	1,2 x 10 <sup>4</sup> copies de génome	<0,95% (n=5)	Albinana-Gimenez <i>et al.</i> (2009)
Acidification	3% BE-0,05M gly, pH9,5	Floculation organique	qPCR	Eau robinet + eau distillée (50% v/v)	10 L	Adénovirus 2	2,63 x 10 <sup>7</sup> copies de génome	2,02-6,91, moy 4,18% (n=10)	Albinana-Gimenez <i>et al.</i> (2009)

Tableau 22: Rendements de concentration des virus avec la méthode d'adsorption-élution sur laine de verre dans des matrices hydriques fortement turbides

Concentration primaire		Concentration secondaire	Détection	Type d'échantillon				Rendement	Référence
Prétraitement	Elution			Nature	Volume	Virus	Quantité inoculée		
/	0,5% BE-0,05M gly, pH9,5	Floculation organique	Culture cellulaire sur cellules BGM	Eau rivière	20 L	Poliovirus	35 à 3400	62.7 ± 9.5 (n=10)	Vilaginès <i>et al.</i> (1993)
/	3% BE-0,5M gly, pH9,5	Précipitation par PEG	RT-PCR	Eau souterraine	20-1597 L	Poliovirus	2,4 x 10 <sup>4</sup> à 2,7 x 10 <sup>7</sup>	31 à 51% (n=6-7)	Lambertini <i>et al.</i> (2008)
/	3% BE-0,5M gly, pH9,5	Précipitation par PEG	RT-PCR	Eau souterraine	20 L	Coxsackievirus	3,2 x 10 <sup>6</sup> à 6,6 x 10 <sup>6</sup>	12 à 15% (n=13)	Lambertini <i>et al.</i> (2008)
/	3% BE-0,5M gly, pH9,5	Précipitation par PEG	RT-PCR	Eau souterraine	20 L	Echovirus	2,8 x 10 <sup>6</sup> à 3,4 x 10 <sup>6</sup>	15 à 24% (n=12)	Lambertini <i>et al.</i> (2008)
/	3% BE-0,5M gly, pH9,5	Précipitation par PEG	RT-PCR	Eau souterraine	20 L	Adénovirus 41	8,1 x 10 <sup>2</sup> à 1,6 x 10 <sup>3</sup> /L	8 à 22% (n=16)	Lambertini <i>et al.</i> (2008)
/	3% BE-0,5M gly, pH9,5	Précipitation par PEG	RT-PCR	Eau souterraine	20 L	Norovirus GI	1,1 x 10 <sup>7</sup> /L	33 à 45% (n=4)	Lambertini <i>et al.</i> (2008)
/	3% BE-0,5M gly, pH9,5	Précipitation par PEG	RT-PCR	Eau souterraine	10-20 L	Norovirus GII	1,9 x 10 <sup>5</sup> à 5 x 10 <sup>6</sup> /L	16 à 32% (n=16)	Lambertini <i>et al.</i> (2008)

### 2.6.1.1.2. Les membranes filtrantes

L'adsorption du virus sur des supports de filtration ne présentant pas de porosité inférieure à celle des virus ne peut se faire que si la charge virale est inverse de celle du support. Par conséquent, les virus ayant une charge de surface naturellement négative, il est nécessaire de procéder à un traitement de l'échantillon lors de l'utilisation de supports à charge négative. Les traitements les plus couramment employés sur ces types de supports pour favoriser l'adsorption sont soit l'ajout de cations comme le chlorure d'aluminium ( $\text{AlCl}_3$ ) ou le chlorure de magnésium ( $\text{MgCl}_2$ ) (Sobsey et Glass, 1984; Haramoto *et al.*, 2005; Rigotto *et al.*, 2009); soit la modification du pH de l'échantillon à un pH de 3,5 afin de créer un environnement dont le pH est inférieur au pHi des virus (Sobsey et Glass, 1984; Enriquez et Gerba, 1995). Le pHi, appelé également point isoélectrique, est le pH auquel une molécule se trouve dans un potentiel électrique neutre. Ainsi, dans un milieu dont le pH est inférieur à leur pHi, les virus sont chargés positivement alors qu'à l'inverse, lorsque le pH du milieu est supérieur à leur pHi, les virus sont chargés négativement. Après fixation des virus sur le support, celui-ci est rincé avec une solution contenant de l'acide sulfurique ( $\text{H}_2\text{SO}_4$ ) afin d'éliminer les cations en excès puis les particules virales sont décrochées en faisant varier leurs propriétés de surface à l'aide d'une solution éluante. Malgré des rendements d'adsorption de presque 100% (Sobsey et Glass, 1984; Enriquez et Gerba, 1995), l'utilisation des supports chargés négativement est limitée car l'acidification préalable de l'échantillon pose problème d'une part dans le traitement de grands volumes d'eau, et d'autre part dans l'inactivation virale pour les virus sensibles aux pH acides (Bosh *et al.*, 1986).

Une adsorption des virus sur des supports chargés positivement ou à charge mixte a donc été proposée comme méthode alternative, à partir de laquelle aucun traitement préalable de l'échantillon n'est requis. Ainsi l'adsorption virale se fait au pH naturel de l'eau et les virus sont élués à l'aide d'une solution éluante à un pH alcalin. Les membranes les plus couramment utilisées sont les membranes en cellulose à charge modifiée Zetapor ou Virosorb 1-MDS (Cuno).

Dans la littérature, de nombreuses études d'évaluation des méthodes de concentration sur les supports membranaires ont été publiées mais il existe une grande variabilité quant à leur efficacité. Les résultats de rendements de concentration obtenus pour différentes études sont résumés dans le Tableau 23 et le Tableau 24, et montrent que cette variabilité peut être liée à la nature du support de filtration, au type d'eau analysée (Sobsey et Glass, 1984; Enriquez et Gerba, 1995; Lukasik *et al.*, 2000), au virus inoculé (Sobsey et Glass, 1984; Katayama *et al.*, 2002), mais également aux conditions d'éluion employées pour récupérer les virus adsorbés à la membrane (Sobsey et Jones, 1979; Katayama *et al.*, 2002). A titre d'exemple, Katayama *et al.* (2002) obtiennent des rendements compris entre 33% et 95% lorsque la membrane négative HA est employée pour concentrer les poliovirus inoculés dans de l'eau distillée. Par contre, lorsque une membrane positive Virosorb 1-MDS est utilisée dans les mêmes conditions expérimentales, ils obtiennent des rendements compris entre 0,6 et 62%.

La rapidité et la simplicité d'utilisation des supports et les rendements satisfaisants expliquent que la concentration sur des membranes ait été largement utilisée pour la détection des virus dans l'eau. Toutefois, leur utilisation est limitée en raison d'un colmatage rapide du support.

Tableau 23: Rendement des techniques de concentration des virus entériques à partir d'eaux de faible turbidité

Type de support	Concentration Primaire		Concentration secondaire	Détection	Type d'échantillon			Rendement	Référence	
	Traitement	Elution			Nature	Volume	Virus			Quantité inoculée/L
<b>Membranes chargées négativement</b>										
<b>Membrane ester de cellulose</b>	Ajout AlCl <sub>3</sub>	NaOH, pH 10,5-10,8	/	culture cellulaire sur cellules BGM	Eau distillée	400-500 mL	Poliovirus	710 UFP/mL	33%	Katayama <i>et al.</i> (2002)
	Ajout AlCl <sub>3</sub>	BE, pH 9,5	/	culture cellulaire sur cellules BGM	Eau distillée	400-500 mL	Poliovirus	710 UFP/mL	79%	Katayama <i>et al.</i> (2002)
	Ajout AlCl <sub>3</sub> Rinçage avec H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	NaOH, pH 10,5-10,8	/	culture cellulaire sur cellules BGM	Eau distillée	400-500 mL	Poliovirus	710 UFP/mL	95%	Katayama <i>et al.</i> (2002)
	Ajout AlCl <sub>3</sub> Rinçage avec H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	BE, pH 9,5	/	culture cellulaire sur cellules BGM	Eau distillée	400-500 mL	Poliovirus	710 UFP/mL	83%	Katayama <i>et al.</i> (2002)
	Ajout AlCl <sub>3</sub> Rinçage avec H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	NaOH, pH 10,5	Ultrafiltration	Nested PCR	Eau distillée	500 mL	Adénovirus 5	1 x 10 <sup>7</sup> TCID <sub>50</sub> /mL	100%	Rigotto <i>et al.</i> (2009)
	Ajout AlCl <sub>3</sub> Rinçage avec H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	NaOH, pH 10,5	Ultrafiltration	Nested RT-PCR	Eau distillée	500 mL	Hépatite A	3 x 10 <sup>4</sup> FFU/mL	100%	Rigotto <i>et al.</i> (2009)
	Acidification Ajout AlCl <sub>3</sub>	3% BE-0,05 M gly, pH 9,5	Ultracentrifugation	ELISA	Eau robinet	100 mL	Rotavirus	3,5 x 10 <sup>4</sup> UI/100 mL	37,57 ± 5,27% (n=3)	Kittigul <i>et al.</i> (2001)
	Acidification Ajout AlCl <sub>3</sub>	0,05 M gly, pH 11,5	Ultracentrifugation	ELISA	Eau robinet	100 mL	Rotavirus	3,5 x 10 <sup>4</sup> UI/100 mL	56,59 ± 2,66% (n=3)	Kittigul <i>et al.</i> (2001)
	Acidification Ajout AlCl <sub>3</sub>	2,9% TPB + 6% gly, pH 9	Ultracentrifugation	ELISA	Eau robinet	100 mL	Rotavirus	3,5 x 10 <sup>4</sup> UI/100 mL	41,22 ± 13,58% (n=3)	Kittigul <i>et al.</i> (2001)
	Acidification Ajout AlCl <sub>3</sub>	3% BE-0,05 M gly, pH 9,5	Précipitation par PEG	ELISA	Eau robinet	100 mL	Rotavirus	3,5 x 10 <sup>4</sup> UI/100 mL	15,37 ± 4,91% (n=3)	Kittigul <i>et al.</i> (2001)
Acidification Ajout AlCl <sub>3</sub>	0,05 M gly, pH 11,5	Précipitation par PEG	ELISA	Eau robinet	100 mL	Rotavirus	3,5 x 10 <sup>4</sup> UI/100 mL	21,21 ± 2,96% (n=3)	Kittigul <i>et al.</i> (2001)	
Acidification Ajout AlCl <sub>3</sub>	2,9% TPB + 6% gly, pH 9	Précipitation par PEG	ELISA	Eau robinet	100 mL	Rotavirus	3,5 x 10 <sup>4</sup> UI/100 mL	18,76 ± 4,27% (n=3)	Kittigul <i>et al.</i> (2001)	

Type de support	Concentration Primaire		Concentration secondaire	Détection	Type d'échantillon				Rendement	Référence
	Traitement	Elution			Nature	Volume	Virus	Quantité inoculée/L		
<b>Membrane Epoxy-fibre de verre</b>	Acidification	0,5% BE-0,05 M gly, pH 9,5	/	/	Eau de réseau	1,3 L	Poliovirus	$5 \times 10^3$ UFP/mL	$33 \pm 16$ (n=3)	Sobsey et Glass (1984)
	Acidification	0,5% BE-0,05 M gly, pH 9,5	/	/	Eau de réseau	1,3 L	Echovirus	$5 \times 10^3$ UFP/mL	$22 \pm 22$ (n=3)	Sobsey et Glass (1984)
	Acidification	0,5% BE-0,05 M gly, pH 9,5	/	/	Eau de réseau	1,3 L	Adénovirus	$5 \times 10^3$ UFP/mL	$34 \pm 41$ (n=3)	Sobsey et Glass (1984)
	Acidification	0,5% BE-0,05 M gly, pH 9,5	/	/	Eau de réseau	1,3 L	Réovirus	$5 \times 10^3$ UFP/mL	$0,6 \pm 0,7$ (n=3)	Sobsey et Glass (1984)
	Acidification Préfiltre polycarbonate 0,2 $\mu$ m	0,5% BE-0,05 M gly, pH 9,5	/	/	Eau de réseau	1,3 L	Poliovirus	$5 \times 10^3$ UFP/mL	$41 \pm 18$ (n=3)	Sobsey et Glass (1984)
	Acidification Préfiltre polycarbonate 0,2 $\mu$ m	0,5% BE-0,05 M gly, pH 9,5	/	/	Eau de réseau	1,3 L	Echovirus	$5 \times 10^3$ UFP/mL	$31 \pm 28$ (n=3)	Sobsey et Glass (1984)
	Acidification Préfiltre polycarbonate 0,2 $\mu$ m	0,5% BE-0,05 M gly, pH 9,5	/	/	Eau de réseau	1,3 L	Réovirus	$5 \times 10^3$ UFP/mL	$0,6 \pm 1,4$ (n=3)	Sobsey et Glass (1984)
	Acidification Préfiltre polycarbonate 0,2 $\mu$ m	0,5% BE-0,05 M gly, pH 9,5	/	/	Eau de réseau	1,3 L	Adénovirus	$5 \times 10^3$ UFP/mL	$24 \pm 33$ (n=3)	Sobsey et Glass (1984)
	Acidification Ajout AlCl <sub>3</sub>	1,5%BE-0,05 M gly, pH 9,5	Floculation organique	culture cellulaire sur cellules PLC/PRF/5	Eau robinet	113 L	Adénovirus 40	$1 \times 10^5$ TCID <sub>50</sub>	$36,6 \pm 5,46$ (n=4)	Enriquez et Gerba (1995)
	Acidification Ajout MgCl <sub>2</sub>	0,5% BE-0,05 M gly, pH 9,5	/	/	Eau de réseau	1,3 L	Poliovirus	$5 \times 10^3$ UFP/mL	$76 \pm 135$ (n=3)	Sobsey et Glass (1984)
	Acidification Ajout MgCl <sub>2</sub>	0,5% BE-0,05 M gly, pH 9,5	/	/	Eau de réseau	1,3 L	Echovirus	$5 \times 10^3$ UFP/mL	$36 \pm 84$ (n=3)	Sobsey et Glass (1984)
	Acidification Ajout MgCl <sub>2</sub>	0,5% BE-0,05 M gly, pH 9,5	/	/	Eau de réseau	1,3 L	Réovirus	$5 \times 10^3$ UFP/mL	$1,8 \pm 6,9$ (n=3)	Sobsey et Glass (1984)
Acidification Ajout MgCl <sub>2</sub>	0,5% BE-0,05 M gly, pH 9,5	/	/	Eau de réseau	1,3 L	Adénovirus	$5 \times 10^3$ UFP/mL	$28 \pm 33$ (n=3)	Sobsey et Glass (1984)	

Type de support	Concentration Primaire		Concentration secondaire	Détection	Type d'échantillon			Rendement	Référence	
	Traitement	Elution			Nature	Volume	Virus			Quantité inoculée/L
<b>Membrane Epoxy-fibre de verre</b>	Acidification Ajout MgCl <sub>2</sub> Préfiltre polycarbonate 0,2µm	0,5% BE-0,05 M gly, pH 9,5	/	/	Eau de réseau	1,3 L	Poliovirus	5 x 10 <sup>3</sup> UFP/ mL	79 ± 19 (n=3)	Sobsey et Glass (1984)
	Acidification Ajout MgCl <sub>2</sub> Préfiltre polycarbonate 0,2µm	0,5% BE-0,05 M gly, pH 9,5	/	/	Eau de réseau	1,3 L	Echovirus	5 x 10 <sup>3</sup> UFP/ mL	62 ± 4,9 (n=3)	Sobsey et Glass (1984)
	Acidification Ajout MgCl <sub>2</sub> Préfiltre polycarbonate 0,2µm	0,5% BE-0,05 M gly, pH 9,5	/	/	Eau de réseau	1,3 L	Réovirus	5 x 10 <sup>3</sup> UFP/ mL	2,1 ± 8,6 (n=3)	Sobsey et Glass (1984)
	Acidification Ajout MgCl <sub>2</sub> Préfiltre polycarbonate 0,2µm	0,5% BE-0,05 M gly, pH 9,5	/	/	Eau de réseau	1,3 L	Adénovirus	5 x 10 <sup>3</sup> UFP/ mL	32 ± 35 (n=3)	Sobsey et Glass (1984)
<b>Membranes chargées négativement</b>										
<b>Membrane en cellulose + fibre de verre</b>	/	0,5% BE-0,05 M gly, pH 9,5	/	/	Eau de réseau	1,3 L	Poliovirus	5 x 10 <sup>3</sup> UFP/ mL	57 ± 17 (n=3)	Sobsey et Glass (1984)
	/	0,5% BE-0,05 M gly, pH 9,5	/	/	Eau de réseau	1,3 L	Echovirus	5 x 10 <sup>3</sup> UFP/ mL	53 ± 30 (n=3)	Sobsey et Glass (1984)
	/	0,5% BE-0,05 M gly, pH 9,5	/	/	Eau de réseau	1,3 L	Réovirus	5 x 10 <sup>3</sup> UFP/ mL	19 ± 11 (n=3)	Sobsey et Glass (1984)
	/	0,5% BE-0,05 M gly, pH 9,5	/	/	Eau de réseau	1,3 L	Adénovirus	5 x 10 <sup>3</sup> UFP/ mL	17 ± 18 (n=3)	Sobsey et Glass (1984)
	/	3% BE-0,05 M gly, pH 9,5	SppedVac	ELISA	Eau robinet	100 mL	Rotavirus	3,5 x 10 <sup>4</sup> UI/100 mL	28,22 ± 5,66% (n=3)	Kittigul <i>et al.</i> (2001)

Type de support	Concentration Primaire		Concentration secondaire	Détection	Type d'échantillon			Rendement	Référence	
	Traitement	Elution			Nature	Volume	Virus			Quantité inoculée/L
Membrane en cellulose + fibre de verre	/	0,05 M gly, pH 11,5	SppedVac	ELISA	Eau robinet	100 mL	Rotavirus	$3,5 \times 10^4$ UI/100 mL	25,26 ± 0,1% (n=3)	Kittigul <i>et al.</i> (2001)
	/	2,9% TPB + 6% gly, pH 9	SppedVac	ELISA	Eau robinet	100 mL	Rotavirus	$3,5 \times 10^4$ UI/100 mL	34,86 ± 8,41% (n=3)	Kittigul <i>et al.</i> (2001)
	/	3% BE-0,05 M gly, pH 9,5	Précipitation par PEG	ELISA	Eau robinet	100 mL	Rotavirus	$3,5 \times 10^4$ UI/100 mL	21,48 ± 1,78% (n=3)	Kittigul <i>et al.</i> (2001)
	/	0,05 M gly, pH 11,5	Précipitation par PEG	ELISA	Eau robinet	100 mL	Rotavirus	$3,5 \times 10^4$ UI/100 mL	14,5 ± 1,57% (n=3)	Kittigul <i>et al.</i> (2001)
	/	2,9% TPB + 6% gly, pH 9	Précipitation par PEG	ELISA	Eau robinet	100 mL	Rotavirus	$3,5 \times 10^4$ UI/100 mL	14,56 ± 2,17% (n=3)	Kittigul <i>et al.</i> (2001)
	/	NaOH, pH 10,5-10,8	/	culture cellulaire sur cellules BGM	Eau distillée	400-500 mL	Poliovirus	350	62,0%	Katayama <i>et al.</i> (2002)
	/	BE, pH 9,5	/	culture cellulaire sur cellules BGM	Eau distillée	400-500 mL	Poliovirus	350	50,0%	Katayama <i>et al.</i> (2002)
	/	1,5%BE-0,05 M gly, pH 9,5	floculation organique	culture cellulaire sur cellules PLC/PRF/5	Eau robinet	113 L	Adénovirus 40	$1 \times 10^5$ TCID <sub>50</sub>	26,5 ± 7,04 (n=4)	Enriquez et Gerba (1995)
	Préfiltre en polycarbonate de 0,2µm	0,5% BE-0,05 M gly, pH 9,5	/	/	Eau de réseau	1,3 L	Poliovirus	$5 \times 10^3$ UFP/mL	44 ± 18(n=3)	Sobsey et Glass (1984)
	Préfiltre en polycarbonate de 0,2µm	0,5% BE-0,05 M gly, pH 9,5	/	/	Eau de réseau	1,3 L	Echovirus	$5 \times 10^3$ UFP/mL	56 ± 48 (n=3)	Sobsey et Glass (1984)
Préfiltre en polycarbonate de 0,2µm	0,5% BE-0,05 M gly, pH 9,5	/	/	Eau de réseau	1,3 L	Réovirus	$5 \times 10^3$ UFP/mL	22 ± 23 (n=3)	Sobsey et Glass (1984)	

Type de support	Concentration Primaire		Concentration secondaire	Détection	Type d'échantillon			Rendement	Référence	
	Traitement	Elution			Nature	Volume	Virus			Quantité inoculée/L
Membrane en cellulose + fibre de verre	Préfiltre en polycarbonate de 0,2µm	0,5% BE-0,05 M gly, pH 9,5	/	/	Eau de réseau	1,3 L	Adénovirus	5 x 10 <sup>3</sup> UFP/mL	13 ± 22 (n=3)	Sobsey et Glass (1984)
	Rinçage avec H2SO4	NaOH, pH 10,5-10,8	/	culture cellulaire sur cellules BGM	Eau distillée	400-500 mL	Poliovirus	350	0,6%	Katayama <i>et al.</i> (2002)

BE: extrait de bœuf; gly: glycine; UFP: Unité Formant Plaque; UFF: Unité Formant Focus

Tableau 24: Rendement des techniques de concentration des virus entériques à partir d'eaux de turbidité variable

Type de support	Concentration Primaire		Concentration secondaire	Détection	Type d'échantillon				Rendement	Référence
	Traitement	Elution			Nature	Volume	Virus	Quantité inoculée		
<b>Membranes chargées négativement</b>										
Membrane ester de cellulose	/	NaOH, pH 10,5-10,8	/	culture cellulaire sur cellules BGM	Eau de mer	400-500 mL	Poliovirus	570 UFP/mL	34%	Katayama <i>et al.</i> (2002)
	/	BE, pH 9,5	/	culture cellulaire sur cellules BGM	Eau de mer	400-500 mL	Poliovirus 1	570 UFP/mL	42%	Katayama <i>et al.</i> (2002)
	Rinçage avec H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	NaOH, pH 10,5-10,8	/	culture cellulaire sur cellules BGM	Eau de mer	400-500 mL	Poliovirus	710 UFP/ mL	95%	Katayama <i>et al.</i> (2002)
	Rinçage avec H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	BE, pH 9,5	/	culture cellulaire sur cellules BGM	Eau de mer	400-500 mL	Poliovirus 1	570 UFP/ mL	94%	Katayama <i>et al.</i> (2002)
	Ajout AlCl <sub>3</sub> Rinçage avec H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	NaOH, pH 10,8	/	Culture cellulaire sur cellules BGM	Eau rivière	100 mL	Poliovirus 1	1 x 10 <sup>7</sup> UFP/100 mL	56 ± 32 (n=37)	Haramoto <i>et al.</i> (2005)
	Ajout AlCl <sub>3</sub> Rinçage avec H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	NaOH pH 10,5	Ultrafiltration	nested rt-PCR	Eau de surface	500 mL	Hepatite A	3 x 10 <sup>4</sup> FFU/ mL	100%	Rigotto <i>et al.</i> (2009)
	Ajout AlCl <sub>3</sub> Rinçage avec H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	NaOH, pH 10,5	Ultrafiltration	nested PCR	Eau de surface	500 mL	Adénovirus 5	1 x 10 <sup>7</sup> TCID <sub>50</sub> / mL	10%	Rigotto <i>et al.</i> (2009)
	Ajout AlCl <sub>3</sub> Rinçage avec H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	NaOH, pH 10,5	Ultrafiltration	nested PCR	Eau de mer	500 mL	Adénovirus 5	1 x 10 <sup>8</sup> TCID <sub>50</sub> / mL	10%	Rigotto <i>et al.</i> (2009)
Ajout AlCl <sub>3</sub> Rinçage avec H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	NaOH, pH 10,5	Ultrafiltration	nested rt-PCR	Eau de mer	500 mL	Hepatite A	3 x 10 <sup>5</sup> FFU/ mL	10%	Rigotto <i>et al.</i> (2009)	
Membrane Epoxy-fibre de verre	Acidification	0,5% BE-0,05 M gly, pH 9,5	/	/	Eau surface	1,3 L	Poliovirus 1	5 x 10 <sup>3</sup> UFP/ mL	31 ± 36 (n=3)	Sobsey <i>et Glass</i> (1984)
	Acidification	0,5% BE-0,05 M gly, pH9,5	/	/	Eau surface	1,3 L	Echovirus 1	5 x 10 <sup>3</sup> UFP/ mL	23 ± 17 (n=3)	Sobsey <i>et Glass</i> (1984)
	Acidification	0,5% BE-0,05M gly, pH 9,5	/	/	Eau surface	1,3 L	Réovirus	5 x 10 <sup>3</sup> UFP/ mL	1,2 ± 2,6 (n=3)	Sobsey <i>et Glass</i> (1984)

Type de support	Concentration Primaire		Concentration secondaire	Détection	Type d'échantillon				Rendement	Référence
	Traitement	Elution			Nature	Volume	Virus	Quantité inoculée		
Membrane Epoxy-fibre de verre	Acidification	0,5% BE-0,05 M gly, pH 9,5	/	/	Eau surface	1,3 L	Adénovirus 11	5 x 10 <sup>3</sup> UFP/mL	18 ± 52 (n=3)	Sobsey et Glass (1984)
	Acidification Préfiltre polycarbonate 0,2µm	0,5% BE-0,05 M gly, pH 9,5	/	/	Eau surface	1,3 L	Poliovirus 1	5 x 10 <sup>3</sup> UFP/mL	22 ± 17 (n=3)	Sobsey et Glass (1984)
	Acidification Préfiltre polycarbonate 0,2µm	0,5% BE-0,05 M gly, pH 9,5	/	/	Eau surface	1,3 L	Echovirus 1	5 x 10 <sup>3</sup> UFP/mL	12 ± 7,4 (n=3)	Sobsey et Glass (1984)
	Acidification Préfiltre polycarbonate 0,2µm	0,5% BE-0,05 M gly, pH 9,5	/	/	Eau surface	1,3 L	Réovirus	5 x 10 <sup>3</sup> UFP/mL	1,2 ± 2,9 (n=3)	Sobsey et Glass (1984)
	Acidification Préfiltre polycarbonate 0,2µm	0,5% BE-0,05 M gly, pH 9,5	/	/	Eau surface	1,3 L	Adénovirus 11	5 x 10 <sup>3</sup> UFP/mL	38 ± 20 (n=3)	Sobsey et Glass (1984)
	Acidification Ajout AlCl <sub>3</sub>	1,5%BE-0,05 M gly, pH 9,5	floculation organique	culture cellulaire sur PLC/PRF/5	Eau de mer	113 L	Adénovirus 40	1 x 10 <sup>5</sup> TCID <sub>50</sub>	38,2 ± 8,13 (n=4)	Enriquez et Gerba (1995)
	Acidification Ajout MgCl <sub>2</sub>	0,5% BE-0,05 M gly, pH 9,5	/	/	Eau surface	1,3 L	Poliovirus 1	5 x 10 <sup>3</sup> UFP/mL	47 ± 65 (n=3)	Sobsey et Glass (1984)
	Acidification Ajout MgCl <sub>2</sub>	0,5% BE-0,05 M gly, pH 9,5	/	/	Eau surface	1,3 L	Echovirus 1	5 x 10 <sup>3</sup> UFP/mL	21 ± 51 (n=3)	Sobsey et Glass (1984)
	Acidification Ajout MgCl <sub>2</sub>	0,5% BE-0,05 M gly, pH 9,5	/	/	Eau surface	1,3 L	Réovirus	5 x 10 <sup>3</sup> UFP/mL	2,1 ± 8,2 (n=3)	Sobsey et Glass (1984)
	Acidification Ajout MgCl <sub>2</sub>	0,5% BE-0,05 M gly, pH 9,5	/	/	Eau surface	1,3 L	Adénovirus 11	5 x 10 <sup>3</sup> UFP/mL	25 ± 38 (n=3)	Sobsey et Glass (1984)
Acidification Préfiltre polycarbonate 0,2µm Ajout MgCl <sub>2</sub>	0,5% BE-0,05 M gly, pH 9,5	/	/	Eau surface	1,3 L	Poliovirus 1	5 x 10 <sup>3</sup> UFP/mL	75 ± 61 (n=3)	Sobsey et Glass (1984)	

Type de support	Concentration Primaire		Concentration secondaire	Détection	Type d'échantillon				Rendement	Référence
	Traitement	Elution			Nature	Volume	Virus	Quantité inoculée		
Membrane Epoxy-fibre de verre	Acidification Préfiltre polycarbonate 0,2µm Ajout MgCl <sub>2</sub>	0,5% BE-0,05 M gly, pH 9,5	/	/	Eau surface	1,3 L	Echovirus 1	5 x 10 <sup>3</sup> UFP/mL	57 ± 100 (n=3)	Sobsey et Glass (1984)
	Acidification Préfiltre polycarbonate 0,2µm Ajout MgCl <sub>2</sub>	0,5% BE-0,05 M gly, pH 9,5	/	/	Eau surface	1,3 L	Réovirus	5 x 10 <sup>3</sup> UFP/mL	2,1 ± 8,8 (n=3)	Sobsey et Glass (1984)
	Acidification Préfiltre polycarbonate 0,2µm Ajout MgCl <sub>2</sub>	0,5% BE-0,05 M gly, pH 9,5	/	/	Eau surface	1,3 L	Adénovirus 11	5 x 10 <sup>3</sup> UFP/mL	32 ± 60 (n=3)	Sobsey et Glass (1984)
<b>Membranes chargées positivement</b>										
Membrane en cellulose + fibre de verre	/	0,5% BE-0,05 M gly, pH 9,5	/	/	Eau surface	1,3 L	Poliovirus	5 x 10 <sup>3</sup> UFP/mL	36 ± 13 (n=3)	Sobsey et Glass (1984)
	/	0,5% BE-0,05 M gly, pH 9,5	/	/	Eau surface	1,3 L	Echovirus	5 x 10 <sup>3</sup> UFP/mL	14 ± 16 (n=3)	Sobsey et Glass (1984)
	/	0,5% BE-0,05 M gly, pH 9,5	/	/	Eau surface	1,3 L	Réovirus	5 x 10 <sup>3</sup> UFP/mL	13 ± 14 (n=3)	Sobsey et Glass (1984)
	/	0,5% BE-0,05 M gly, pH 9,5	/	/	Eau surface	1,3 L	Adénovirus	5 x 10 <sup>3</sup> UFP/mL	22 ± 18 (n=3)	Sobsey et Glass (1984)
	/	BE, pH 9,5	/	culture cellulaire sur cellules BGM	Eau de mer	400-500 mL	Poliovirus	570	6,0%	Katayama <i>et al.</i> (2002)
	Préfiltre polycarbonate 0,2µm	en de 0,5% BE-0,05 M gly, pH 9,5	/	/	Eau surface	1,3 L	Poliovirus	5 x 10 <sup>3</sup> UFP/mL	48 ± 42 (n=3)	Sobsey et Glass (1984)
	Préfiltre polycarbonate 0,2µm	en de 0,5% BE-0,05 M gly, pH 9,5	/	/	Eau surface	1,3 L	Echovirus	5 x 10 <sup>3</sup> UFP/mL	38 ± 58 (n=3)	Sobsey et Glass (1984)

Type de support	Concentration Primaire			Concentration secondaire	Détection	Type d'échantillon				Rendement	Référence
	Traitement		Elution			Nature	Volume	Virus	Quantité inoculée		
<b>Membrane en cellulose + fibre de verre</b>	Préfiltre polycarbonate 0,2µm	en	0,5% BE-0,05 M gly, pH 9,5	/	/	Eau surface	1,3 L	Réovirus	5 x 10 <sup>3</sup> UFP/mL	15 ± 14 (n=3)	Sobsey et Glass (1984)
	Préfiltre polycarbonate 0,2µm	en	0,5% BE-0,05 M gly, pH 9,5	/	/	Eau surface	1,3 L	Adénovirus	5 x 10 <sup>3</sup> UFP/mL	17 ± 27 (n=3)	Sobsey et Glass (1984)

BE: extrait de bœuf; gly: glycine; UFP: Unité Formant Plaque

### 2.6.1.1.3. Les cartouches filtrantes

L'utilisation des cartouches est plus particulièrement adaptée pour la filtration de grands volumes d'eau ou lorsque l'échantillon est riche en matières en suspension car les cartouches sont colmatées beaucoup moins rapidement que les membranes. Dans le cas d'utilisation de cartouches électro-négatives, la contrainte de l'acidification préalable de l'échantillon peut poser des problèmes notamment lors de l'analyse de grands volumes d'eaux. Par conséquent, une adsorption des virus sur des supports chargés positivement ou à charge mixte ont été proposés comme méthode alternative puisqu'aucun traitement préalable de l'échantillon n'est requis.

### 2.6.1.1.4. L'ultrafiltration

L'ultrafiltration est un procédé de séparation des particules en fonction de leur poids moléculaire. L'échantillon d'eau traverse perpendiculairement ou tangentiellement les membranes qui sont choisies en fonction d'un poids moléculaire seuil permettant le passage de l'eau ainsi que les solutés de faible poids moléculaire mais excluent le passage des virus et des macromolécules. L'échantillon est filtré de manière répétée à travers les membranes jusqu'à ce que le volume du rétentat, qui contient les virus, soit réduit de manière significative. Skrabber *et al.* (2009) obtiennent des rendements jusqu'à 85% dans l'eau de surface pré-filtrée artificiellement contaminée avec du poliovirus, alors que des rendements inférieurs à 10% sont observés avec les norovirus et les adénovirus inoculés dans de l'eau de réseau mélangée à de l'eau distillée (Albinana-Gimenez *et al.*, 2009).

L'ultrafiltration permet la concentration d'un grand nombre de virus et ne nécessite pas de prétraitement de l'échantillon. Cependant, le coût élevé du matériel ainsi que le colmatage rapide des membranes dans le cas de la filtration d'échantillons d'eau turbide sont les inconvénients de cette méthode.

## 2.6.1.2. Les méthodes de concentration secondaire

Dans le but d'obtenir les virus dans un volume de concentrat le plus faible possible, il est nécessaire, notamment dans le cas d'analyse de grands volumes d'eau, de procéder à une concentration secondaire. Parmi les méthodes employées, la floculation organique et la précipitation par le polyéthylène glycol (PEG) sont les plus utilisées.

### 2.6.1.2.1. La floculation organique

A un pH acide (pH 3,5), les protéines de l'éluat, le plus souvent de l'extrait de bœuf, forment des floculats dans lesquels les virus sont emprisonnés. Après une étape de centrifugation, les floccs sont récupérés puis dissouts pour permettre la détection des particules virales. Cette technique est simple, rapide et peu coûteuse. Des rendements de concentration secondaire de  $38,6 \pm 2\%$  ont été obtenus avec des adénovirus 40 (Enriquez et Gerba, 1995) mais il semblerait que les résultats soient variables en fonction du virus et de la provenance des éluants protéiques (Hurst *et al.*, 1984). Par ailleurs, il a été rapporté que l'extrait de bœuf présenterait des propriétés inhibitrices lors de la détection des virus par PCR (Schwab *et al.*, 1995).

#### 2.6.1.2.2. La précipitation par le polyéthylène glycol

Le polyéthylène glycol (PEG) est un polymère synthétique soluble dans l'eau qui provoque la précipitation des virus probablement en piégeant l'eau autour de ces derniers. Ce composé peut être utilisé pour tous les types d'éluats, protéiques ou non. Comme pour la floculation organique, cette méthode présente l'avantage d'être simple, rapide et peu coûteuse mais le temps nécessaire à la floculation des virus est long (quelques heures) ce qui représente le principal inconvénient de cette technique. Dans l'étude d'Enriquez et Gerba (1995), le rendement de précipitation par le PEG obtenu avec l'adénovirus 40 est similaire à celui obtenu par floculation organique ( $40 \pm 13\%$  versus  $38,6 \pm 2\%$ ).

### 2.6.2. Méthodes de détection des virus entériques

Dans cette partie de l'étude bibliographique, nous décrirons seulement les méthodes les plus couramment employées pour la détection des virus dans les échantillons hydriques.

#### 2.6.2.1. Culture cellulaire

La culture cellulaire est la méthode préconisée dans la méthode normalisée (AFNOR, 1996) pour la recherche des entérovirus dans l'eau. Le principe de cette technique est la mise en évidence d'une multiplication in vitro des virus sur des lignées cellulaires. La visualisation de la multiplication virale peut se faire soit directement par l'apparition d'effet cytopathique (ECP), c'est-à-dire de lésions caractéristiques au niveau du tapis cellulaire, soit indirectement par révélation à l'aide de techniques immunologiques in situ, ou par biologie moléculaire.

La quantification des virus infectieux peut être réalisée en utilisant une méthode de type quantique qui permet d'évaluer le Nombre le Plus Probable d'Unités Cytopathiques (NPPUC), ou par énumération des plages de lyse provoquées par les virus en culture cellulaire sous couverture gélosée, en exprimant les résultats en Unités Formant Plages (UFP).

De nombreuses lignées cellulaires existent pour la mise en évidence des virus entériques infectieux. Cependant, toutes les cellules ne présentant pas la même sensibilité, il est nécessaire de faire un choix en fonction du virus recherché. Ainsi, Grabow *et al.* (1999), mettent en évidence la présence du poliovirus dans les eaux usées dans 25% des échantillons par culture cellulaire sur les cellules BGM. Lorsque ces mêmes échantillons sont inoculés sur des cellules L20B, ils augmentent le nombre d'échantillons positifs à 45%. Par ailleurs, au sein même d'un genre de virus, il peut exister une variabilité quant à la sensibilité de certains génogroupes à se multiplier sur des lignées cellulaires. Ainsi dans le cas des adénovirus, il est possible de multiplier les sérotypes 1 à 39 sur de nombreuses lignées cellulaires telles que les cellules A549, KB, BGМК, Vero, HeLA..., alors que les adénovirus entériques (sérotypes 40 et 41) sont reconnus pour être difficilement cultivables sur la plupart des systèmes cellulaires. Malgré de nombreuses tentatives sur des cellules HEK 293 (Brown et Pétric, 1986), des cellules PLC/PRF5 (Grabow *et al.*, 1992), les cellules CaCo-2 (Pinto *et al.*, 1995), ou encore les cellules A549 (Hashimoto *et al.*, 1991), l'isolement et la multiplication de ces virus n'est pas évidente (Jiang, 2006).

D'une manière générale, il est recommandé pour certains virus d'effectuer soit des isollements sur au moins deux systèmes cellulaires différents, soit d'effectuer une ou deux subcultures, ce qui permettrait d'augmenter le pourcentage d'isolement et de s'assurer que les ECP ne sont pas dus à la présence de produits toxiques dans les échantillons ou à la présence d'autres virus que ceux recherchés. En outre, dans les échantillons environnementaux, il est nécessaire de procéder à une décontamination de l'échantillon par des antibiotiques/antifongiques ou par filtration sur filtre de porosité 0,22 µm avant de les inoculer sur les systèmes cellulaires, afin d'éliminer les bactéries et les champignons qui pourraient interférer avec la croissance cellulaire.

Bien que cette méthode soit largement employée pour mettre en évidence l'infectiosité des virus entériques, son utilisation reste limitée car certains virus comme les norovirus, les sapovirus, ne peuvent se multiplier sur les systèmes cellulaires actuellement disponibles, et pour d'autres virus comme le virus de l'hépatite E et certaines souches de rotavirus, la multiplication est difficile. De plus, cette méthode est longue puisque généralement 7 à 10 jours sont nécessaires pour obtenir une réponse.

#### 2.6.2.2. Méthodes de biologie moléculaire

Actuellement la détection des virus entériques dans l'environnement se fait essentiellement par biologie moléculaire à partir des concentrats viraux obtenus à partir de grands volumes d'eau. Pour cela, il est nécessaire d'extraire le génome par dénaturation de la capsid virale avant de procéder à son amplification. Dans le cas où le génome est un ARN, une étape de rétrotranscription (RT) est effectuée avant amplification afin de transcrire l'ARN en ADN complémentaire. Parmi les différentes techniques employées pour la révélation des fragments amplifiés, nous nous intéresserons seulement à la révélation par électrophorèse en gel d'agarose ou de polyacrylamide en présence de bromure d'éthidium (PCR conventionnelle), ou directement au cours de l'amplification grâce à l'emploi d'une sonde fluorogénique marquée chimiquement par un fluorochrome (PCR en temps réel).

Les techniques de PCR, qu'elles soient qualitatives (PCR conventionnelle) ou quantitatives (PCR en temps réel), sont largement utilisées pour la détection des norovirus (Schvoerer *et al.*, 2000; Vinjé et Koopmans, 2000; Haramoto *et al.*, 2005), des entérovirus (Gantzer *et al.*, 1998a; Borchardt *et al.*, 2003; Zhang *et al.*, 2010), des sapovirus (Lappalainen *et al.*, 2001; Haramoto *et al.*, 2008), des adénovirus (Choi et Jiang, 2005; He et Jiang, 2005; Jiang *et al.*, 2005; Muscillo *et al.*, 2008), des astovirus (Marx *et al.*, 1998; Chapron *et al.*, 2000; Silva *et al.*, 2001), du virus de l'hépatite A (Divizia *et al.*, 1998; Pina *et al.*, 2001; Brooks *et al.*, 2005), du virus de l'hépatite E (Jothikumar *et al.*, 2000), des rotavirus (Kittigul *et al.*, 2000; Soule *et al.*, 2000; Yang *et al.*, 2011) et des réovirus (Muscillo *et al.*, 2001; Spinner et Di Giovanni, 2001) dans les échantillons hydriques.

De nombreux auteurs ont montré que la technique de PCR est plus rapide et plus sensible que la culture cellulaire pour mettre en évidence une contamination virale (Chung *et al.*, 1996; Abbaszadegan *et al.*, 1999), avec une sensibilité de 10 à 1000 fois supérieure à celle de la culture cellulaire (Kopecka *et al.*, 1993). Toutefois, la présence de molécules interférentes, co-concentrées en même temps que les virus, susceptibles d'être présentes en grande quantité dans le concentrat, peuvent interférer avec la méthode (Abbaszadegan *et al.*, 1993; Wilson, 1997). En outre, la détection de génome viral dans l'échantillon d'eau indique une contamination du milieu mais ne peut renseigner sur le caractère infectieux des virus détectés. Cette information est pourtant indispensable dans l'évaluation des risques d'infection liés à l'ingestion de l'eau contaminée.

#### 2.6.2.3. Méthodes couplées ICC-PCR

Les méthodes de couplage de culture cellulaire avec la PCR, nommées ICC-PCR (Integrated Cell Culture-PCR), ont été développées ces dernières années. Ces techniques sont largement employées dans les milieux hydriques pour la détection des entérovirus (Reynolds *et al.*, 2001; Lee et Kim, 2002; Reynolds, 2004), du virus de l'hépatite A (Reynolds *et al.*, 2001; Jiang *et al.*, 2004), des adénovirus (Chapron *et al.*, 2000; Lee et Kim, 2002; Dong *et al.*, 2010) ou encore des astrovirus (Grimm *et al.*, 2004). Outre l'avantage d'être plus rapide, en raison d'une mise en évidence de l'augmentation de la quantité de génome par amplification au sein des cellules infectées bien avant l'apparition d'un ECP (Reynolds *et al.*, 2001), l'ICC-PCR est également plus sensible que la méthode de culture cellulaire seule (Chapron *et al.*, 2000; Grabow *et al.*, 2001; Lee et Jeong, 2004). A titre d'exemple, Grabow *et al.* (2001) détectent la présence de virus pathogènes par ICC-PCR dans 23% des échantillons d'eau traitée bien qu'aucun ECP n'ait été observé. De même, dans l'eau de surface, 73% des échantillons se sont avérés positifs en virus infectieux par ICC-PCR contre 6% par la méthode de culture cellulaire seule. En outre l'ICC-PCR est un outil particulièrement intéressant pour la mise en évidence des virus infectieux dont la répllication au sein des lignées cellulaires ne provoque pas d'ECP, tels que les adénovirus 40 et 41. Cependant, de la même manière que la culture cellulaire seule, l'ICC-PCR présente l'inconvénient de ne pouvoir détecter les virus non ou très peu cultivables sur un système cellulaire tels que les norovirus par exemple.

### 3. CRYPTOSPORIDIUM

#### 3.1. Historique et taxonomie

##### 3.1.1. Historique

En 1907, Ernest Edward Tyzzer décrit pour la première fois le genre *Cryptosporidium* en observant ce protozoaire dans les glandes gastriques d'une souris (*Cryptosporidium muris*). Longtemps considérés comme des parasites commensaux, il faut attendre les années 1950 pour que leur association avec un épisode diarrhéique chez de jeunes dindes (avec *Cryptosporidium meleagridis*), et avec de grands foyers de diarrhée chez les bovins (avec *Cryptosporidium parvum*) dans les années 1970, soit reconnue (OIE, 2005). C'est en 1976 que les deux premiers cas de cryptosporidioses humaines sont découverts mais l'émergence de *Cryptosporidium* en termes de santé publique ne fut prise en compte qu'à partir des années 80 avec l'apparition de l'épidémie du SIDA, où le parasite s'est révélé être un pathogène mortel pour ce type de patients. Depuis, d'autres cas de cryptosporidioses touchant la population entière ont été décrits, telle que l'épidémie d'origine hydrique survenue en 1993 à Milwaukee (Etats-Unis) qui a touché 403 000 personnes.

##### 3.1.2. Taxonomie

*Cryptosporidium* est membre du phylum des *Apicomplexa*, de l'ordre des *Eucoccidiorida*, de la famille des *Cryptosporidiidae*. Au sein du genre *Cryptosporidium*, la définition et l'identification des espèces ont été en changement permanent depuis le début du 21<sup>ème</sup> siècle.

Initialement, les critères utilisés pour la classification des espèces de *Cryptosporidium* étaient la spécificité d'hôte, le site d'infection des parasites chez l'hôte ainsi que les différences morphologiques comme la taille, la forme. Cependant, plusieurs de ces critères sont apparus mal fondés et ont provoqué la confusion au sujet de la validité historique de plusieurs *Cryptosporidium spp.* En effet, les critères morphologiques, bien que souvent employés comme des critères de classification pour de nombreux micro-organismes, apparaissent insuffisants pour *Cryptosporidium* du fait d'une similitude structurale et une taille identique des oocystes de certaines espèces de ce parasite. Ainsi, en 2000 plus de 21 espèces ont été décrites sur la base de la spécificité d'hôtes chez qui elles ont été isolées. Cependant, des études d'infections croisées ont montré que les espèces définies pouvaient infecter des hôtes différents que ceux déterminés initialement (Xiao *et al.*, 2000). La classification s'est alors appuyée non seulement sur la spécificité d'hôtes mais également sur la morphologie des oocystes et le site d'infection.

Le développement d'outils moléculaires a permis de conforter en grande partie le consensus existant car les différences génétiques identifiées au niveau des espèces ou génotypes sont pour la plupart bien corrélées avec les autres caractéristiques biologiques telles que le spectre d'hôtes naturel et l'infectiosité de la transmission croisée des études. Cependant, en raison de l'incertitude associée à l'ampleur de la variation allélique intra-spécifique dans la taxonomie de *Cryptosporidium*, de nombreux génotypes ont été décrits sans désignation d'espèce ou ont été regroupés avec l'espèce *C. parvum*.

En conséquence, depuis 2002, la dénomination de nouvelles espèces ne peut se faire que si un ensemble de critères sont réunis. Ces critères sont:

- la morphologie des oocystes (taille, forme)
- une spécificité d'hôtes
- une variation allélique par rapport aux espèces déjà nommées
- une désignation en fonction de l'hôte à partir duquel il a été isolé.

C'est ainsi que des génotypes de *C. parvum* ont été reclassés en espèces bien distinctes: *C. canis* isolé du chien, *C. suis* isolé d'un porc, ou encore *C. hominis* spécifique de l'Homme. A ce jour, 19 espèces de *Cryptosporidium* sont validées; elles sont présentées dans le Tableau 25.

**Tableau 25: Hôtes majoritaires et lieux d'infection des différentes espèces de *Cryptosporidium* (Caccio et al., 2005; OIE, 2005; Smith et Nichols, 2007)**

Espèces	Hôte majoritaire	Lieu d'infection	Dimensions des oocystes (µm)
<i>C. parvum</i>	Homme, bovins, autres ruminants	Intestin grêle	4,5 x 5,5
<i>C. hominis</i>	Homme, singes	Intestin grêle	4,5 x 5,5
<i>C. meleagridis</i>	Dindes, Homme	Intestin	4,5-4,0 x 4,6-5,2
<i>C. andersoni</i>	Bovins	Estomac	5,5 x 7,4
<i>C. bovis</i>	Bovins	Intestin	4,7-5,3 x 4,2-4,8
<i>C. suis</i>	Porcins	Intestin	4,9-4,4 x 4,0-4,3
<i>C. felis</i>	Chats	Intestin grêle	4,5 x 5,0
<i>C. canis</i>	Chiens	Intestin grêle	4,71 x 4,95
<i>C. muris</i>	Rongeurs	Estomac	5,6 x 7,4
<i>C. baileyi</i>	Volailles	Trachée, bourse de Fabricius, cloaque	4,6 x 6,2
<i>C. macropodum</i>	Kangourous		4,9 x 5,4
<i>C. wrairi</i>	Cobayes	Intestin grêle	4,9-5,0 x 4,8-5,6
<i>C. galli</i>	Poulets, Pinsons		8,25 x 6,3
<i>C. fragile</i>	Crapauds	Estomac	6,2 x 5,5
<i>C. saurophilum</i>	Lézards	Muqueuse intestinale et cloacale	4,2-5,2 x 4,4-5,6
<i>C. serpentis</i>	Serpents	Estomac	5,6-6,6 x 4,8-5,6
<i>C. molnari</i>	Poissons	Intestin	4,7 x 4,5
<i>C. nasorum</i>	Poissons	Intestin	4,3 x 3,3
<i>C. scopthalmi</i>	Poissons	Intestin et estomac	3,7-5,0 x 3,0-4,7

### 3.2. Génome de *Cryptosporidium*

Le génome de *C. hominis* est composé de 8 chromosomes de 0,9 à 14 Mb chacun. La taille du génome est estimée à 9,16 Mb dont 6,29 Mb correspondent à des régions codantes (Xu *et al.*, 2004). La composition en bases G et C est de 31,7%. Le détail des caractéristiques du génome de *C. hominis* et *C. parvum* est indiqué dans le Tableau 26.

**Tableau 26: Caractéristique du génome de *C. parvum* et *C. hominis* (Xu *et al.*, 2004)**

(a) The genome	<i>C. hominis</i>	<i>C. parvum</i>
Size (Mb)	9.16	9.11
No. of physical gaps	246	5
No. of contigs	1413*	n.a.
(G+C) content (%)	31.7	30.3
<b>Coding regions†</b>		
Coding size (Mb)	6.29	6.80
Percentage coding	69	74
(G + C) content (%)	32.3	31.9
No. of genes	3,994	3,952
Mean gene length (bp)	1,576	1,720
Gene density (bp per gene)	2,293	2,305
Genes with introns (%)‡	5–20%	5%
Hits nr§	2,331	2,483
Percentage hits nr§	58	63
<b>Intergenic regions</b>		
Non-coding size (Mb)	2.87	2.32
Percentage not coding	31	25
(G+C) content (%)	30.3	25.6
No. of intergenic regions	4,003	3,960
Mean length (bp)	716	585
<b>RNAs</b>		
No. of tRNA genes	45	45
No. of 5S rRNA genes	6	6
No. of 5.8S, 18S and 28S	5	5
<hr/>		
(b) The proteome		
Total predicted proteins	3,994	3,952
Hypothetical proteins	2,779	2,567
<b>Gene ontology</b>		
Biological process	1,239	n.d.
Cellular component	1,265	n.d.
Molecular function	1,235	n.d.
<b>Structural features</b>		
Transmembrane domain	786	n.d.
Signal peptide	421	n.d.
Signal anchor	221	n.d.

### 3.3. Epidémiologie des infections à *Cryptosporidium* chez l'Homme

#### 3.3.1. Cycle d'infection

*Cryptosporidium* spp. sont des parasites intracellulaires qui infectent principalement les cellules épithéliales de l'estomac ou de l'intestin. L'oocyste est la forme infectieuse de ces parasites. Il est sphérique à ovoïde et contient 4 sporozoïtes mobiles ainsi qu'un organe de réserve appelé corps résiduel, protégés par une double paroi.

Le site d'infection varie selon les espèces, mais presque tout le développement de *Cryptosporidium* se produit entre les deux couches de lipoprotéines de la membrane des cellules épithéliales (Figure 12).

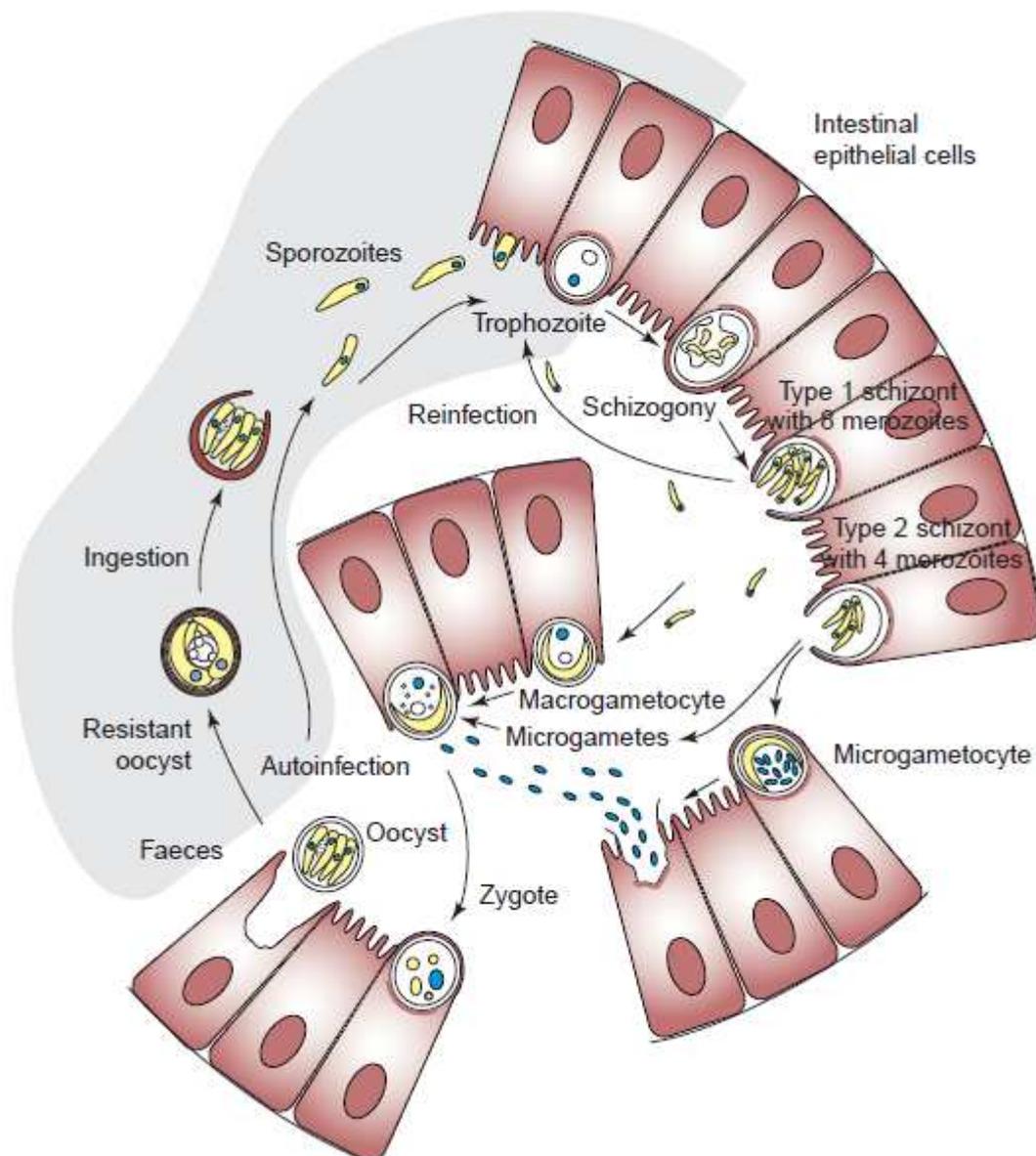


Figure 12: Cycle parasitaire de *Cryptosporidium* (Smith et al., 2005)

Les infections de *Cryptosporidium* chez l'Homme ou d'autres hôtes sensibles commencent par l'ingestion d'oocystes viables qui peut se faire par l'intermédiaire d'aliments, d'eaux contaminées ou par contact avec des animaux ou des surfaces contaminées. Lors de la digestion gastrique et duodénale, les quatre sporozoïtes libérés de chaque oocyste envahissent les cellules épithéliales et se différencient en trophozoïtes entourés par une vacuole parasitophore. Dans les cellules épithéliales, les trophozoïtes subissent plusieurs générations d'amplification asexuée appelée mérogonie, conduisant à la formation de différents types de mérontes en fonction des espèces de *Cryptosporidium*. Pour *C. parvum*, il y a deux types de mérontes. Le méronte de type 1 se développe en six à huit noyaux, donnant naissance à six à huit mérozoïtes. Ces derniers peuvent soit infecter les cellules épithéliales voisines, formant de nouveaux mérontes de type 1, soit évoluer en mérontes de type 2 qui produiront quatre noyaux, formant à terme quatre mérozoïtes. Dans ce dernier cas, les mérozoïtes se différencient en phases distinctes appelées gamétocytes (macro et micro) dans un processus appelé gamétogonie. Les nouveaux oocystes formés dans les cellules épithéliales de la fusion des macro-et micro-gamétocytes sont sporulés in situ dans un processus appelé sporogonie, et contiennent quatre sporozoïtes. Il est estimé qu'environ 20% des oocystes sont à paroi mince et peuvent s'excyster dans le tractus digestif de l'hôte, conduisant à l'infection de nouvelles cellules (auto-infection). Les 80% restants sont résistants et excrétés dans l'environnement (Xiao et Cama, 2006). Lors de l'ingestion par un nouvel hôte, ils peuvent alors déclencher une infection et le cycle recommence.

### 3.3.2. Symptômes de la cryptosporidiose

*Cryptosporidium* est responsable de la cryptosporidiose chez son hôte. Le lieu d'infection classique des parasites *Cryptosporidium* se situe au niveau des cellules épithéliales dans le petit intestin où l'infection se caractérise chez l'Homme par une atrophie modérée à sévère des villosités. L'aspect des villosités est modifié, elles sont plus courtes et plus larges qu'à la normale et peuvent parfois fusionner entre elles.

La période d'incubation de la cryptosporidiose s'étend de 5 à 10 jours mais peut durer jusqu'à 28 jours. Les symptômes les plus couramment observés sont des diarrhées abondantes et aqueuses de 3 à 12 jours, des douleurs abdominales, une perte de poids rapide et une déshydratation. Les symptômes moins fréquemment observés sont de la fièvre, des nausées et des vomissements, ainsi qu'une fatigue générale. Une personne apparemment guérie peut cependant continuer à excréter des oocystes de façon asymptomatique pendant plusieurs semaines. Pour les patients immunodéprimés, les symptômes sont aggravés et peuvent évoluer vers une forme chronique grave et l'affaiblissement des défenses immunitaires peut favoriser l'extension de la maladie à d'autres épithéliums que l'épithélium intestinal (Smith et Nichols, 2007).

### 3.3.3. $DI_{50}$ et pouvoir pathogène

Les meilleures données concernant l'infectivité de *C. parvum* proviennent d'études de contamination dose-réponse dans lesquelles un groupe de volontaires, dont le statut immunitaire est connu, ingère une dose définie d'oocystes de *Cryptosporidium* viables. Les signes cliniques et les réponses immunologiques sont suivis sur une période de quelques semaines et l' $DI_{50}$ , soit la dose d'oocystes viables nécessaire pour provoquer une infection chez 50% des volontaires, est alors définie. L'étude menée par DuPont *et al.* (1995) est l'une des premières à déterminer une valeur d' $DI_{50}$  pour *C. parvum* à 132 oocystes. Cependant cette valeur serait fonction du statut immunitaire de l'hôte avec une prédisposition à l'infection chez les personnes immunodéprimées comme les transplantés, les patients sous chimiothérapie, les patients atteints de maladies héréditaires immunosuppressives et les patients atteints du SIDA. Parmi les immunocompétents, les personnes les plus vulnérables à la cryptosporidiose seraient les personnes âgées et les jeunes enfants (Weir, 2001). Depuis, il a été montré que cette dose-réponse pouvait varier en fonction de la souche de *C. parvum* ingérée avec des valeurs d' $DI_{50}$  respectives de 12,1; 132 et 2066 oocystes mesurées avec les souches TAMU, IOWA et UCP chez des volontaires sains (Okhuysen *et al.*, 1999; Messner *et al.*, 2001).

### 3.3.4. Incidence de la cryptosporidiose

En raison de (i) leur résistance aux processus de traitement de l'eau et notamment leur résistance au chlore, (ii) d'une faible dose infectieuse et (iii) de la large distribution d'oocystes infectieux dans l'environnement, *Cryptosporidium* spp., comparés à d'autres protozoaires retrouvés dans les milieux hydriques, ont le plus grand potentiel de transmission par l'eau potable. Les principales épidémies liées à *Cryptosporidium* dans le monde sont d'origine hydrique.

La première grande épidémie recensée dans le monde est celle survenue à Milwaukee aux Etats-Unis en 1993. Cet accident est survenu suite à une modification du procédé de traitement de l'eau potable. Sur les 840 000 consommateurs exposés, il y a eu 403 000 malades, 4 400 hospitalisations et 69 décès. A partir de cette catastrophe, l'importance des infections liées à *C. parvum* a été reconnue et suscite une attention particulière en santé publique (Mac Kenzie *et al.*, 1994). D'autres épidémies ont été rapportées durant ces 20 dernières années sur tous les continents et les deux espèces majoritairement retrouvées dans les cas de cryptosporidioses humaines sont *C. hominis*, anciennement dénommé génotype I ou génotype humain qui est spécifique de l'Homme et *C. parvum*, anciennement génotype II ou génotype bovin qui infecte aussi bien l'Homme que les bovins (Morgan-Ryan *et al.*, 2002). Ces deux espèces seraient responsables de la quasi-totalité des infections dues à *Cryptosporidium*. Cependant d'autres espèces sont susceptibles elles aussi d'infecter les humains. C'est ainsi que *C. meleagridis* serait responsable d'environ 1% de toutes les infections causées par *Cryptosporidium* en Grande Bretagne et 10% au Pérou. D'autres espèces comme *C. felis*, *C. canis*, *C. suis* et *C. muris* ont également été retrouvées dans des selles humaines (Pieniazek *et al.*, 1999; Guyot *et al.*, 2001; Xiao *et al.*, 2001). Le Tableau 27 donne un aperçu de quelques cryptosporidioses incriminées dans l'eau de distribution en Europe.

**Tableau 27: Quelques cryptosporidioses associées à l'eau de distribution en Europe**

Pays	Année	Causes	Nombre de cas	Référence
Angleterre	2000	biofilms dans les canalisations du réseau de distribution de l'eau potable	58	Howe <i>et al.</i> (2002)
Angleterre	1993	eau souterraine contaminée	47	Bridgman <i>et al.</i> (1995)
France	2001	contamination par les eaux usées	563	Dalle <i>et al.</i> (2003)
Irlande	2007	fortes précipitations	182	Pelly <i>et al.</i> (2007)
Irlande	2000	contamination par les eaux usées	347	Glaberman <i>et al.</i> (2002)
Espagne	1998	Défaut dans le traitement de potabilisation	21	Rodriguez-Salinas <i>et al.</i> (2000)
Suède	1991	Contamination par des eaux de surface	600	Thulin (1991)
Etats-Unis	1993	Défaut de traitement de potabilisation	403 000	Mac Kenzie <i>et al.</i> (1994)

En France, trois épidémies liées à *Cryptosporidium* ont été recensées. La première est survenue à Sète dans l'Hérault en 1998 touchant au minimum 150 enfants des écoles maternelles et primaires. *Cryptosporidium* a été identifié dans 17% des selles d'enfants ayant déclaré une gastro-entérite (Guyonnet et Claudet, 2002). La deuxième épidémie est survenue à Dracy le Fort en Saône et Loire en 2001. L'épidémie de gastro-entérites serait liée à un dysfonctionnement d'une valve ce qui aurait entraîné une contamination du réseau de distribution par un reflux d'eaux usées. Différents germes ont été retrouvés dans les selles des personnes malades: *C. hominis* (61,3 %), les rotavirus (20 %), les entérovirus (14 %), *Campylobacter jejuni* (14 %), *E. coli* entéropathogène (12 %), et les adénovirus (6 %). Cependant, seuls des oocystes de *Cryptosporidium* ont été isolés de l'eau. 480 cas auraient été recensés lors de cette épidémie (InVS, 2003a). En 2003, à Divonne-les-Bains en Rhône Alpes, 800 cas de cryptosporidioses ont été recensés lors d'une épidémie liée à une contamination microbiologique du réseau de distribution. Une concentration de 10 à 20 oocystes/L dans l'eau avec la présence de *C. parvum* et *C. hominis* ont été retrouvées dans l'eau de distribution (InVS, 2003b).

### 3.4. Niveau de contamination du milieu hydrique par les parasites *Cryptosporidium*

#### 3.4.1. Eaux de forte turbidité

Le niveau de contamination des eaux environnementales est largement documenté et les résultats des différentes études réalisées dans divers pays sont présentés dans le Tableau 28. Le pourcentage d'échantillons positifs s'échelonnent de 0 à 100% et la concentration en oocystes varie de 0 à 1350 oocystes/L en fonction des études.

Certaines études ont mis en évidence l'influence de rejets urbains ou agricoles sur le niveau de contamination du milieu hydrique mais également sur la distribution des espèces de *Cryptosporidium*. Ainsi, dans une étude menée dans des eaux de rivières en Espagne, il a été montré que la concentration en oocystes était plus importante au printemps et en été, avec une prédominance des espèces pathogènes pour l'Homme, *C. parvum* et *C. hominis* (Castro-Hermida *et al.*, 2009). En Chine, Feng *et al.* (2011) ont retrouvé les espèces *C. andersoni* dans 82,4% d'échantillons, *C. suis* dans 41,2%, *C. baley* dans 11,8%, *C. meleagridis* dans 5,9% et *C. hominis* dans 5,9%. De nombreuses fermes animales se trouvant proches des rivières, les auteurs ont donc conclu que les fermes animales pourraient être la source majeure de contamination de la rivière puisque la majorité des espèces détectées étaient spécifiques des bovins, des porcins et des volailles.

Peu de données sont publiées concernant la viabilité des oocystes retrouvés dans les eaux. Cependant, Lobo *et al.* (2009) ont estimé que sur les 37 échantillons d'eaux de surface retrouvés positifs en *Cryptosporidium*, 34,8% d'entre eux contenaient des oocystes viables. Dans leur étude, LeChevallier *et al.* (2003) estiment que 37% des oocystes détectés dans les eaux naturelles seraient infectieux.

### 3.4.2. Eaux de faible turbidité

Les stations de potabilisation de l'eau captent l'eau brute dans les milieux naturels comme les eaux de rivière, les lacs et les eaux souterraines qui subissent des traitements chimiques et physiques afin d'éliminer les pathogènes initialement présents dans ces eaux brutes. C'est pourquoi, la plupart des échantillons d'eau potable sont très peu contaminés en *Cryptosporidium* avec des concentrations de 0 à 3 oocystes/L (Tableau 29). La variabilité de la quantité d'oocystes retrouvées dans ces échantillons provient principalement des procédés de traitement des eaux brutes qui sont plus ou moins efficaces sur l'inactivation et l'élimination des oocystes de *Cryptosporidium* infectieux ou viables. Cependant, même si la détection de *Cryptosporidium* dans l'eau potable est rare et les concentrations faibles, cette matrice représente la voie de contamination la plus incriminée dans les épidémies de cryptosporidioses d'origine hydrique.

Tableau 28: Niveau de contamination des eaux environnementales en oocystes de *Cryptosporidium*

Pays	Nature de l'échantillon	Méthode concentration	Méthode de purification	Méthode de détection	Echantillons positifs	Concentrations en oocystes	Référence
France	Rivières	Cartouche en polyéthersulfone	IMS	IFA	45,7% (74/162)	0,5 à 245,4 oocystes/10 L	Mons <i>et al.</i> (2009)
	Rivières	Cartouche en polyéthersulfone	IMS	IFA	19% en été; 25% en automne, 44% en hiver	34 ± 3,4 oocystes/100 L	Cavereau <i>et al.</i> (2009)
	Eaux souterraines	Cartouche en polyéthersulfone	IMS	IFA	1,8% (2/108)	5 oocystes/100 L	Cavereau <i>et al.</i> (2009)
	Rivières	Cartouche en polyéthersulfone	IMS	IFA	78,9% (30/38)	1,7 à 34 oocystes/10 L	Touron <i>et al.</i> (2007)
Luxembourg	Eaux de surface	Cartouche en polyéthersulfone	IMS	IFA	71,4% (5/7)	0,03 à 0,1 oocyste/L	Skraber <i>et al.</i> (2009)
	Eaux souterraines	Cartouche en polyéthersulfone	IMS	IFA	0% (0/7)	NR	Skraber <i>et al.</i> (2009)
Espagne	Rivières	Membranes compressées	IMS	IFA, PCR-RFLP	53,4% (62/116)	2 à 1350 oocyst/L	Castro-Hermida <i>et al.</i> (2009)
	Rivières	Membranes compressées	IMS	IFA, PCR-RFLP	87,5% (14/16)	0 à 10,5 oocystes/L	Castro-Hermida <i>et al.</i> (2008b)
Portugal	Eaux de surface	Cartouche en polyéthersulfone	IMS	IFA	53,6% (37/69)	NR	Lobo <i>et al.</i> (2009)
Russie et Bulgarie	Rivières	Cartouche en polypropylène	Flottation sur saccharose	IFA	30,9%	1 à 55 oocystes/L	Karanis <i>et al.</i> (2006)
Finlande	Rivières, lacs	Membranes en polycarbonate	IMS	IFA, PCR	10,1% (14/139)	NR	Hörman <i>et al.</i> (2004)
Egypte	Rivières	Membrane en nitrocellulose	/	Epifluorescence	71,4% (10/14)	NR	Ali <i>et al.</i> (2004)
Taiwan	Eaux de surface	Cartouche en polyéthersulfone	IMS	IFA, PCR	3,3% (1/30)	NR	Hsu <i>et al.</i> (2008)
Chine	Eaux de source	Cartouche en polyéthersulfone	IMS	IFA	32%	1,8 à 22 oocystes/10 L ( moy= 5,2 oocystes/10 L)	Feng <i>et al.</i> (2011)
Japon	Rivières	Cartouche en polyéthersulfone	Gradient de densité sur saccharose	IFA	50% (14/28)	0,01 à 0,8 oocystes/L	Tsushima <i>et al.</i> (2001)
Australie	Rivières	Cartouche en polyéthersulfone	IMS	IFA	9% (1/11)	36 oocystes/7,1 L	Simmons III <i>et al.</i> (2001)

Pays	Nature de l'échantillon	Méthode concentration	Méthode de purification	Méthode de détection	Echantillons positifs	Concentrations en oocystes	Référence
	Rivières	Ultrafiltration tangentielle	IMS	IFA	18,2% (2/11)	3 à 8 oocystes/10 L	Simmons III <i>et al.</i> (2001)
Canada	Eaux de surface	cartouche polypropylène 1µm	Flottation sur solution de Percoll-saccharose	IFA	87% (74/85)	0,07 à 484 oocystes/L (moy= 2,7 oocystes/L)	LeChevallier <i>et al.</i> (1991)

Tableau 29: Niveau de contamination des eaux d'alimentation en oocystes de *Cryptosporidium*

Pays	Nature de l'échantillon	Méthode concentration	Méthode de purification	Méthode de détection	Echantillons positifs	Concentrations en oocystes	Référence
Luxembourg	Eau potable	Cartouche en polypropylène	IMS	IFA	0% (0/14)	NR	Skraber <i>et al.</i> (2009)
Espagne	Eau traitée	Membranes compressées	IMS	IFA, PCR	75% (12/16)	0 à 3 oocystes/L	Castro-Hermida <i>et al.</i> (2008a)
Portugal	Eau potable	Cartouche en polypropylène	IMS	IFA	41,5% (44/106)	NR	Lobo <i>et al.</i> (2009)
	Eau potable	Membranes compressées	IMS	IFA, PCR	10,2% (17/167)	0,1 à 12,7 oocystes/10 L	Almeida <i>et al.</i> (2010)
Russie et Bulgarie	Eau du robinet	Cartouche en polypropylène	Flottation sur saccharose	IFA	12,1%	1 à 3 oocystes/250 L	Karanis <i>et al.</i> (2006)
Egypte	Eau du robinet	Membrane en nitrocellulose	/	PCR	0% (0/3)	NR	Ali <i>et al.</i> (2004)
	Eau potable	Membrane en nitrocellulose	/	PCR	0% (0/3)	NR	Ali <i>et al.</i> (2004)
Chine	Eau du robinet	Cartouche en polypropylène	IMS	IFA	6,7% (2/30)	NR	Feng <i>et al.</i> (2011)

### 3.4.3. *Cryptosporidium* et indicateurs de contamination fécale

Comme mentionné précédemment, la qualité microbiologique des eaux est estimée à l'aide d'indicateurs bactériens de contamination fécale. Des corrélations entre les indicateurs bactériens et les parasites *Cryptosporidium* ont pu être mises en évidence dans les eaux de rivière (LeChevallier *et al.*, 1991; Payment *et al.*, 2000; Touron *et al.*, 2007), ou dans les eaux potables (Carmena *et al.*, 2007). D'autres études au contraire n'ont révélé aucune corrélation (Rose et Gerba, 1991; Chauret *et al.*, 1995; Briancesco *et al.*, 1999; Hörman *et al.*, 2004; Mons *et al.*, 2009).

D'une manière générale, les indicateurs de contamination fécale, notamment *E. coli*, ne résistent pas aussi longtemps dans l'environnement que les oocystes de *Cryptosporidium* ou les kystes de *Giardia*, et sont plus sensibles aux désinfectants employés dans le processus de traitement de potabilisation de l'eau (Medema *et al.*, 1997; Edberg *et al.*, 2000). De ce fait, l'absence de bactéries indicatrices ne révèle pas nécessairement l'absence d'une contamination par les protozoaires entériques (Smith *et al.*, 1989; Craun *et al.*, 1997). L'épidémie de Milwaukee survenue en 1993, en est un bel exemple. En effet, des oocystes de *Cryptosporidium* ont été détectés alors qu'aucun indicateur de contamination fécale tel que *E. coli* n'a été mis en évidence dans l'eau d'alimentation à l'origine de l'épidémie (Mac Kenzie *et al.*, 1994). Les spores de bactéries anaérobies sulfite-réductrices (ASR), telles que celles de *Clostridium perfringens*, fréquemment présentes dans les eaux brutes et qui ont un comportement similaire à celui des parasites vis-à-vis de la filtration, sont recherchées dans les eaux potables traitées dans le but de mettre en évidence une inefficacité de la filtration dans le processus de potabilisation et, par la même, la présence potentielle de *Cryptosporidium* spp. dans l'eau potable.

## 3.5. Persistance des oocystes de *Cryptosporidium* dans l'eau

*Cryptosporidium* est un pathogène reconnu pour être l'un des micro-organismes le plus résistant aux facteurs environnementaux et aux procédés de traitement de l'eau.

### 3.5.1. Survie des oocystes dans les conditions environnementales

Le facteur le plus étudié dans l'environnement est la température avec notamment des études de persistance de l'infectiosité et de la viabilité de *C. parvum* dans différentes matrices hydriques. D'une manière générale, il semble que plus la température est basse, plus les oocystes restent viables ou infectieux (Fayer et Nerad, 1996; King *et al.*, 2005; Ives *et al.*, 2007; Reinoso *et al.*, 2008).

Toutefois, il est constaté une grande variabilité quant au taux de survie mesurés notamment en fonction de la matrice hydrique, de la méthode employée pour mesurer l'infectiosité ou la viabilité, ainsi que de la quantité d'oocystes utilisée dans les expériences. A titre d'exemple, 48 à 200 jours sont nécessaires pour que 99% des oocystes perdent leur infectiosité dans une eau de nappe souterraine à 20°C alors qu'il faut 30 à 45 jours pour observer cette même perte dans l'eau de rivière à la même température (Ives *et al.*, 2007). Dans les mêmes conditions, 94% des oocystes perdent leur viabilité au bout de 176 jours (Robertson *et al.*, 1992), et la perte complète de l'infectiosité est constatée après 84 jours d'incubation (King *et al.*, 2005). De plus, simultanément à la diminution du nombre de parasites au cours du temps dans l'eau de rivière, King *et al.* (2005) constatent la formation d'agrégats d'oocystes par immunofluorescence. Ce phénomène serait une réponse à la prédation des oocystes par les rotifères présents dans les eaux de surface.

### **3.5.2. Persistance face aux procédés de traitement de potabilisation**

Les eaux souterraines et /ou les eaux de surface sont employées comme ressources pour la production d'eau potable. Le niveau de contamination de ces eaux en parasites va ainsi dépendre du type de ressource utilisée et de son niveau de protection.

Les eaux souterraines, relativement protégées, sont naturellement filtrées à travers le sol et ne subissent généralement qu'un traitement chimique, alors que les eaux de surface, potentiellement plus contaminées en parasites et relativement riches en matières en suspension, subissent un traitement physique combiné à un traitement chimique (désinfection).

#### **3.5.2.1. Traitement physique**

De nombreux traitements physiques sont employés lors du processus de potabilisation et l'efficacité d'élimination des oocystes est variable (Tableau 30). Parmi eux, seul le traitement conventionnel de coagulation/floculation/séparation/filtration sera décrit dans ce paragraphe.

Tableau 30: Efficacité ( $\log_{10}$ ) des différentes étapes de traitement de l'eau concernant l'élimination des oocystes de *Cryptosporidium* sp. et des kystes de *Giardia* sp. en fonction de la turbidité de l'eau en sortie d'étape de traitement (d'après AFSSA, 2001)

Etape de traitement	Turbidité de l'eau (NTU)	Elimination de <i>Cryptosporidium</i> et <i>Giardia</i> ( $\log_{10}$ )
Sédimentation simple	<1	<0,5
Filtration simple	<0,5	0,5 à 1
Coagulation/floculation/décantation	<2	0,5
Décantation lamellaire	<1,5	0,5 à 1
Coagulation sur filtre	<0,5	5
Décantation/lit de boue pulsée	<1	1,5 à 2
Décantation/floc lesté	<1	1,5 à 2
Flottation	<0,5	2 à 3
Coagulation/floculation/séparation/filtration	<0,1	3 à 4
Filtration lente biologique	<0,1	4
Filtration terre diatomée	<0,1	4 à 5
Floculation/décantation/filtration lente	<0,1	4 à 5
Microfiltration 0,5 $\mu\text{m}$	<0,1	>5
Ultrafiltration	<0,1	>5

Pour rappel la coagulation-floculation-séparation consiste à ajouter dans l'eau brute des sels métalliques permettant de supprimer les répulsions entre les colloïdes en les neutralisant. L'ajout de floculant va permettre aux particules colloïdales de s'agglomérer en floccs pour qu'elles sédimentent avant d'être éliminées. L'eau décantée est alors filtrée sur sable, anthracite, charbon actif ou une combinaison de ces éléments. L'abattement des oocystes de *Cryptosporidium* et des kystes de *Giardia*, estimé pour ce type de procédé, est de 3 à 4  $\log_{10}$  pour une turbidité de l'eau inférieure à 0,1 NTU.

Une désinfection par une action du chlore, dioxyde de chlore, monochloramine, ozone ou ultraviolets est ensuite réalisée afin d'éliminer les micro-organismes ayant passé la barrière de traitement physique.

### 3.5.2.2. La désinfection

De nombreuses études se sont intéressées à la persistance de *Cryptosporidium* aux traitements chimiques utilisés lors du traitement de l'eau potable. Dans cette partie, seuls les deux principaux traitements employés lors du processus de potabilisation, la chloration et l'ozonation, seront décrits.

## 3.5.2.2.1. La chloration

Les traitements de chloration par le chlore ou le dioxyde de chlore sont des traitements chimiques capables d'éliminer plus de 99% des bactéries mais semblent inefficaces sur les oocystes de *Cryptosporidium*. Il a été montré qu'une dose de 80 mg/L pendant 90 minutes était nécessaire pour inactiver 99% des oocystes (Korich *et al.*, 1990). D'autres auteurs ont rapporté qu'un CT de 1000 mg/L.min de dioxyde de chlore permet d'obtenir un abattement compris entre 0,5 log<sub>10</sub> et 2 log<sub>10</sub> (Chauret *et al.*, 2001), alors que la dose réglementaire employée pour la production d'eau potable est de 12 mg/L.min.

Les résultats d'inactivation des oocystes de *Cryptosporidium* de quelques études ont été rapportés dans le Tableau 31. De nombreux facteurs tels que l'âge des oocystes (Shields *et al.*, 2008), la souche de *Cryptosporidium* (Chauret *et al.*, 2001), la température de l'eau (Finch et Li, 1999) ou encore le pH (WHO, 2004) ont un effet sur la persistance des oocystes dans l'eau .

**Tableau 31: Valeurs de CT (mg/L.min) mesurées pour une inactivation des oocystes de *Cryptosporidium* par un traitement au dioxyde de chlore (d'après Chauret *et al.*, 2001)**

Matrice	pH	Température (°C)	CT (mg/L.min)	Inactivation (log <sub>10</sub> )	Infectiosité/Viabilité	Référence
PBS	6	22	120	1,8-2.1	souris	Finch et Li (1999)
PBS	7	25	78	1	souris	Korich <i>et al.</i> (1990)
PBS	8	22 ± 1	60	0,99	souris	Liyanage <i>et al.</i> (1997)
PBS	8	22 ± 1	122	1,57	souris	Liyanage <i>et al.</i> (1997)
PBS	8	22 ± 1	383	>3,22	souris	Liyanage <i>et al.</i> (1997)
Eau distillée	8	20	150	2	in vitro excystation	Chauret <i>et al.</i> (2001)
Eau distillée	8	21	1000	2	culture cellulaire	Chauret <i>et al.</i> (2001)
Eau distillée	8	21	1000	0,5	in vitro excystation	Chauret <i>et al.</i> (2001)
Eau distillée	8	21	550	2	culture cellulaire	Chauret <i>et al.</i> (2001)
Eau distillée	8	21	75	2	culture cellulaire	Chauret <i>et al.</i> (2001)

## 3.5.2.2.2. L'ozonation

Le traitement à l'ozone semblerait plus efficace que la chloration pour l'élimination des oocystes de *Cryptosporidium* (Tableau 32).

**Tableau 32: Efficacité des traitements chimiques pour l'inactivation de *Cryptosporidium* (d'après Baudin et al. (2001))**

Traitement	Traitement lors de la potabilisation		En conditions expérimentales	
	CT (mg/L.min)	Abattement ( $\log_{10}$ )	CT (mg/L.min) pour un abattement d'1 $\log_{10}$	CT (mg/L.min) pour un abattement de 2 $\log_{10}$
Dioxyde de chlore	12	0	52 à 200	140 à 520
Chlore	15	0	7000	/
Ozone	1,6	0,5	2,9	5,3

Les doses nécessaires pour observer un abattement de 2  $\log_{10}$  de la viabilité des oocystes est de 1 à 2 mg/L pendant 5 à 8 minutes (Peeters *et al.*, 1989; Korich *et al.*, 1990) mais l'efficacité de l'ozone est réduite lorsque la température de l'échantillon diminue (Finch *et al.*, 1993; Hirata *et al.*, 2001). Ainsi, la valeur du CT doit être augmentée de 4,2 pour un abattement de 2  $\log_{10}$  lorsque la température diminue de 10°C (Hirata *et al.*, 2001). Le Tableau 33 présente les valeurs de CT nécessaires pour l'inactivation des oocystes en fonction de la température.

**Tableau 33: Valeurs de CT (mg/mL.min) pour l'inactivation des oocystes de *Cryptosporidium* par ozonation (WHO, 2004)**

Inactivation ( $\log_{10}$ )	Température (°C)		
	1°C	13°C	22°C
0,5	6	2	0,6
1	12	4	1,5
1,5	24	8	3
2	40	11	4,4
2,5	45	15	6
3	62	22	8

### 3.6. Détection de *Cryptosporidium* dans l'eau

Dans l'environnement, les parasites sont en trop faible quantité pour pouvoir les détecter directement. Il est nécessaire de réaliser une étape de concentration qui a pour but de concentrer sous un faible volume les parasites présents dans l'échantillon à analyser.

### 3.6.1. Méthode de concentration de *Cryptosporidium*

Ce paragraphe décrit les techniques de concentration des oocystes de *Cryptosporidium* présents dans des échantillons hydriques. La concentration est une étape indispensable pour l'analyse de grands volumes d'eau contenant de faibles concentrations en parasites.

#### 3.6.1.1. Les méthodes de concentration primaire

Les techniques de concentration actuellement utilisées pour la recherche de *Cryptosporidium* dans les échantillons hydriques sont la filtration, la floculation et la centrifugation en flux continu.

##### 3.6.1.1.1. La filtration

La technique de filtration fait appel à la capture des oocystes par rétention sur un support qui peut être une cartouche filtrante ou une membrane.

Les cartouches de filtration sont les supports de filtration les plus utilisés pour concentrer les oocystes, et l'utilisation de cartouche en polyéthersulfone est recommandée dans la norme française NF T90-455 (AFNOR, 2001) pour la détection des oocystes de *Cryptosporidium* et les kystes de *Giardia*. Le principe repose sur la filtration de l'échantillon à travers la cartouche et la récupération des oocystes se fait par l'utilisation d'une solution détergente. Les rendements obtenus sur des eaux faiblement chargées sont de 0,0% à 118,1% alors que ceux observés dans les eaux de surface oscillent entre 0,0% et 87% (Tableau 34 et Tableau 35).

Comparées aux membranes, les cartouches de filtration permettent en général l'analyse de plus grands volumes, notamment lorsque les eaux sont chargées en matières en suspension, et les rendements de concentration sont meilleurs (Hsu *et al.*, 2001).

Lorsque le support de filtration est une membrane, les oocystes sont récupérés par raclage ou lavage du support à l'aide d'une solution éluante. Parmi les nombreuses membranes employées pour la concentration des oocystes de *Cryptosporidium*, la membrane en ester de cellulose permet d'obtenir des rendements de récupération de 30 à 40% et les membranes en polycarbonate de 22 à 36% lorsque les expérimentations sont effectuées dans 10 L d'eau de réseau artificiellement contaminée avec 75 oocystes/L (Shepherd et Wyn-Jones, 1996). En outre, la filtration sur une membrane électropositive, généralement utilisée pour la concentration des virus, a été testée pour la concentration des oocystes dans l'eau potable et des rendements de concentration pouvant atteindre jusqu'à  $50 \pm 9,9\%$  ont été obtenus (Ali *et al.*, 2004; Polaczyk *et al.*, 2007). Toutefois, bien que les membranes présentent l'avantage d'avoir un faible coût, les taux de récupération des oocystes sont très variables en fonction de la nature du support membranaire, de la composition de la solution éluante mais également de la nature de l'échantillon d'eau. Ainsi, lorsque la turbidité de l'échantillon est plus forte, comme dans les eaux de surface, le volume analytique ainsi que les rendements de concentration restent faibles en raison d'un colmatage rapide de la membrane due à la présence de débris (Wohlsen *et al.*, 2004).

Dans le procédé d'ultrafiltration, la filtration est effectuée dans un flux tangentiel à travers des membranes où l'échantillon est remis en circulation jusqu'à ce que le facteur de concentration souhaité soit atteint. Une solution éluante est alors utilisée pour récupérer les oocystes. Les filtres utilisés en ultrafiltration sont capables de capturer les pathogènes et les molécules au-dessus d'un poids moléculaire, alors que les molécules de petite taille passent au travers du filtre. L'évaluation de ce système de filtration a été effectuée par différents auteurs (Simmons III *et al.*, 2001; Lindquist *et al.*, 2007; Polaczyk *et al.*, 2008) et les rendements oscillent entre 21 et  $111 \pm 11\%$  en fonction des études (Tableau 34 et Tableau 35). Le colmatage des membranes lors de la filtration d'échantillons d'eau fortement turbides est la principale limite de cette technique.

#### 3.6.1.1.2. La floculation

Au cours de la floculation, les oocystes sont piégés dans un maillage de flocculat constitué généralement par des particules de carbonate de calcium qui vont culoter les oocystes. Après élimination du surnageant, les oocystes sont récupérés par la dissolution des particules de carbonate de calcium à l'aide d'une solution acide (Vesey *et al.*, 1993). Les rendements de concentration obtenus, aussi bien pour les eaux faiblement chargées que les eaux de surface, sont supérieurs à ceux obtenus par filtration sur membrane ou cartouche (Tableau 34 et Tableau 35). Néanmoins cette méthode présente l'inconvénient d'être longue puisque plusieurs heures sont nécessaires à la sédimentation du flocculat.

#### 3.6.1.1.3. La centrifugation

La centrifugation en flux continu est une méthode ne faisant pas intervenir la taille des parasites. Le traitement d'un culot de volume important lors de l'analyse d'eau chargée ainsi que son faible débit font que cette technique est peu utilisée. Cependant, les modifications apportées par Zuckerman *et al.* (1999) permettent d'obtenir des rendements de  $55,3 \pm 2,1\%$  et de  $26,8 \pm 4\%$  respectivement dans les eaux potables et les eaux de rivière (Tableau 34 et Tableau 35).

### 3.6.1.2. Les techniques de purification des oocystes

Les techniques de purification, appelées encore méthodes de concentration secondaire, permettent de récupérer les oocystes présents dans le concentrat sous un volume encore plus faible. Pour cela, différentes techniques ont été développées: la séparation immunomagnétique, les méthodes de flottation et de gradient de densité ou la cytométrie en flux.

#### 3.6.1.2.1. La séparation immunomagnétique

La séparation immunomagnétique utilise des anticorps liés à des particules magnétiques, contre les antigènes de surface du parasite. Cette technique est la méthode de reconcentration préconisée dans la norme NF T90-455 (AFNOR, 2001) en complément d'une concentration par filtration sur cartouche en polyéthylène sulfoné. Les rendements obtenus par cette méthode normée sont de 41,3% et 56,1% respectivement dans l'eau de distribution et l'eau de rivière.

Bien que son principe soit rapide et spécifique, l'efficacité de la récupération des parasites serait fonction de nombreux facteurs tels que l'affinité des anticorps pour le parasite, la taille des billes magnétiques (Ware *et al.*, 2003), ainsi que de la nature du concentrat. A titre d'exemple, Bukhari *et al.* (1998) ont montré que le rendement de l'IMS était inversement corrélé avec la turbidité de l'échantillon. Ils observent des rendements de récupération de 0,2% à 83% selon la pureté du concentrat.

#### 3.6.1.2.2. *La cytométrie en flux*

La technique de cytométrie en flux permet de déterminer la taille, et la densité interne relative. Les oocystes sont alors triés et donc purifiés. Au cours du tri, un paramètre choisi est discriminant et la valeur de ce paramètre est mesurée pour chaque particule qui traverse le faisceau. Si cette valeur est cohérente avec le seuil défini, la particule est prise en compte et le logiciel enregistre la mesure, sinon, elle est ignorée. Un tri basé d'une part sur la fluorescence, et d'autre part sur la taille relative ou la complexité interne relative, serait la meilleure combinaison pour réaliser une discrimination entre les oocystes de *Cryptosporidium* et les débris (Vesey *et al.*, 1994). Les oocystes triés peuvent être déposés sur une membrane en polycarbonate pour permettre un dénombrement par microscopie. Le risque d'obstruction du capillaire lors de l'analyse d'échantillons environnementaux ainsi que l'étape de filtration susceptible d'entraîner des pertes d'oocystes sont les principaux inconvénients de cette méthode.

#### 3.6.1.2.3. *Les méthodes de flottation et gradient de densité*

Les méthodes de flottation et gradient de densité reposent sur le principe de la récupération des oocystes en fonction de leur gradient de densité.

Pour la méthode de flottation, la solution à purifier est déposée sur la surface d'une solution de densité supérieure à celles des oocystes. Par centrifugation, les éléments de densité supérieure à celle de la solution vont sédimenter alors que les éléments dont la densité est inférieure vont rester à la surface.

Les méthodes de gradient de densité sont similaires à celles de flottation, mais dans ce cas, les solutions de densité décroissante sont déposées par pipetage dans un tube de centrifugation. La suspension aqueuse contenant les parasites, est alors déposée et centrifugée. A une vitesse de centrifugation et pendant un temps adaptés, les oocystes forment une bande de densité spécifique qui les sépare des autres éléments plus lourds ou plus légers. L'inconvénient de cette méthode réside dans l'utilisation d'échantillons de faible volume. De plus, les échantillons fortement concentrés peuvent perturber la formation du gradient (McCuin *et al.*, 2000) et le rendement de la méthode serait influencé par la viabilité des oocystes, avec de meilleurs rendements constatés lorsque les oocystes sont viables (Bautista *et al.*, 1999).

L'obtention de rendements variables et le manque de spécificité, notamment dans les eaux chargées, ont conduit à l'abandon de cette méthode.

Tableau 34: Rendements de techniques de concentration des oocystes de *Cryptosporidium* à partir d'eaux de faible turbidité

Méthode de filtration	Méthode de purification	Méthode de détection	Type d'eau	Volume analysé	Oocystes/L	Rendements	Références
<b>Filtration sur membrane</b>							
• Acétate de cellulose (porosité 1,2 µm)	Non	IFA	Eau du robinet	10 L	42,4	37,8% (de 24,5 à 55,7%)	Shepherd et Wyn-Jones (1995)
	Non	IFA	Eau du robinet	10 L	75	39,7% (de 32 à 44%)	Shepherd et Wyn-Jones (1996)
	IMS	IFA	Eau distillée	10 L	10	16,2 ± 2,8%	Wohlsen <i>et al.</i> (2004)
• Nitrate de cellulose - porosité 3 µm	Non	IFA	Eau du robinet	10 L	75	29,3% (de 24 à 36%)	Shepherd et Wyn-Jones (1996)
	Non	IFA	Eau du robinet	10 L	42,4	24,1% (de 19,3 à 31,6%)	Shepherd et Wyn-Jones (1995)
	Non	IFA	Eau du robinet	10 L	42,4	10,3% (de 6,1 à 14,6%)	Shepherd et Wyn-Jones (1995)
• Ester de cellulose (porosité 1,2µm)	Non	IFA	Eau distillée	5 L	1	50,2 ± 18,5%	McCuin <i>et al.</i> (2000)
	Non	IFA	Eau distillée	5 L	20	13,7 ± 2,6%	McCuin <i>et al.</i> (2000)
	IMS	IFA	Eau distillée	10 L	10	14,7 ± 7,6%	Wohlsen <i>et al.</i> (2004)
• Polycarbonate - porosité 2µm	Non	IFA	Eau du robinet	10 L	82	6% (de 4,4 à 7%)	Shepherd et Wyn-Jones (1995)
	Non	IFA	Eau du robinet	10 L	74	27,7% (de 24 à 32%)	Shepherd et Wyn-Jones (1996)
	Flottation saccharose)	(Percoll- IFA	Eau potable	20 L	50-500	17,5 ± 3,2%	Hsu <i>et al.</i> (2001)
•							
•							
•							
•							
•							

Méthode de filtration	Méthode de purification	Méthode de détection	Type d'eau	Volume analysé	Oocystes/L	Rendements	Références	
• Nylon + fibre de verre -Electropositive								
	IMS	IFA	Eau du robinet	1 L	$1 \times 10^6$	$32 \pm 6,5\%$	Polaczyk <i>et al.</i> (2007)	
	IMS	IFA	Eau du robinet	1 L	$1 \times 10^3 - 1 \times 10^4$	$50 \pm 9,9\%$	Polaczyk <i>et al.</i> (2007)	
	Flottation saccharose)	(Percoll-	IFA	Eau du robinet	400 L	25	$28,4 \pm 5,9\%$	Watt <i>et al.</i> (2002)
	Flottation saccharose)	(Percoll-	IFA	Eau du robinet	400 L	25	$14,2 \pm 5\%$	Watt <i>et al.</i> (2002)
• Polyéthersulfone (porosité 0,8µm)								
	Non	IFA	Eau du robinet	10 L	75	24% (de 21,3 à 26,7%)	Shepherd et Wyn-Jones (1996)	
<b>Filtration sur cartouche</b>								
• Polyéthersulfone (porosité 1 µm)								
	IMS	IFA	Eau distillée	10 L	10-15	$46 \pm 18\%$	Simmons III <i>et al.</i> (2001)	
	IMS	IFA	Eau distillée	10 L	10	$0,2 \pm 0,4\%$	Wohlsen <i>et al.</i> (2004)	
	IMS	IFA	Eau potable	1 000 L	0,05	$40,7 \pm 21,1\%$	McCuin et Clancy (2003)	
	IMS	IFA	Eau potable	1 000 L	0,3	$50,2 \pm 5,5\%$	McCuin et Clancy (2003)	
	IMS	IFA	Eau potable	1000 L	0,5	$50,5 \pm 22,9\%$	McCuin et Clancy (2003)	
	IMS	IFA	Eau potable	1 000 L	1	$43,6 \pm 5,7\%$	McCuin et Clancy (2003)	
	IMS	IFA	Eau du robinet	100 L	1	41,3%	AFNOR (2001)	
	IMS	qPCR	Eau du robinet	20 L	5	$75,8 \pm 42,3\%$	Fontaine et Guillot (2003)	
	IMS	qPCR	Eau du robinet	20 L	8,3	$58,2 \pm 33,4\%$	Fontaine et Guillot (2003)	
	IMS	qPCR	Eau du robinet	20 L	76,8	$69,7 \pm 22,3\%$	Fontaine et Guillot (2003)	
	IMS	qPCR	Eau du robinet	20 L	775	$71,1 \pm 14\%$	Fontaine et Guillot (2003)	
	IMS	qPCR	Eau du robinet	100 L	0,083	$78,2 \pm 61,8\%$	Fontaine et Guillot (2003)	
	IMS	qPCR	Eau du robinet	100 L	0,8	$84,5 \pm 9,7\%$	Fontaine et Guillot (2003)	
	IMS	qPCR	Eau du robinet	100 L	0,8	$78,5 \pm 20,4\%$	Fontaine et Guillot (2003)	
	Non	IFA	Eau du robinet	10 L	environ 12	69,70%	Matheson <i>et al.</i> (1998)	

Méthode de filtration	Méthode de purification	Méthode de détection	Type d'eau	Volume analysé	Oocystes/L	Rendements	Références	
<ul style="list-style-type: none"> <li>Polypropylène               <ul style="list-style-type: none"> <li>- porosité 1 µm</li> <li>- porosité 15 µm</li> </ul> </li> </ul>	Non	IFA	Eau potable	45 L	580	5,5 ± 0,8%	Zuckerman <i>et al.</i> (1999)	
	Non	IFA	Eau du robinet	100 L	53,4	13,3% (de 9,6 à 16,5%)	Shepherd et Wyn-Jones (1995)	
	Flottation saccharose)	(Percoll- IFA	Eau potable	40 L	$1 \times 10^3$ -1 x $10^4$ /L	9,8 ± 4,5%	Hsu <i>et al.</i> (2001)	
	Flottation saccharose)	(Percoll- IFA	Eau du robinet	400 L	25	19,1 ± 18,2%	Watt <i>et al.</i> (2002)	
	Flottation saccharose)	(Percoll- IFA	Eau du robinet	100 L	53,4	5,8% (de 0,6 à 11,6%)	Shepherd et Wyn-Jones (1995)	
	Flottation saccharose)	(Percoll- IFA	Eau du robinet	100 L	53,4	2,1% (de 0,4 à 3,9%)	Shepherd et Wyn-Jones (1995)	
	Non	IFA	Eau du robinet	100 L	75	11,2% (de 4,5 à 16,1%)	Shepherd et Wyn-Jones (1996)	
	Non	IFA	Eau du robinet	100 L	53,4	5% (de 2,2 à 6,5%)	Shepherd et Wyn-Jones (1995)	
	Flottation saccharose)	(Percoll- IFA	Eau du robinet	100 L	53,4	0,7% (de 0,0 à 1,9%)	Shepherd et Wyn-Jones (1995)	
	<ul style="list-style-type: none"> <li>Membranes compressées</li> </ul>	IMS	IFA	Eau potable	1 000 L	0,3	58,2 ± 8,5%	McCuin et Clancy (2003)
		IMS	IFA	Eau potable	1 000 L	0,5	58,8 ± 12,7%	McCuin et Clancy (2003)
		IMS	IFA	Eau potable	1 000 L	1	68,6 ± 20%	McCuin et Clancy (2003)
IMS		IFA	Eau distillée	10 L	10	28,2 ± 8%	Wohlsen <i>et al.</i> (2004)	
<b>Ultrafiltration tangentielle</b>								
	IMS	IFA	Eau du robinet	100 L	1-10	21 à 67%	Lindquist <i>et al.</i> (2007)	
	Non	qPCR	Eau du robinet	100 L	10	78 ± 21% à 107 ± 6%	Polaczyk <i>et al.</i> (2008)	
	Non	qPCR	Eau du robinet	100 L	$1 \times 10^4$	75 ± 6% à 111 ± 11%	Polaczyk <i>et al.</i> (2008)	

Méthode de filtration	Méthode de purification	Méthode de détection	Type d'eau	Volume analysé	Oocystes/L	Rendements	Références
Floculation au carbonate de calcium							
	Non	IFA	Eau du robinet	10 L	50	72,9% (de 70,8 à 75,2%)	Shepherd et Wyn-Jones (1995)
	Non	IFA	Eau du robinet	10 L	75	73,6% (de 66 à 80,7%)	Shepherd et Wyn-Jones (1996)
	Non	IFA	Eau du robinet	10 L	environ 12	60,9%	Matheson <i>et al.</i> (1998)
	Non	IFA	Eau potable	45 L	580	73 ± 5,7%	Zuckerman <i>et al.</i> (1999)
	Flottation (Percoll-saccharose)	IFA	Eau du robinet	10 L	50	5,3% (de 1,6 à 7,6%)	Shepherd et Wyn-Jones (1995)
	Flottation (Percoll-saccharose)	IFA	Eau du robinet	10 L	5	16% (de 12 à 20%)	Shepherd et Wyn-Jones (1995)
Centrifugation en flux continu							
	Non	IFA	Eau potable	45 L	580	55,3 ± 2,1%	Zuckerman <i>et al.</i> (1999)

Tableau 35: Rendements de concentration des oocystes de *Cryptosporidium* à partir d'eaux de turbidité variable

Méthode de concentration	de	Méthode de purification	Méthode de détection	Type d'eau	Volume analysé	Oocystes/L	Rendement	Référence
Filtration sur membrane								
• Acétate de cellulose (porosité 1,2 µm)								
		Non	IFA	Eau de rivière	10 L	42,4	26,6% (de 23,6 à 33%)	Shepherd et Wyn-Jones (1995)
		Non	IFA	Eau de rivière	10 L	42,4	8,1% (de 1 à 12,3%)	Shepherd et Wyn-Jones (1995)
		Non	IFA	Eau de rivière	10 L	75	38,1% (de 32 à 42,7%)	Shepherd et Wyn-Jones (1996)
• Nitrate de cellulose								
- porosité 3 µm								
		Non	IFA	Eau de rivière	10 L	75	30,4% (de 25,3 à 36%)	Shepherd et Wyn-Jones (1996)
		Flottation sur solution de saccharose	IFA	Eau de rivière	10 L	66,8	7,1% (de 5,4 à 8,4%)	Shepherd et Wyn-Jones (1995)
- porosité 5 µm								
		Flottation sur solution de saccharose	IFA	Eau de rivière	10 L	66,8	4,6% (de 3,6 à 5,4%)	Shepherd et Wyn-Jones (1995)
• Polycarbonate (porosité 2 µm)								
		Non	IFA	Eau de rivière	10 L	75	36% (de 32 à 38,7%)	Shepherd et Wyn-Jones (1996)
		Gradient de densité (Percoll)	IFA	Eau de surface	20 L	50	9 ± 4%	Nieminski <i>et al.</i> (1995)
		Flottation (Percoll-saccharose)	IFA	Eau de rivière	10 L	66,8	5,6% (de 3,6 à 7,2%)	Shepherd et Wyn-Jones (1995)
• Polyéthersulfone (porosité 0,8 µm)								
		Non	IFA	Eau de rivière	10 L	75	21,8% (de 18,7 à 25,3%)	Shepherd et Wyn-Jones (1996)
Filtration sur cartouche								
• Polyéthersulfone (porosité 1 µm)								
		Non	IFA	Eau de source	10 L	environ 12	62,7%	Matheson <i>et al.</i> (1998)
		Non	IFA	Eau de source	10 L	environ 12	62,7%	Matheson <i>et al.</i> (1998)
		IMS	IFA	Eau de rivière	10 L	10-15	15 ± 12%	Simmons III <i>et al.</i> (2001)
		IMS	IFA	Eau de surface	10 L	NR	31 ± 58% à 47 ± 36%	Shaw <i>et al.</i> (2008)
		IMS	IFA	Eau de rivière	20 L	10	56,1%	AFNOR (2001)

Méthode de concentration	de	Méthode de purification	Méthode de détection	Type d'eau	Volume analysé	Oocystes/L	Rendement	Référence
		IMS modifié	IFA	Eau de surface	10 L	NR	39 ± 40% à 49 ± 38%	Shaw <i>et al.</i> (2008)
		IMS	qPCR	Eau de rivière	5 L	1,7	49,6 ± 19,3%	Fontaine et Guillot (2003)
		IMS	qPCR	Eau de rivière	5 L	15,7	46,4 ± 7,3%	Fontaine et Guillot (2003)
		IMS	qPCR	Eau de rivière	5 L	155	57,6 ± 10,7%	Fontaine et Guillot (2003)
• Polypropylène								
		- porosité 1 µm						
		Non	IFA	Eau de rivière	45 L	580	0,5 ± 0,4%	Zuckerman <i>et al.</i> (1999)
		Non	IFA	Eau de rivière	45 L	580	26,8 ± 4%	Zuckerman <i>et al.</i> (1999)
		Non	IFA	Eau de rivière	100 L	0,7	10,8% (de 3 à 16,5%)	Shepherd et Wyn-Jones (1995)
		Flottation (Percoll-saccharose)	IFA	Eau de surface	40 L	1 x 10 <sup>3</sup> -1 x 10 <sup>4</sup>	9,3 ± 3,3%	Hsu <i>et al.</i> (2001)
		Flottation (Percoll-saccharose)	IFA	Eau de surface	20 L	500	8 ± 13%	Nieminski <i>et al.</i> (1995)
		Flottation (Percoll-saccharose)	IFA	Eau de rivière	100 L	66,8	0,4% (de 0,0 à 0,6%)	Shepherd et Wyn-Jones (1995)
		Flottation (Percoll-saccharose)	IFA	Eau de rivière	100 L	66,8	1,9% (de 0,4 à 2,9%)	Shepherd et Wyn-Jones (1995)
		- porosité 15 µm						
		Non	IFA	Eau de rivière	100 L	66,8	8,1% (de 6 à 10,5%)	Shepherd et Wyn-Jones (1995)
		Non	IFA	Eau de rivière	100 L	75	9,4% (de 3,9 à 14,2%)	Shepherd et Wyn-Jones (1996)
		Flottation (Percoll-saccharose)	IFA	Eau de rivière	100 L	66,8	0,5% (de 0,3 à 0,6%)	Shepherd et Wyn-Jones (1995)
Floculation au carbonate de calcium								
		Non	IFA	Eau de rivière	10 L	66,8	41,9% (de 32,9 à 52,4%)	Shepherd et Wyn-Jones (1995)
		Non	IFA	Eau de rivière	10 L	75	71,3% (de 65,3 à 76%)	Shepherd et Wyn-Jones (1996)
		Non	IFA	Eau de rivière	45 L	2,6 x 10 <sup>4</sup>	18,7 ± 1,4%	Zuckerman <i>et al.</i> (1999)
		Non	IFA	Eau de source	10 L	environ 12	51,5%	Matheson <i>et al.</i> (1998)
		Non	IFA	Eau de source	10 L	environ 12	51,5%	Matheson <i>et al.</i> (1998)
		Flottation (Percoll-saccharose)	IFA	Eau de rivière	10 L	66,8	11,2% (de 10,3 à 12,8%)	Shepherd et Wyn-Jones (1995)

Méthode de concentration	de	Méthode de purification	Méthode de détection	Type d'eau	Volume analysé	Oocystes/L	Rendement	Référence
Ultrafiltration		IMS	IFA	Eau de rivière	10 L	10-15	42 ± 27%	Simmons III <i>et al.</i> (2001)

### 3.6.2. Méthode de détection de *Cryptosporidium*

La détection des oocystes de *Cryptosporidium* dans l'eau consiste à (i) les détecter et les dénombrer et (ii) à déterminer leur viabilité ou leur infectiosité afin de pouvoir estimer un risque pour le consommateur en cas d'ingestion de l'eau à analyser.

#### 3.6.2.1. Les méthodes de dénombrement

Les méthodes de dénombrement que nous décrivons dans cette partie de l'étude bibliographique comprennent l'immunofluorescence et les techniques de biologie moléculaire. Ces méthodes sont les plus employées pour la détection des oocystes de *Cryptosporidium* dans l'environnement.

##### 3.6.2.1.1. L'immunofluorescence

La méthode de détection la plus largement utilisée pour la détection des oocystes est l'immunofluorescence. Cette technique fait intervenir des anticorps mono- ou polyclonaux couplés à un fluorochrome constitué par le FITC (IsoThiocyanate de Fluoresceine) pour détecter spécifiquement les antigènes présents à la surface des oocystes. Ainsi les oocystes de *Cryptosporidium* fluorescent en vert lorsque la longueur d'onde d'excitation est comprise entre 450 et 490 nm. Bien que l'immunofluorescence soit la technique recommandée dans la norme française pour le dénombrement des oocystes de *Cryptosporidium* et les kystes de *Giardia* présents dans des échantillons d'eau (AFNOR, 2001), elle présente tout de même des inconvénients. En effet cette méthode est longue et fastidieuse, ne permet pas de déterminer la viabilité des oocystes qui sont détectés et ne peut discriminer spécifiquement ceux qui sont pathogènes pour l'Homme de ceux qui ne le sont pas.

##### 3.6.2.1.2. Les techniques moléculaires

Les méthodes moléculaires, et notamment les techniques de PCR, se sont de plus en plus développées ces dernières années. Ces méthodes sont plus rapides, plus sensibles et peuvent détecter spécifiquement les espèces de *Cryptosporidium* pathogènes pour l'Homme selon la séquence cible choisie (Tableau 36). Ces méthodes sont de plus en plus employées pour la détection des parasites *Cryptosporidium* dans les eaux de rivière (Guy *et al.*, 2003; Horman *et al.*, 2004; Hänninen *et al.*, 2005; Hsu *et al.*, 2008; Castro-Hermida *et al.*, 2008, 2009; Plutzer *et al.*, 2008), et les eaux d'alimentation (Castro-Hermida *et al.*, 2008b, 2009; Almeida *et al.*, 2010; Ali *et al.*, 2004; Feng *et al.*, 2011). Cependant, la mise en évidence du génome de parasite de *Cryptosporidium* dans les échantillons d'eau par la méthode de PCR ne permet pas de déterminer la viabilité des parasites et donc de relier cette contamination à un risque sanitaire.

**Tableau 36: Séquences cibles, méthodes employées et principales applications des techniques moléculaires d'amplification (Caccio *et al.*, 2005)**

Séquences cibles	Méthodes de détection	Identifications
<b>ADNr 18S</b>	PCR, nested PCR, séquençage, PCR-RFLP, qPCR	Espèces et génotypes
<b>hsp 70</b>	PCR, nested PCR, séquençage, qPCR	Espèces et génotypes
<b>COWP</b>	PCR, nested PCR, séquençage, PCR-RFLP, qPCR	Espèces et génotypes
<b>Actine</b>	PCR, nested PCR, séquençage	Espèces et génotypes
<b>βtubuline</b>	PCR, nested PCR, séquençage, PCR-RFLP	Espèces et génotypes
<b>GP60</b>	PCR, nested PCR, séquençage	Sous-génotypes
<b>Microsatellites</b>	PCR, nested PCR, séquençage	Sous-génotypes
<b>Minisatellites</b>	PCR, nested PCR, séquençage	Sous-génotypes

**Hsp 70: heat shock protein 70; COWP: Cryptosporidium Oocyst Wall Protein, GP 60: Glycoprotein 60**

### 3.6.2.2. Les méthodes d'estimation de la viabilité et de l'infectiosité

Les méthodes de détection décrites précédemment comportent l'inconvénient majeur de ne pas fournir de données sur la viabilité ou l'infectiosité des oocystes. Cette information est pourtant indispensable dans l'évaluation de risque. Diverses méthodes, *in vitro* ou *in vivo*, ont été développées pour mettre en évidence la viabilité ou l'infectiosité et sont décrites ci-dessous de manière non exhaustive.

#### 3.6.2.2.1. Estimation de la viabilité

- Marquage par des colorants vitaux

Les principaux colorants fluorogéniques utilisés pour l'estimation de la viabilité des oocystes par microscopie sont le PI (Iodure de Propidium), colorant basique exclu par les cellules viables dont la membrane est intacte, et le DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole), marqueur qui traverse la paroi des cellules et se fixe au niveau de l'ADN. L'utilisation de ces deux colorants vitaux a été développée par Campbell *et al.* (1992). Elle permet de différencier les oocystes viables des non viables selon l'inclusion ou non des deux colorants. Ainsi, les oocystes incluant le DAPI et le PI sont considérés comme non viables alors que ceux incluant uniquement le DAPI sont considérés comme viables. Enfin, ceux qui n'incluent aucun des deux colorants sont des oocystes quiescents ou dormants, et peuvent potentiellement être viables.

Malgré une forte corrélation entre les résultats obtenus par excystation et ceux obtenus par l'utilisation de colorants vitaux (Campbell *et al.* (1992) (coefficient de corrélation de 0,997), l'efficacité de cette méthode, basée uniquement sur la perméabilité des oocystes, serait fonction de l'âge des oocystes et la nature du milieu (Robertson *et al.*, 1998), et pourrait également entraîner une surestimation de la viabilité des oocystes (Black *et al.*, 1996; Jenkins *et al.*, 2003).

Les techniques de biologie moléculaire comme l'hybridation in situ, la RT-PCR ou la PCR couplées à des fluorochromes se sont de plus en plus développées. Outre l'estimation de la viabilité, ces méthodes permettent également le génotypage de *Cryptosporidium*.

- La technique d'hybridation in situ a été testée pour la détection de *C. parvum* (Smith *et al.*, 2004). Cette méthode a pour objectif de localiser une séquence particulière de l'acide nucléique au sein de la cellule par hybridation d'une sonde oligonucléotidique complémentaire qui cible la molécule d'ARNr 18S qui est présente en forte quantité de copies dans les cellules viables alors que leur nombre diminue fortement dans les cellules non viables. Bien que cette technique montre une corrélation avec l'excystation, il semblerait que la fluorescence émise soit altérée dans les échantillons environnementaux (Vesey *et al.*, 1993).
- La RT-PCR est adaptée à la détection des ARNm par une étape de rétro-transcription permettant la synthèse d'ADNc (ADN complémentaire) qui est ensuite amplifié par PCR. Seules les cellules viables peuvent produire de l'ARNm. L'estimation de la viabilité est alors basée soit sur l'induction, soit sur l'augmentation de la synthèse d'ARNm. L'ARNm codant pour les protéines hsp 70 a été utilisé pour mettre en évidence la viabilité de *C. parvum* (Stinear *et al.*, 1996). Cependant, il a été montré que la quantité d'ARNm hsp70 pouvait être variable et dépendante de l'état physiologique des parasites viables (Morgan et Thompson, 1998). D'autres protocoles de RT-PCR ont été développés et ciblent les ARN codant pour la  $\beta$ tubuline ou pour l'amyloglucosidase (Widmer *et al.*, 1999; Jenkins *et al.*, 2000) ou encore les ARN 18S (Hallier-Soulier et Guillot, 2003). Des corrélations ont été mises en évidence entre l'infectivité mesurée par cette technique et celle mesurée par l'inoculation in vivo à des souris
- La technique de PCR couplée à l'utilisation d'un colorant fluorogénique, comme le monoazide d'ethidium (EMA) ou le monoazide de propidium (PMA), est basée sur la détection de l'ADN des cellules viables. La molécule pénètre dans les cellules non viables, se lie de façon covalente à l'ADN empêchant ainsi l'amplification (Nocker *et al.*, 2006). Cette technique a été développée pour mettre en évidence les cellules viables de *Campylobacter jejuni*, *Listeria monocytogenes*, *E. coli*, *Legionella* (Rudi *et al.*, 2005; Flekna *et al.*, 2007; Chang *et al.*, 2009), mais l'efficacité de la discrimination est fonction de l'étude. L'utilisation du PMA couplée à la PCR pour la détection des oocystes viables a été développée par Brescia *et al.* (2009) et permet de discriminer les oocystes viables des oocystes non viables.
- Le dékystement in vitro est une technique qui consiste à déterminer le nombre d'oocystes vides après traitement afin de déterminer le nombre d'oocystes potentiellement infectieux (Black *et al.*, 1996; Neumann *et al.*, 2000). Cependant la détection des oocystes vides par microscopie étant parfois difficile, Rennecker *et al.* (1999) ont donc modifié la technique en se basant sur le nombre de sporozoïtes libérés au cours du dékystement plutôt que sur le nombre d'oocystes vides. Toutefois, l'estimation de la viabilité par les techniques de dékystement peut être influencée par différents facteurs tels que l'âge des oocystes, le pH, la température.

### 3.6.2.3. Estimation de l'infectiosité

Toutes les formes viables des oocystes ne sont pas nécessairement infectieuses. Les techniques permettant de mettre en évidence les formes infectieuses des oocystes sont l'inoculation *in vivo* à des animaux et la culture cellulaire.

- Inoculation à des animaux

La méthode la plus directe pour mettre en évidence l'infectiosité des oocystes est l'inoculation à des animaux. Cette méthode consiste à inoculer des oocystes chez un animal nouveau-né ou immunodéprimé, comme la gerbille ou la souris, pour mesurer la capacité des oocystes à terminer leur cycle parasitaire et provoquer une infection (Finch *et al.*, 1993). Outre l'utilisation d'animaux, cette méthode s'est révélée modérément efficace (Delaunay *et al.*, 2000; Korich *et al.*, 2000; Okhuysen *et al.*, 2002, Rochelle *et al.*, 2002) et présente l'inconvénient d'être une méthode à réponse tardive.

- La culture cellulaire

La culture cellulaire semble être une alternative à la méthode d'inoculation *in vivo*. Elle implique une exposition des oocystes à un stimulus chimique ou biologique afin de permettre l'excystation des sporozoïtes suivie de leur inoculation sur un système cellulaire. Après 24 à 48 h, les échantillons sont examinés par immunofluorescence (Yu *et al.*, 2000) ou par méthode moléculaire telle que la PCR (Di Giovanni et LeChevallier, 2005; Parr *et al.*, 2007). L'efficacité de la méthode dépend du type de cellules (Yu *et al.*, 2000), de l'inoculation d'oocystes ou de sporozoïtes, du traitement pour la pré-excystation (Carey *et al.*, 2004), ainsi que des méthodes d'éluion des oocystes (Carreno *et al.*, 2001) et de la souche utilisée (Rochelle *et al.*, 2002; Di Giovanni et LeChevallier, 2005). Parmi les nombreuses lignées cellulaires permettant le développement de *C. parvum*, les plus utilisées sont les cellules HCT-8 et Caco-2, issues d'un adénocarcinome humain (Griffiths *et al.*, 1994; Upton *et al.*, 1994); ainsi que les cellules MDCK et MDBK, issues respectivement de reins canins et bovins (Gut *et al.*, 1991; Rosales *et al.*, 1993). Si certains auteurs montrent des résultats similaires à ceux obtenus *in vivo* sur des souris nouveau-nés CD-1 (Upton *et al.*, 1994), d'autres, au contraire, indiquent que la méthode *in vitro* est plus sensible avec des valeurs d' $ID_{50}$  de 8 oocystes contre 107 oocystes par inoculation sur souris (Slifko *et al.*, 2002).

---

---

## **MATERIELS ET METHODES**

---

---



Dans ce chapitre sont décrits les protocoles employés au cours de ce travail de thèse pour déterminer le niveau de pollution fécale de milieux hydriques par des campylobacters, des adénovirus humains et des parasites *Cryptosporidium*, ainsi que pour l'étude de leur comportement.

## **1. CAMPYLOBACTER**

### **1.1. Les souches de *Campylobacter***

Les souches de *Campylobacter* utilisées au cours de ce travail sont des souches de *C. jejuni*, *C. coli* et *C. lari*.

Les souches de référence *C. jejuni* (NCTC 11168) et *C. coli* (ATCC 33559) nous ont été fournies par le Centre National de Référence des Campylobacters et des Helicobacters de Bordeaux. Les souches de *C. jejuni*, *C. coli* isolées du porc, du poulet et de l'eau ainsi que les souches *C. lari* isolées de l'eau nous ont été fournies par l'unité Hygiène et Qualité des Produits Avicoles et Porcins du laboratoire de Ploufragan/Plouzané de l'ANSES. Toutes les souches ont été conservées à -80°C dans du bouillon glycérol-peptoné.

Chaque souche a été mise en culture dans un bouillon d'enrichissement Preston préparé avec une base de bouillon nutritif n°2 (Oxoid, réf CM0067B) complété avec le supplément sélectif de Preston (Oxoid, réf SR0204E), le supplément de croissance (Oxoid, réf SR0232E) et 5% de sang de cheval défibriné (Oxoid, réf SR0048C). Après une incubation à 37°C pendant 48 h en microaérobie, 10 µL d'inoculum ont été ensemencés sur le milieu gélosé sélectif mCCDA composé de milieu *Campylobacter* CCDA modifié (Oxoid, réf CM0739B) et le supplément CCDA (Oxoid, réf SR0155E). Les boîtes de gélose sont ensuite incubées à 42°C pendant 48 h en microaérobie. Les colonies obtenues sont alors remises en suspension dans du bouillon tryptone sel (AES Chemunex, réf AEB 611496) jusqu'à obtenir une densité de 3 McF (environ  $10^7$ - $10^8$  UFC/mL).

### **1.2. Méthode de concentration des campylobacters à partir des eaux**

La concentration des campylobacters est effectuée par la méthode de filtration sur des membranes en nitrate de cellulose de 47 mm de diamètre et de porosité 0,45 µm (Millipore, réf EZHAWG474). Après filtration, les membranes sont directement introduites dans des bouillons de culture si la détection des campylobacters est opérée par la méthode de culture; ou alors les bactéries sont récupérées à l'aide d'une solution éluante si la détection des campylobacters est réalisée par PCR en temps réel. Dans ce dernier cas, cette étape de concentration a fait l'objet d'un développement méthodologique, ce qui implique que le protocole sera décrit plus précisément dans la partie 1 du chapitre Résultats et Discussion de ce manuscrit.

### 1.3. Méthodes de détection des campylobacters

#### 1.3.1. Détection de *C. jejuni* et *C. coli* par biologie moléculaire

##### 1.3.1.1. Extraction de l'ADN des campylobacters

Au cours de nos travaux, selon les conditions expérimentales, deux protocoles d'extraction génomique ont été employés.

###### 1.3.1.1.1. *Extraction génomique à partir d'échantillons d'eau de faible turbidité*

Le protocole retenu pour extraire l'ADN de *C. jejuni* et *C. coli* présents dans les 3 mL de concentrats d'échantillons d'eau faiblement turbide, consiste en une lyse thermique par un cycle de chaleur/congélation (100°C, 10 min / -80°C, 10 min) en présence de résine de Chelex-100 (Bio-Rad, réf 1421253) à une concentration finale de 2,5% (w/v). Cette dernière est une résine échangeuse d'ions qui permet de chélater les inhibiteurs de PCR. Après une centrifugation à 4000 rpm pendant 10 minutes, le surnageant contenant l'ADN bactérien est alors récupéré afin d'être purifié et concentré sur des colonnes à membrane de silice à l'aide du kit commercial QIAmp viral RNA mini kit (Qiagen, réf 53906), selon le protocole décrit ci-dessous.

- A partir d'un volume X d'échantillon, ajouter 4X d'AVL contenant 10 µg/mL de carrier
- Vortexer et laisser incuber 10 min à température ambiante
- Ajouter 4X d'éthanol puis vortexer
- Filtrer le tout sur une colonne à membrane de silice
- Filtrer 500 µL de tampon de lavage AW1
- Filtrer 500 µL de tampon de lavage AW2
- Mettre la colonne sur un tube collecteur
- Centrifuger 3 minutes à 14000 rpm
- Mettre la colonne dans un tube eppendorf de 1,5 mL
- Ajouter 50 à 100 µL de tampon d'éluion AVE
- Incuber 1 minute à température ambiante
- Centrifuger à 8000 rpm pendant 1 minute
- Utiliser l'extrait immédiatement ou congeler à -20°C

NB: pour des volumes d'échantillons  $\geq$  à 1 mL, le volume d'AVL et d'éthanol est de 4 mL.

Ainsi, les acides nucléiques contenus dans les 3 mL de concentrat sont récupérés sous un volume de 50 µL.

### 1.3.1.1.2. Extraction génomique à partir d'échantillons d'eau de forte turbidité

Dans le cas d'une eau de forte turbidité, les matières en suspension co-concentrées avec les bactéries peuvent colmater les colonnes à membrane de silice. C'est pourquoi nous avons décidé d'employer un système de billes de silice magnétiques qui fixent les acides nucléiques, et les composants étrangers aux acides nucléiques comme les inhibiteurs de la PCR ou les RNases présents dans le milieu sont retirés après plusieurs étapes de lavage. Enfin, les acides nucléiques sont élués de la phase solide en abaissant la force ionique.

Le protocole d'extraction de l'ADN des campylobacters, initialement présents dans des échantillons d'eau de forte turbidité, est réalisé directement à partir de 200 µL de concentrat. Après la lyse thermique de la paroi des bactéries (100°C, 10 minutes/ -80°C, 10 min), la concentration/purification de l'ADN est réalisée à l'aide du kit commercial NUCLISENS Magnetic Extraction Reagents selon les instructions du fabricant mentionnées ci-dessous (Biomérieux, réf 200293).

- Dans 10 mL de tampon de lyse ajouter 200 µL ou 5 mL d'échantillon (tube Falcon de 50 mL)
- Incuber 10 min à température ambiante
- Ajouter 50 µL de suspension de particules de silice et vortexer immédiatement
- Incuber 10 min à température ambiante
- Placer le tube Falcon sur le portoir magnétique et éliminer le liquide
- Re-suspendre les billes avec 400 µL de tampon de lavage WB1 et transférer le tout dans un tube eppendorf de 1,5 mL
- Vortexer pendant 30 sec pour laver les billes, placer le tube sur le portoir magnétique et éliminer le liquide
- Relaver avec 400 µL de tampon de lavage WB1, vortexer pendant 30 sec, mettre le tube sur le portoir et éliminer le liquide
- Resuspendre les billes avec 500 µL de tampon de lavage WB2 et transférer la totalité du tube (tampon+ billes) dans un autre tube eppendorf .
- Vortexer 30 sec puis mettre le tube sur le portoir et éliminer le liquide
- Relaver avec 500 µL de tampon de lavage WB2, vortexer 30 sec, mettre le tube sur le portoir et éliminer le liquide
- Laver les billes avec 500 µL de tampon de lavage WB3, vortexer 15 sec, mettre le tube sur le portoir et éliminer le liquide
- Ajouter 50 µL de tampon d'éluat, mélanger le tampon et les billes par aspiration, refoulement avec la pipette (ne pas vortexer)
- Placer le tube sous agitation à 60°C pendant 5 min
- Placer le tube sur le portoir magnétique, récupérer le surnageant (50 µL) dans un tube propre
- Re-suspendre les billes dans 50 µL de tampon d'éluat, mélanger les billes et le tampon par aspiration
- Placer de nouveau le tube sous agitation à 60°C pendant 5 min
- Placer le tube sur le portoir magnétique, récupérer le surnageant (50 µL) dans le tube contenant déjà 50 µL d'éluat
- Réaliser directement la PCR en temps réel ou congeler à -80°C

Ainsi, les acides nucléiques présents initialement dans 200 µL de concentrat, sont récupérés dans un volume final de 100 µL.

### 1.3.1.1.3. Extraction génomique à partir de colonies

Lorsqu'il s'agit de colonies, la quantité de cellules présentes dans une colonie (environ  $10^7$  cellules) est suffisante pour pouvoir détecter l'ADN bactérien directement, sans avoir recours à une étape de concentration des acides nucléiques. Par conséquent, l'extraction génomique consiste simplement en une lyse thermique à 100°C pendant 10 minutes puis à -80°C pendant 10 minutes après avoir resuspendu les colonies dans 2 mL de PBS, pH 7,4 (Phosphate Buffer Saline, Sigma Aldrich, réf P3813).

### 1.3.1.2. Détection de *C. jejuni* et *C. coli* par PCR en temps réel

La PCR en temps réel permettant la recherche de *C. jejuni* et *C. coli* est basée sur la méthode mise au point par Ménard *et al.* (2005) et cible le gène *gyrA*. Toutefois, sur les appareillages du laboratoire, et dans les conditions opératoires mentionnées par les auteurs, il ne nous a pas été possible d'obtenir une amplification pour l'espèce *C. jejuni*. Le protocole a donc été optimisé et évalué dans la partie 1 du chapitre Résultats et Discussion de ce manuscrit.

## 1.3.2. Détection des campylobacters par la méthode de culture

### 1.3.2.1. Détection et quantification des campylobacters thermotolérants dans les échantillons hydriques environnementaux

La détection et le dénombrement des campylobacters thermotolérants dans les échantillons environnementaux a été opérée selon la méthode normalisée ISO 17995 (2005).

Brièvement, le principe consiste en une filtration de l'échantillon sur des membranes en nitrate de cellulose de porosité 0,45  $\mu\text{m}$ . Les filtres sont ensuite transférés dans deux bouillons d'enrichissement, le bouillon Preston et le bouillon Bolton. Ce dernier est préparé avec une base de bouillon Bolton (Oxoid, réf CM0983B) complété avec le supplément sélectif de Bolton (Oxoid, réf SR0208E), le supplément de croissance et 5% de sang de cheval défibriné. Les deux bouillons sont incubés pendant  $44 \pm 4$  h à  $37 \pm 1^\circ\text{C}$  en microaérobie (5% d'O<sub>2</sub>, 10% CO<sub>2</sub> et 85% N<sub>2</sub>). Après incubation, 10  $\mu\text{L}$  de chaque inoculum de chaque bouillon sont étalés sur un milieu gélosé mCCDA et incubés pendant  $44 \pm 4$  h à  $41,5 \pm 1^\circ\text{C}$  en microaérobie. Les colonies ressemblant à des campylobacters sont testées pour une croissance aérobie. Pour cela, celles-ci sont ensemencés en duplicat sur une gélose non sélective Columbia au sang de mouton (Oxoid, réf PB5039A) et les deux boîtes sont incubées à  $41,5 \pm 1^\circ\text{C}$  pendant  $44 \pm 4$  h, l'une en aérobie et l'autre en microaérobie. Si des campylobacters typiques sont trouvés sur le milieu incubé en microaérobie l'échantillon est alors considéré comme positif pour les campylobacters thermotolérants. Le résultat est fourni comme une estimation semi-quantitative par volume d'échantillon. Chaque colonie typique est vérifiée comme campylobacters thermotolérants par le test d'agglutination *Campylobacter* dry spot (Oxoid, réf DR0150M) et par observation microscopique sous immersion au grossissement x100 (Olympus, BX51).

### 1.3.2.2. Détection de *C. jejuni* et *C. coli* à partir de colonies (culture-PCR)

A partir des colonies obtenues par la méthode de culture normative ISO 17995 (2005), un génotypage par PCR en temps réel est réalisé afin de spécifier la présence des espèces *C. jejuni* et *C. coli* dans les échantillons environnementaux. Ainsi, toutes les colonies présentes sur le milieu gélosé mCCDA sont récupérées. La moitié d'entre elles est resuspendue dans 2 mL de PBS, pH 7,4. Après une extraction génomique par lyse thermique, l'amplification par PCR en temps réel est directement effectuée à partir de 5 µL de la suspension. L'autre moitié des colonies est conservée à -80°C dans du bouillon glycérolé-peptoné.

### 1.3.2.3. Quantification des campylobacters dans les échantillons artificiellement contaminés

La détection et la quantification des campylobacters inoculés dans des échantillons d'eau a été opérée à partir de la méthode d'isolement sur milieu solide par dilutions successives. Pour cela, une gamme de dilutions de raison 10 est réalisée à partir de l'échantillon à analyser dans du bouillon tryptone sel. 100 µL de chaque dilution sont étalés sur une gélose mCCDA, en triplicat. Après une incubation de  $44 \pm 4$  h à  $41,5 \pm 1^\circ\text{C}$  en microaérobie, les colonies sont dénombrées pour chaque dilution afin de déterminer la concentration initiale de l'échantillon.

## 2. ADENOVIRUS HUMAINS

### 2.1. Virus

Au cours de cette étude plusieurs sérotypes d'adénovirus humains ont été utilisés comme modèles. Les adénovirus 1, 2, 5 et 7, isolés à partir d'échantillon de selle humaine, nous ont été fourni par le Centre Hospitalier Universitaire de Nancy. Les adénovirus entériques (sérotypes 40 et 41) ont également été utilisés. L'adénovirus 40 (NCPV#293) est issu de la collection nationale anglaise de virus pathogènes (Health Protection Agency Culture Collection, Grande Bretagne), alors que l'adénovirus 41, isolé d'échantillon de selles humaines, nous a été fourni par le Laboratoire de Chimie Physique et Microbiologie pour l'Environnement.

### 2.2. Méthode de concentration des adénovirus humains

La concentration a pour but d'obtenir sous un faible volume, les virus présents dans les échantillons d'eau à analyser. Dans cette étude, nous avons employé la méthode de concentration par adsorption-élution sur laine de verre selon la norme expérimentale XP T90-451 (AFNOR, 1996), décrite pour la concentration des entérovirus à partir d'échantillons hydriques.

Le principe de la méthode de concentration repose sur la filtration de l'échantillon à travers une cartouche en acier inoxydable (Sartorius) contenant de la laine traitée séquentiellement par de l'acide chlorhydrique à 1 M, de l'eau déminéralisée, de la soude à 1 M et de l'eau déminéralisée, afin de la stériliser et d'éliminer les particules colloïdales susceptibles d'être toxiques pour les cultures cellulaires. Après filtration de l'échantillon, les virus adsorbés à la laine de verre sont récupérés à l'aide d'un tampon alcalin composé de 3% d'extrait de bœuf (Sigma, réf B4888), 0,05 M de glycine (Sigma, réf G7403) à pH 9,5. L'éluat recueilli contenant les virus est alors neutralisé à pH 7,2 et constitue le concentrat primaire.

Dans le but de concentrer les virus dans un volume encore plus faible, une concentration secondaire est opérée. Pour cela, le pH du concentrat primaire est amené à un pH de 3,5 par ajout d'acide chlorhydrique à 1 M. Après une agitation de 45 minutes afin de précipiter les protéines, l'échantillon est centrifugé pendant 45 minutes à 3500 g. Le culot, contenant les virus, est alors repris dans 10 mL de PBS, pH 7,4, constituant ainsi le concentrat secondaire. Ce concentrat est immédiatement divisé en deux volumes égaux, l'un est directement utilisé pour la détection et la quantification du génome des adénovirus humains alors que l'autre est conservé à -80°C jusqu'à la recherche d'adénovirus infectieux par ICC-PCR.

Le choix du filtre, à savoir le diamètre de la cartouche et la quantité de laine de verre, est fonction du type d'eau et du volume de l'échantillon à analyser. Pour l'analyse d'eau d'alimentation le protocole original a été employé mais le volume d'échantillon optimal a été déterminé dans la partie 1 du chapitre Résultats et Discussion de ce manuscrit.

Pour les échantillons d'eau de surface, des modifications ont été apportées au protocole selon celles décrites par Ogorzaly *et al.* (2009). Brièvement, la cartouche de filtration est composée de 10 g de laine verre compactée en trois fractions égales et traitée séquentiellement par 50 mL d'HCl à 1 M, 50 mL d'eau déminéralisée, 50 mL de NaOH à 1 M et 1 L d'eau déminéralisée. L'échantillon (10 L) est filtré sur la laine de verre après avoir été préalablement acidifié à pH 3,5 à l'aide d'une solution d'HCl à 1 M. Après filtration de l'échantillon, les virus sont élués à l'aide d'une solution éluante stérile à pH 9,5 (0,05 M de glycine, 3% d'extrait de bœuf). Le concentrat primaire obtenu est alors immédiatement neutralisé à pH 7,4. Concernant l'étape de concentration secondaire, celle-ci est réalisée selon la norme XP T90-451 (AFNOR, 1996) sans aucune modification apportée au protocole.

## **2.3. Méthodes de détection et quantification du génome d'adénovirus humains**

### **2.3.1. Extraction de l'ADN viral**

Deux protocoles d'extraction génomique ont été employés au cours de ce travail en fonction de l'étude. Les deux protocoles sont effectués à l'aide de kits commerciaux dont l'un utilise des billes de silice magnétiques (Biomérieux, réf 200293) alors que l'autre utilise des colonnes à membrane de silice (Qiagen, réf 53906).

Pour l'extraction génomique virale, il n'est pas nécessaire de procéder au préalable à une lyse thermique car les tampons de lyse des kits commerciaux sont suffisamment efficaces pour lyser la capsid des adénovirus. Ainsi, la purification/concentration de l'ADN est directement effectuée à partir des échantillons viraux.

Le kit commercial Biomérieux (réf 200293), dont le protocole a été décrit dans la partie 1.3.1.1.2 de ce chapitre, sera employé pour extraire l'ADN viral d'échantillons environnementaux. Ainsi, les acides nucléiques initialement présents dans 5 mL de concentrat seront récupérés dans un volume final de 100  $\mu$ L.

Le kit commercial Qiagen (réf 53906), dont le protocole est décrit dans la partie 1.3.1.1.1 de ce chapitre, sera quant à lui employé pour extraire l'ADN des adénovirus lors de la recherche de virus infectieux par ICC-PCR mais également dans les études de persistance afin de suivre l'évolution du génome viral au cours du temps.

### **2.3.2. Détection du génome des adénovirus humains par PCR en temps réel**

#### **2.3.2.1. Détection des adénovirus humains (sérotypes A à F)**

La recherche des adénovirus humains s'effectue par PCR en temps réel selon le protocole développé par Jothikumar *et al.* (2005) dont le gène cible est celui codant pour la protéine de la capsid, l'hexon. Toutefois, une optimisation des conditions opératoires ayant été effectuée, le protocole d'amplification sera décrit dans la Partie 1 du chapitre Résultats et Discussion de ce développement.

#### **2.3.2.2. Détection spécifique des sérotypes 40 et 41**

Le deuxième protocole de Jothikumar *et al.* (2005) a été employé pour détecter spécifiquement les adénovirus humains entériques (adénovirus 40 et 41), mais n'ayant pu obtenir une amplification de l'ADN de l'adénovirus 40 selon les conditions opératoires des auteurs, nous avons décidé de retenir une nouvelle approche qui sera décrite dans la partie 1 du chapitre Résultats et Discussion de ce manuscrit.

### **2.3.3. Culture des adénovirus infectieux**

Pour la mise en évidence des virus infectieux, nous avons employé les cellules A549 (ECACC, réf 86012804), lignée cellulaire établie à partir d'un carcinome de poumon humain. Cette lignée cellulaire permet la réplication de nombreux sérotypes d'adénovirus.

Les milieux de culture sont composés de « Minimum Essential Medium » stérile (MEM) de Eagle (Sigma, réf M5650) contenant du rouge de phénol à titre d'indicateur de pH, de L-Glutamine à raison de 1% (Sigma, réf G7513) et de sérum de veau fœtal (Invitrogen, réf 10500-064) décomplémenté à la chaleur (30 min à 56°C) à raison de 10% dans le milieu de croissance et de 2% dans le milieu de survie.

### 2.3.3.1. Quantification des virus infectieux par culture cellulaire

Les adénovirus infectieux sont quantifiés par la méthode quantique en milieu liquide dans des microplaques de 96 puits.

La quantification des stocks viraux est réalisée par la méthode du Nombre le Plus Probable. Pour cela, une suspension de cellules A549 à une concentration d'environ  $10^4$  cellules/mL est ensemencée dans des microplaques de 96 puits à fond plat, à raison de 200  $\mu$ L par puit, puis incubée sous atmosphère enrichie à 5% de  $\text{CO}_2$  à 37°C pendant 24 à 48h. Les cellules, après sédimentation, se multiplient jusqu'à confluence pour former un tapis cellulaire.

Après élimination du surnageant, 100  $\mu$ L de l'échantillon à analyser ou de sa dilution sont inoculés dans 40 puits présentant un tapis cellulaire. Les microplaques sont incubées sous atmosphère enrichie à 5% de  $\text{CO}_2$  à 37°C pendant un temps maximum de 11 jours durant lequel le nombre de puits présentant un ECP (Effet cytopathogène) est comptabilisé. La concentration virale, exprimée en NPPUC/mL, est alors calculée à l'aide du programme développé par Maul (1991).

Dans les expérimentations de persistance du pouvoir infectieux des adénovirus en fonction du temps, la quantification est réalisée sur 8 puits de microplaques de 96 puits. La concentration est alors exprimée en  $\text{TCID}_{50}$ /mL (dilution de virus à laquelle, dans les conditions du test, 50% des cellules inoculées sont infectées).

### 2.3.3.2. Détection des adénovirus humains infectieux par ICC-PCR

La détection des adénovirus infectieux dans les échantillons environnementaux a été opérée par la méthode d'ICC-PCR (Integrated cell culture-PCR) combinant une étape de culture cellulaire à une étape de détection par PCR en temps réel. Cette méthode, plus rapide et plus sensible que la méthode de culture cellulaire, a été développée en format microplaque de 96 puits et évaluée dans le cadre de cette thèse, par conséquent, elle sera exposée dans la partie 1 du chapitre Résultats et Discussion de ce manuscrit.

## **3. CRYPTOSPORIDIUM**

### **3.1. Suspension d'oocystes *C. parvum***

Les suspensions d'oocystes utilisées au cours de ce travail de thèse ont été purifiées à partir de selles de veaux artificiellement contaminés avec une souche de *C. parvum* isolée de selles humaines. Ces selles de veaux, fournies par l'Institut National de Recherche Agronomique de Nouzilly, ont été diluées et filtrées sur des tamis jusqu'à 125  $\mu$ m puis conservées dans du bichromate de potassium à 4°C avant la purification.

La purification des oocystes a été effectuée par séparation à l'acétate d'éthyle et flottation sur chlorure de sodium selon le protocole adapté de Weber *et al.* (1992). La première phase de la purification consiste à éliminer les graisses contenues dans les selles. Celles-ci se concentrent après centrifugation sous forme d'un gâteau dans l'acétate d'éthyle, tandis que les matières en suspension hydrophiles et les oocystes s'accumulent dans la phase aqueuse. La seconde étape consiste à purifier les oocystes extraits de la selle par une solution de chlorure de sodium d'une densité de 1,2 (saturation). Cette densité est largement supérieure à celle des oocystes (1,04 à 1,06) qui se retrouvent entre les deux phases après centrifugation. Le protocole détaillé de la purification des oocystes est décrit ci-dessous.

- Dans un tube de 50 mL ajouter 12 mL de selle contaminée
- Ajouter 18 mL d'eau déminéralisée et vortexer
- Ajouter 12 mL d'acétate d'éthyle et vortexer
- Centrifuger 5 minutes à 500 g (avec frein)
- Aspirer avec la trompe à vide le gâteau en priorité
- Aspirer l'acétate d'éthyle en laissant 5 mL de milieu au fond de tube (oocystes concentrés dans le culot)
- Avec un papier filtre enlever sur la partie supérieur du tube les traces de selle
- Ajouter 35 mL d'eau déminéralisée et vortexer
- Centrifuger 10 minutes à 500g (frein 5)
- Aspirer le surnageant en laissant 5 mL au fond du tube
- Vortexer le culot pour décrocher et homogénéiser la solution contenant les oocystes
- Dans des tubes de 10 mL, ajouter 5 mL de chlorure de sodium (densité=1.2) et refroidir le tube 2 à 3 minutes à -80°C pour obtenir une meilleure flottation.
- Déposer très lentement en surface la suspension d'oocystes
- Centrifuger 10 minutes à 500g (aucun frein)
- Retirer doucement les 2 à 3 mL de la phase supérieur de l'anneau
- Prélever délicatement les 2.5 mL suivant (la phase supérieure contenant les sels et la phase inférieure contenant les oocystes) et placer le contenant dans un nouveau tube de 50 mL
- Ajouter 18 mL d'eau déminéralisée au 2.5 mL de surnageant contenant les oocystes (dilution 1/10 environ) et vortexer
- Centrifuger 10 minutes à 500g (sans frein)
- Eliminer 18 mL de la phase supérieure
- Ajouter 18 mL d'eau déminéralisée et vortexer
- Centrifuger 10 minutes à 500g (sans frein) afin de culoter les oocystes
- Eliminer 15 mL de la phase supérieure (oocystes dans le culot)
- Vortexer les 5ml restant
- Conserver la suspension à 4°C pendant des mois

### **3.2. Méthode de concentration des oocystes de *Cryptosporidium***

L'étape de concentration a pour but d'obtenir les parasites présents dans des échantillons d'eau sous un plus faible volume. La méthode employée pour concentrer les parasites est la méthode normalisée NF T90-455 (AFNOR, 2001) pour la recherche et le dénombrement d'oocystes de *Cryptosporidium* et de kystes de *Giardia*.

Brièvement l'échantillon d'eau est filtré sur une cartouche en polyéthersulfone de porosité 1  $\mu\text{m}$ . Les oocystes retenus sur le filtre sont alors élués à l'aide d'une solution éluante composée de 0,015% de Tween 80 (Sigma Aldrich, réf P4780) et 0,015% d'Antifoam B (Sigma Aldrich, réf A5757) dans du PBS pH7,4, puis ils sont centrifugés à 1250 g pendant 30 minutes à  $5 \pm 3^\circ\text{C}$ . Le culot contenant les oocystes constitue ainsi le concentrat primaire. Une reconcentration par la méthode de séparation immunomagnétique est alors effectuée à l'aide du kit commercial Dynabeads GC Combo (Idexx Laboratories, réf 73012). Ce kit est basé sur l'utilisation de billes magnétiques microscopiques recouvertes d'anticorps purifiés dirigés contre la surface des oocystes de *Cryptosporidium* qui se lient de façon covalente à leur surface pour former un complexe billes-oocystes. Après une succession de lavages, le complexe est dissocié afin de récupérer les oocystes. La suspension obtenue constitue le concentrat secondaire et est conservée pour le dénombrement des oocystes totaux par immunofluorescence directe.

### **3.3. Méthodes de détection des parasites *Cryptosporidium***

#### **3.3.1. Quantification des oocystes de *Cryptosporidium* par immunofluorescence**

##### **3.3.1.1. Quantification des oocystes totaux**

Le titrage des suspensions d'oocystes de *Cryptosporidium* est réalisée par immunofluorescence directe grâce à un double marquage afin de détecter l'ensemble des oocystes mais également ceux contenant leurs noyaux. L'immunofluorescence est réalisée avec un anticorps monoclonal marqué au fluorochrome FITC (Fluorescein IsoThioCyanate), spécifique de la paroi des oocystes.

La mise en évidence des noyaux des oocystes est réalisée à l'aide du colorant vital DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole) qui pénètre dans les cellules et se lie de façon covalente à l'ADN des oocystes. Le protocole du double marquage consiste à déposer 20  $\mu\text{L}$  de la suspension à titrer diluée au 1/100 et 1/1000 dans des puits d'une lame de verre pour immunofluorescence et de sécher la lame pendant 30 minutes à  $37^\circ\text{C}$ . Lorsque celle-ci est bien sèche, 8  $\mu\text{L}$  de méthanol absolu sont alors ajoutés dans chaque puits afin de fixer les oocystes. Après évaporation à l'air ambiant, les oocystes sont marqués avec 20  $\mu\text{L}$  de solution d'anticorps monoclonaux conjugués au FITC Crypto-a-Glo 1X (Waterborne Inc, réf A100FLR) et la lame est incubée à  $37^\circ\text{C}$  dans une chambre humide pendant 30 à 45 minutes. Les anticorps sont ensuite retirés et 20  $\mu\text{L}$  de solution de DAPI (Sigma Aldrich, réf D9564), préparée à 2 mg/mL, est mise en contact avec les oocystes pendant 2 minutes à l'air ambiant. L'excès est ensuite retiré et éliminé par deux lavages successifs avec du tampon PBS pH 7,4. La lame est séchée à  $37^\circ\text{C}$  pendant 20 minutes avant le dénombrement par microscopie à épifluorescence à l'objectif x20 ou x100 sous immersion. Le repérage des oocystes s'effectue tout d'abord avec le filtre FITC puis l'observation des noyaux est réalisée avec le filtre DAPI.

### 3.3.1.2. Quantification des oocystes viables

La mise en évidence de la viabilité des oocystes par immunofluorescence est réalisée par un double marquage FITC/PI à partir de 100 µL de suspension de *C. parvum*. Le marquage de la paroi des oocystes est réalisé à l'aide d'anticorps monoclonaux conjugués au FITC. Les cellules viables sont mises en évidence à l'aide d'une coloration fluorogénique réalisée grâce à l'utilisation du PI (Iodure de Propidium), marqueur de létalité, qui est inclus exclusivement dans les cellules non viables dont la membrane est endommagée. Le protocole du double marquage est décrit ci-dessous:

100 µL de suspension de *C. parvum* + 40 µL de solution d'anticorps monoclonaux conjugués au FITC:  
Aqua Glo G/C direct 1X (Waterborne Inc, réf A100FLR) + 10 µL de solution de PI (Sigma Aldrich, réf

P4170) préparé à 1 mg/mL



Incubation à 37°C pendant 45 minutes



Lavage avec 850 µL de PBS et centrifugation pendant 2 minutes à 6000g



Elimination de 900 µL de surnageant



Conservation 100 µL de culot pour observation microscopique

Le culot contenant les oocystes est alors observé par portion de 10 µL entre lame et lamelle par microscopie à épifluorescence. Le repérage des oocystes est d'abord réalisé avec le filtre FITC au grossissement x100 sous immersion puis chaque oocyste est observé avec le filtre PI. Les oocystes colorés en rouge sont comptabilisés comme des oocystes non viables. L'estimation de la viabilité est effectuée sur 100 oocystes en triplicat.

### 3.3.2. Quantification du génome des espèces de *Cryptosporidium* pathogènes pour l'Homme

La détection et la quantification du génome des espèces *C. parvum*, *C. hominis* et *C. meleagridis* est réalisée par amplification d'une séquence de 140 pb du gène COWP par PCR en temps réel. Cette méthode a fait l'objet d'un développement méthodologique, elle sera donc exposée dans la partie 1 du chapitre Résultats et Discussion de ce manuscrit.

## 4. CONSTRUCTION D'UN ETALON MOLECULAIRE

La quantification stricte du nombre de copies de génome contenue dans un échantillon donné est permise par l'utilisation d'une courbe standard, réalisée à l'aide du plasmide pDrive Cloning vector transformé et porteur d'une séquence cible. Plusieurs séquences cibles ont été utilisées au cours de ce travail:

- ✓ Séquence de 96 pb du gène codant pour l'hexon de l'adénovirus 1
- ✓ Séquence de 118 pb du gène codant pour la fibre de l'adénovirus 40
- ✓ Séquence de 118 pb du gène codant pour la fibre de l'adénovirus 41

- ✓ Séquence de 444 pb du gène codant pour la *gyrA* de *C. coli*
- ✓ Séquence de 444 pb du gène codant pour la *gyrA* de *C. jejuni*
- ✓ Séquence de 140 pb du gène codant pour la protéine de surface COWP de *C. parvum*.

L'ADN de chaque micro-organisme est extrait puis amplifié par PCR qualitative dont la composition du milieu réactionnel est mentionnée dans le Tableau 37.

**Tableau 37: Composition du milieu réactionnel utilisé pour la PCR qualitative**

Réactifs	Concentration initiale	Volume/échantillon	Concentration finale
<b>PCR buffer II 10X</b>	10X	2 µL	1X
<b>MgCl<sub>2</sub></b>	50 mM	0.6 µL	1.5 mM
<b>dNTPs</b>	2 mM	2 µL	0.2 mM
<b>Platinum Taq DNA Polymérase (Invitrogen, réf 10966)</b>	5 U/µl	0.2 µL	0.05 U
<b>Amorce sens</b>	10 µM	0.5 µL	0.25 µM
<b>Amorce antisens</b>	10 µM	0.5 µL	0.25 µM
<b>H<sub>2</sub>O RNase free</b>	/	14.2 µL	/

L'amplification est réalisée en plusieurs étapes. Une étape à 94°C pendant 2 minutes (activation de la Taq Polymerase), suivi d'une succession de 25 cycles, chacun composé d'une étape de dénaturation des deux brins d'ADN à 94°C pendant 30 secondes, d'une hybridation des amorces à 60°C pendant 30 secondes et d'une étape d'élongation à 72°C pendant 1 minutes. A la fin des cycles, une dernière étape à 72°C pendant 7 minutes est réalisée.

La révélation des produits de PCR qualitative est réalisée par électrophorèse sur gel d'agarose à 2%. L'extraction de l'ADN à partir du gel s'effectue à l'aide du kit commercial NucleoSpin Extract II (Macherey-Nagel, réf 740609), selon les instructions du fabricant.

Lors de l'amplification d'ADN, la Taq Polymérase, possédant une activité terminale transférase, ajoute une base Adénosine (A) à l'extrémité 3' du fragment amplifié. Le plasmide pDrive cloning vector est un plasmide en forme de U possédant à chaque extrémité 3' un nucléotide Tyrosine (T) (Figure 13). Ainsi les extrémités 3' du plasmide et de l'ADN vont se lier de façon covalente grâce à la ligase (Figure 14). Cette étape appelée ligation est réalisée à l'aide du kit QiagenPCR Cloning<sup>plus</sup> en mélangeant 1 µL de vecteur avec 4 µL d'insert et 5 µL de ligation Master Mix 2X. Le mélange est ensuite placé à 4°C pendant 2 heures.

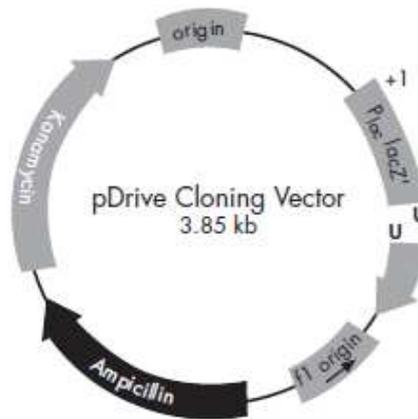


Figure 13: Carte génétique du plasmide pDrive Cloning Vector (Qiagen) permettant l'insertion du gène d'intérêt.

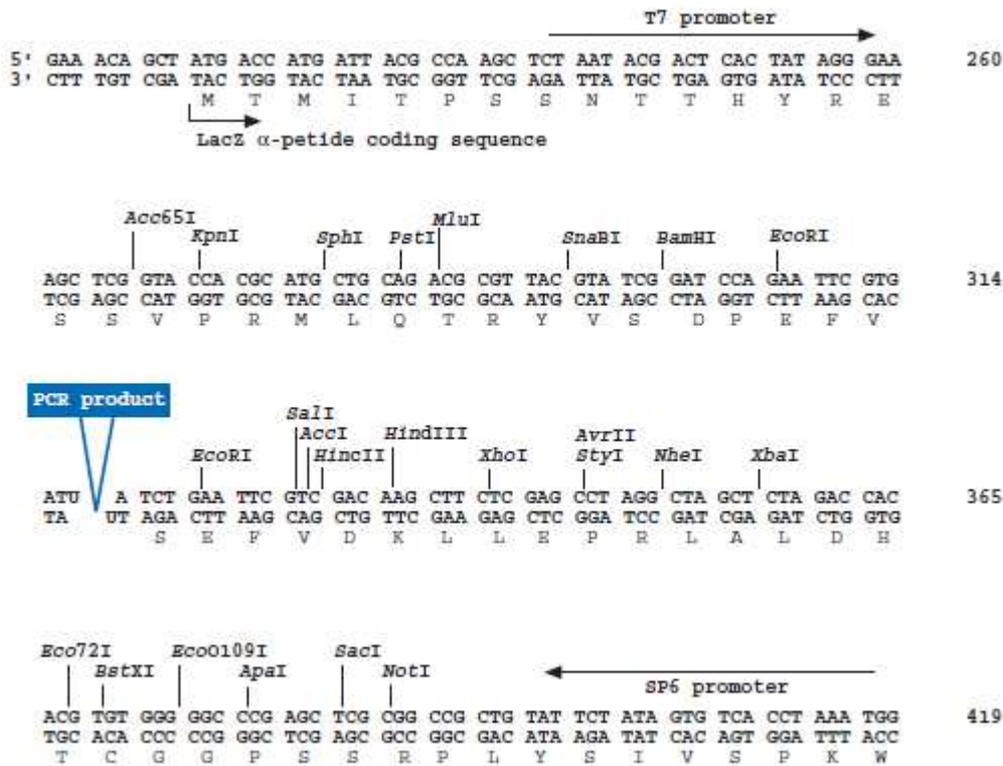


Figure 14: Séquence nucléotidique d'une portion de l'ADN plasmidique pDrive Cloning Vector

La transformation consiste à faire entrer le plasmide recombinant dans la bactérie compétente Qiagen EZ. Cette étape est réalisée à l'aide du kit QiagenPCR Cloning<sup>plus</sup> (Qiagen, réf 231224). La transfection se fait en mélangeant 1 µL de bactéries compétentes à 3 µL de produit de ligation. Un choc thermique à 42°C pendant 30 secondes puis 2 minutes dans la glace est alors réalisé afin de casser la membrane cellulaire pour permettre l'entrée du plasmide. 250 µL de SOC medium sont alors ajoutés dans le tube. Après une agitation de 30 min à 37 °C, 250 µL de la suspension bactérienne est étalée sur 1 boîte de gélose LB complémentée avec 100 mg/L d'ampiciline, 80µg /mL de X-gal (5-bromo-4-chloro-3 indolyl β-D-galactopyranoside) et 50µM d'IPTG (Isopropyl β-D-thiogalactopyranoside) puis incubée à 37°C pendant une nuit. L'IPTG est un inducteur de la transcription du gène qui code pour la βgalactosidase et le X-gal est un substrat chromogène. Le plasmide contient le gène LacZ qui code une partie fonctionnelle de la βgalactosidase. Cette enzyme hydrolyse le X-gal qui libère un colorant bleu relativement insoluble. L'insertion du fragment d'ADN interrompt le gène LacZ supprimant l'activité βgalactosidase. Par conséquent, les colonies ayant le plasmide seul sont colorées en bleu alors que celles ayant le plasmide recombinant sont blanches. Une colonie blanche est donc prélevée et remise en suspension dans 20 µL de milieu de culture LB et incubée à 37°C pendant 2 heures. Une colonie de couleur bleue est également prélevée comme contrôle négatif.

Parallèlement, afin de vérifier que le clone blanc est bien porteur du fragment d'ADN d'intérêt, une PCR qualitative est réalisée sur les suspensions bactériennes à l'aide des amorces SP6 e T7 dont les séquences nucléotidiques sont présentées dans le Tableau 38.

**Tableau 38: Séquences nucléotidiques des amorces utilisées pour la PCR qualitative**

	Dénomination (fonction)	Séquence (5'→3')	Longueur (bases)	Localisation
<b>Amorces</b>	SP6 (sens)	CATTTAGGTGACACTATAG	19	239-258
	T7 (antisens)	GTAATACGACTCACTATAG	18	400-418

La composition du milieu réactionnel est indiquée dans le Tableau 39.

**Tableau 39: Composition du milieu réactionnel pour la PCR qualitative sur colonie**

Réactifs	Concentration initiale	Volume/échantillon	Concentration finale
PCR buffer II 10X	10X	2 µL	1X
MgCl <sub>2</sub>	50 mM	0.6 µL	1.5 mM
dNTPs	2 mM	2 µL	0.2 mM
Platinum Taq DNA Polymérase (Invitrogen, réf 10966)	5 U/µL	0.2 µL	0.05 U
Amorce sens T7	10 pM/µL	2 µL	1 pM
Amorce antisens SP6	10 pM/µL	2 µL	1 pM
Suspension bactérienne	/	1 µL	/
H <sub>2</sub> O RNase free	/	10.2 µL	/

L'amplification est réalisée en plusieurs étapes. Une étape à 94°C pendant 2 minutes (activation de la Taq Polymerase), suivi d'une succession de 25 cycles, chacun composé d'une étape de dénaturation des deux brins d'ADN à 94°C pendant 30 secondes, d'une hybridation des amorces à 60°C pendant 30 secondes et d'une étape d'élongation à 72°C pendant 1 minutes. A la fin des cycles, une élongation finale est effectuée à 72°C pendant 7 minutes.

La purification du plasmide recombinant est réalisée sur un volume de 150 mL de suspension bactérienne à l'aide du kit PerfectPrep EndoFree Maxi kit Manual (5 prime, réf 2300120) selon les instructions du fabricant.

La quantité d'ADN ainsi que sa pureté sont déterminées par spectrophotométrie UV aux longueurs d'ondes de 260 nm et 280 nm.

## **5. ANALYSE ET TRAITEMENT STATISTIQUE DES DONNEES**

Les méthodes statistiques employées au cours de ce travail ont été effectuées à l'aide du logiciel Statistica (StatSoft), excepté pour le test de comparaison de pentes dont les résultats ont été calculés à partir d'Excel.

Les tests employés sont les suivants:

- ✓ L'analyse en composante principale pour mettre en évidence des similarités ou des oppositions entre différentes variables et repérer celles les plus corrélées entre elles.
- ✓ Le test de Hartley pour tester l'homogénéité des variances
- ✓ Le test ANOVA avec le test post hoc de Bonferroni pour la comparaison de moyennes
- ✓ Le test de Student adapté à la « comparaison de pente » de deux droites, après avoir vérifié la normalité de la distribution.



---

## **RESULTATS ET DISCUSSION**

---



***Partie 1: Evaluation et  
développements méthodologiques***

---



L'objectif de ce premier travail a été d'acquérir des méthodologies permettant de détecter spécifiquement deux espèces de *Campylobacter* (*C. jejuni* et *C. coli*), les adénovirus humains dont les adénovirus entériques (séro-groupe F) et les espèces de *Cryptosporidium* pathogènes pour l'Homme (*C. parvum*, *C. hominis*, *C. meleagridis*) dans (i) les eaux de surface, (ii) les eaux souterraines ainsi que dans (iii) des eaux d'alimentation rendues potables après traitement. Dans ces milieux hydriques, la détection des micro-organismes est généralement réalisée en deux étapes successives qui sont (i) la concentration des micro-organismes présents dans le volume d'eau prélevé sous un faible volume, et (ii) la détection à proprement parlé des micro-organismes dans le concentrat.

L'étape relative à la concentration des micro-organismes est un préalable indispensable pour pouvoir mettre en évidence ces agents pathogènes dans les milieux hydriques. Bien que présents en grande quantité à la source (selles, eaux usées), leur densité va décroître au fur et à mesure dans l'environnement avec les divers apports hydriques (effet de dilution) et suite à des processus d'inactivation liés à des facteurs environnementaux plus ou moins agressifs. De ce fait, selon le type de milieu hydrique considéré, il sera plus ou moins difficile de détecter les micro-organismes ciblés directement, même avec l'utilisation de méthodologies sensibles. Ainsi, dans les eaux brutes qui sont le réceptacle de nombreuses contaminations microbiologiques, de fortes concentrations peuvent être retrouvées, ce qui fait qu'il ne sera pas nécessaire d'analyser de grands volumes d'eau pour pouvoir détecter les pathogènes ciblés. A l'inverse, dans les eaux épurées naturellement ou par des traitements physico-chimiques spécifiques, la concentration en micro-organismes est plus faible, et il sera nécessaire d'analyser des volumes supérieurs à 10 litres voire 100 litres afin d'augmenter la probabilité de les détecter.

En ce qui concerne plus spécifiquement leur détection, de nombreuses méthodologies peuvent être employées selon le degré d'information recherchée: détection simple, quantification, spéciation, mise en évidence de l'état physiologique du micro-organisme (viabilité, infectiosité...). D'un point de vue pratique et en fonction du micro-organisme étudié, nous avons systématiquement favorisé l'emploi de méthodes standardisées ainsi que des méthodes décrites dans la littérature. Toutefois, afin de répondre à certaines contraintes de notre étude, nous avons dû en parallèle développer de nouvelles méthodologies. Toutes ces techniques ont été validées en déterminant leur sensibilité, leur limite de détection et de quantification ainsi que leur rendement. Ce travail d'évaluation était nécessaire afin de corriger les données obtenues en fonction des différentes interférences liées aux milieux environnementaux étudiés, et afin de déterminer des données d'exposition précises.

## 1. CAMPYLOBACTER

Pour répondre aux objectifs fixés au début de ce travail de thèse, nous avons dû opérer le développement et/ou l'adaptation de méthodologies permettant:

- ❖ La détection spécifique de deux espèces de *Campylobacter* fréquemment incriminées dans les épidémies de gastro-entérites humaines d'origine hydrique, à savoir *Campylobacter jejuni* et *Campylobacter coli*
- ❖ La caractérisation de la viabilité des souches de *Campylobacter* isolées à partir d'échantillons d'eaux
- ❖ La concentration des campylobacters dans différentes matrices hydriques fortement turbides (eaux de surface) ou faiblement turbides (eaux de nappe et eaux du robinet) ce qui implique l'analyse de volumes différents.

### 1.1. Détection des espèces *C. coli* et *C. jejuni* par biologie moléculaire

#### 1.1.1. Contexte

La méthode de référence pour la détection des campylobacters dans l'eau est la méthode normative ISO 17995 (2005). Cette norme propose une méthodologie semi-quantitative basée sur la détection des campylobacters grâce à l'emploi de différents bouillons d'enrichissement et milieux sélectifs. Dans le cadre de ce travail nous avons mis en place cette procédure afin de détecter ces bactéries dans les différents milieux hydriques étudiés. Il faut cependant préciser qu'à ce jour cette méthode reste peu employée pour la recherche de ces pathogènes dans les eaux pour différentes raisons:

- Le délai de réponse est relativement long (5 jours)
- La méthode ne permet pas de spécifier, parmi les campylobacters thermotolérants isolés, les bactéries appartenant aux espèces *C. jejuni* et *C. coli*, espèces majoritairement responsables des gastro-entérites humaines
- L'utilisation de bouillons d'enrichissement permettant de favoriser la recroissance des campylobacters en état de stress, peut également induire une augmentation de la croissance de la flore autochtone qui pourra engendrer une inhibition de la croissance des bactéries ciblées, et donc par conséquent générer un résultat faussement négatif
- La présence de formes viables mais non cultivables liées à des conditions environnementales agressives, fait que ces bactéries ne pourraient être mise en évidence via ce type de méthodologie de détection.

Afin de minimiser les différents écueils de cette méthodologie nous avons décidé d'employer une méthode moléculaire de PCR en temps réel afin de détecter et quantifier l'ADN de *C. jejuni* et *C. coli*. Cette méthode sera employée d'une part directement après concentration des bactéries de l'eau à analyser, et d'autre part pour spécifier les espèces *C. jejuni* et *C. coli* qui seront mises en évidence par la méthode normalisée ISO 17995 (2005).

### **1.1.2. Détection de *C. jejuni* et *C. coli* par PCR en temps réel**

Dans le but d'effectuer un screening rapide de la présence des espèces *C. jejuni* et *C. coli* dans les eaux, nous avons choisi d'employer la méthode de détection par PCR en temps réel développée par le Centre National de Référence des Campylobacters et des Helicobacters de Bordeaux (CNRCH) et publiée par Ménard *et al.* (2005). Cette PCR quantitative de format FRET (Fluorescence Resonance Energy Transfer) permet l'amplification simultanée d'une séquence de 444 paires de bases ciblant le gène *gyrA* des deux espèces *C. jejuni* et *C. coli*, grâce à l'utilisation d'un seul jeu d'amorces et de sondes fluorogéniques. La différenciation des espèces est réalisée à la fin de l'étape d'amplification par l'analyse des courbes de dissociation de chaque amplicon obtenues en mesurant la fluorescence générée au cours d'un cycle thermique progressif. Un pic appelé T<sub>m</sub> (Temperature melt) est alors caractérisé par la température à laquelle 50% de l'ADN double brin est dissocié.

Lors de tests préliminaires réalisés au laboratoire sur des souches de référence *C. jejuni* (NCTC 11168) et *C. coli* (ATCC 33559) fournies par le CNRCH de Bordeaux, nous avons montré qu'il n'était pas possible d'obtenir de signal de fluorescence pour l'espèce *C. jejuni* lorsque le protocole d'amplification était opéré dans les conditions opératoires mentionnées par Ménard *et al.* (2005) sur les appareillages du laboratoire (Rotor-Gene, Corbett). La présence de trois mutations situées au niveau de la séquence ciblée par la sonde et d'une mutation située au niveau de la séquence génomique ciblée par l'amorce anti-sens, ainsi que les modalités différentes d'acquisition du signal de la fluorescence entre le thermocycleur du CNRCH (Light Cycler, Roche Diagnostics) et celui du laboratoire (Rotor-Gene, Corbett), ont permis d'expliquer les raisons de ces échecs.

Dans ce contexte, à partir de nouveaux alignements de la séquence *gyrA* de l'espèce *C. jejuni* (NCTC 11168), nous avons modifié les séquences des sondes de format FRET proposées ainsi que celle de l'amorce antisens afin qu'elles puissent s'hybrider complètement aux séquences génomiques ciblées chez cette souche de référence (GenBank AL139077). De manière à éviter le développement d'un nouveau système de multiplexage et dans l'optique de disposer d'un protocole sensible, nous avons décidé d'effectuer la recherche séparée des deux espèces *C. coli* et *C. jejuni* avec ces deux systèmes d'amorces et de sondes (Tableau 40).

**Tableau 40: Séquences nucléotidiques des amorces et des sondes fluorogéniques utilisées pour la détection et la quantification de l'ADN de *C. coli* et *C. jejuni***

	Dénomination (fonction)	Séquence (5'→3')	Longueur (bases)	Localisation	
<i>C. coli</i>	Amorces	F3-gyrA (sens)	GTACTTTGGTGTGATTATG	20	986-1005
		R4-gyrA (antisens)	TTATCTCTTTTAATTCATCGCG	22	1429-1408
	Sondes	Sensor (antisens)	Red 640 - GTTCGCTGATAAATCACTGTTTTCTATG - p	29	1100-1072
	FRET	Anchor (antisens)	GCTCTTGCTCTTGCTTTTGAAGTTCAA- F	28	1133-1106
<i>C. jejuni</i>	Amorces	F3-gyrA (sens)	GTACTTTGGTGTGATTATG	20	986-1005
		R4J-gyrA (antisens)	TWATYCTTTTAATTCATCGCG	22	1429-1408
	Sondes	SensorJ (antisens)	LC705 - GTTCTTCTAATAAATACTGTTTTCTATG- p	29	1100-1072
	FRET	AnchorJ (antisens)	GCTCTTGCTCTTGCTTTTGAAGTTCAA- F	28	1133-1106

Localisation basée sur la séquence de la région du gène *gyrA* de *C. jejuni* (souche de référence *C. jejuni* NCTC 11168)

De nouvelles conditions réactionnelles ont été définies pour l'amplification du gène *gyrA* chez ces deux espèces bactériennes. Les concentrations initiales et finales de tous les réactifs composant le milieu réactionnel de PCR en temps réel sont présentées dans le Tableau 41.

**Tableau 41: Composition du milieu réactionnel utilisé en PCR quantitative pour la détection et la quantification de l'ADN de *C. jejuni* et *C. coli***

Réactifs	Concentration initiale	Volume/échantillon	Concentration finale
LightCycler FastStart DNA	10X	2,5 µL	1x
MgCl <sub>2</sub>	25 mM	2 µL	3 mM
Amorce R4-gyrA ou R4J-gyrA	10 µM	1,25 µL	0,5 µM
Amorce F3-gyrA	10µM	1,25 µL	0,5 µM
Sonde Sensor ou Sensor J	10 µM	0,5 µL	0,2 µM
Sonde Anchor ou Anchor J	10 µM	0,5 µL	
H2O RNase-DNase free	/	12 µL	/
ADN extrait	/	5 µL	/

L'amplification de l'ADN par PCR en temps réel est réalisée à l'aide d'un thermocycleur Rotor-Gene (Corbett) à 95°C pendant 10 minutes suivi de 45 cycles composés chacun de 6 secondes à 95°C, 30 secondes à 54°C puis 25 secondes à 72°C. Après amplification, une courbe de fusion est générée en mesurant l'intensité de fluorescence en continu induite par les amplicons lorsqu'ils sont soumis à une montée progressive de la température de 25 à 99°C par palier de 1°C.

Les deux systèmes de PCR en temps réel proposés ci-dessus ont été évalués dans la suite du travail en termes de sensibilité, linéarité, efficacité et spécificité sur de l'ADN plasmidique. La variabilité inter-essais et intra-essais de la méthode a également été estimée. Les résultats sont présentés ci-dessous et ont fait l'objet d'une valorisation sous forme d'un article scientifique paru dans le journal Applied and Environmental Microbiology (Tissier *et al.*, 2012).

#### 1.1.2.1. Domaine de linéarité, efficacité et limite de détection des deux protocoles de PCR

La linéarité, la limite de détection ainsi que le rendement des deux protocoles de PCR en temps réel ont été évalués à partir de plasmides recombinant contenant le fragment du gène codant pour la *gyrA* de *C. jejuni* ou de *C. coli*. Des stocks d'ADN plasmidique de  $2,85 \times 10^{10}$  copies de génome de *C. coli*/μL et de  $2,71 \times 10^{10}$  copies de génome de *C. jejuni*/μL ont été produits au laboratoire par clonage moléculaire. Des gammes de dilutions de raison 10 ont été générées à partir de chaque stock d'ADN, afin d'effectuer les tests d'amplification permettant d'obtenir la gamme étalon nécessaire à la quantification par PCR en temps réel.

La droite standard obtenue à partir de la gamme de dilutions d'ADN de *C. jejuni* est présentée sur la Figure 15. Une pente de  $-4,096$  et un coefficient de corrélation ( $R^2$ ) de  $0,999$  sont obtenus. Le domaine de linéarité s'étend sur 7 unités logarithmiques avec une limite de détection à 27,1 copies de génome/μL. L'efficacité de la PCR, calculée à partir de la valeur de la pente, est estimée à 75,4%. Le  $T_m$  (Melting Température) caractérisant spécifiquement les souches *C. jejuni*, mesuré pour chaque amplicon grâce à une courbe de dissociation thermique, se situe au niveau de la température  $59,7^\circ\text{C}$  (Ecart Type (ET)=0,05) (Figure 16).

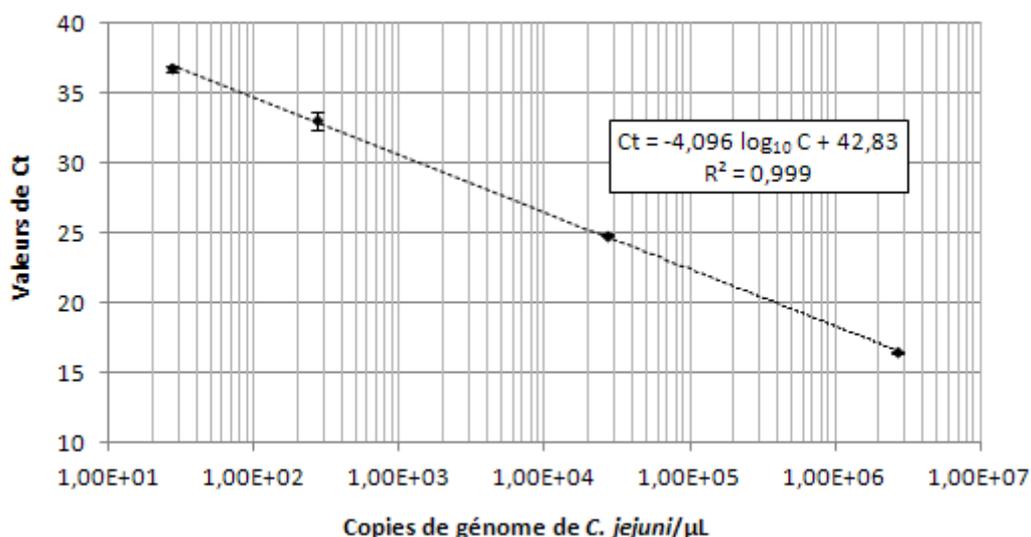


Figure 15: Gamme standard permettant la quantification absolue du génome de *C. jejuni*, obtenue à partir des dilutions logarithmiques du stock d'ADN plasmidique de *C. jejuni* porteur du gène d'intérêt (n=3).

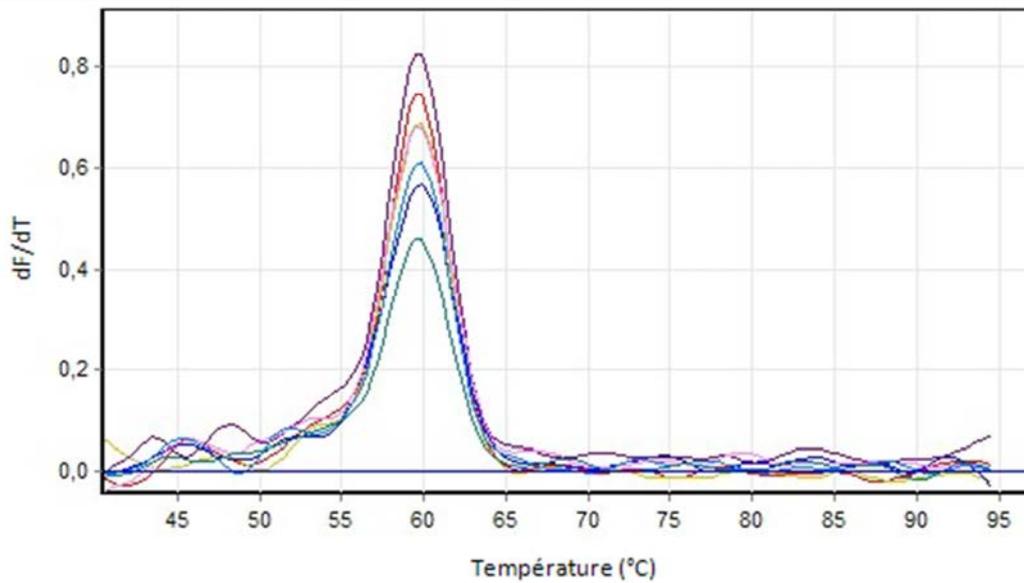


Figure 16: Courbe de dissociation obtenue à partir d'amplicons issus d'une gamme de dilutions de raison 10 du stock d'ADN plasmidique de *C. jejuni*.

En ce qui concerne la détection de l'espèce *C. coli*, la droite standard, obtenue après l'amplification de la gamme de dilutions de raison 10 du stock d'ADN plasmidique, présente une pente de -3,985 et un coefficient de corrélation ( $R^2$ ) de 0,998 (Figure 17). L'efficacité de la PCR est estimée à 78,2%. La limite de détection est comprise entre 2,85 et 28,5 copies de génome/ $\mu$ L. En incluant cette dernière concentration détectée dans 100% des cas dans l'analyse de linéarité, il est observé une réponse linéaire sur 7 unités logarithmiques. La courbe de dissociation obtenue après chaque amplification présente un pic ( $T_m$ ) au niveau de la température de 63,4°C ( $ET=0,52^\circ C$ ) (Figure 18).

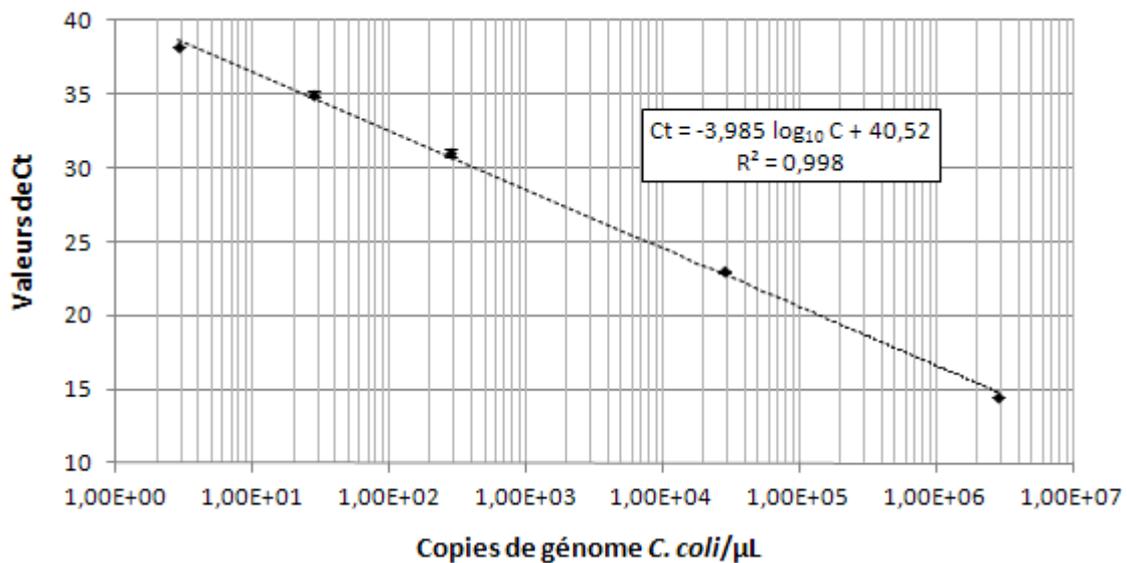


Figure 17: Gamme standard permettant la quantification absolue du génome de *C. coli*, obtenue à partir des dilutions logarithmiques du stock d'ADN plasmidique de *C. coli* porteur du gène d'intérêt (n=3)

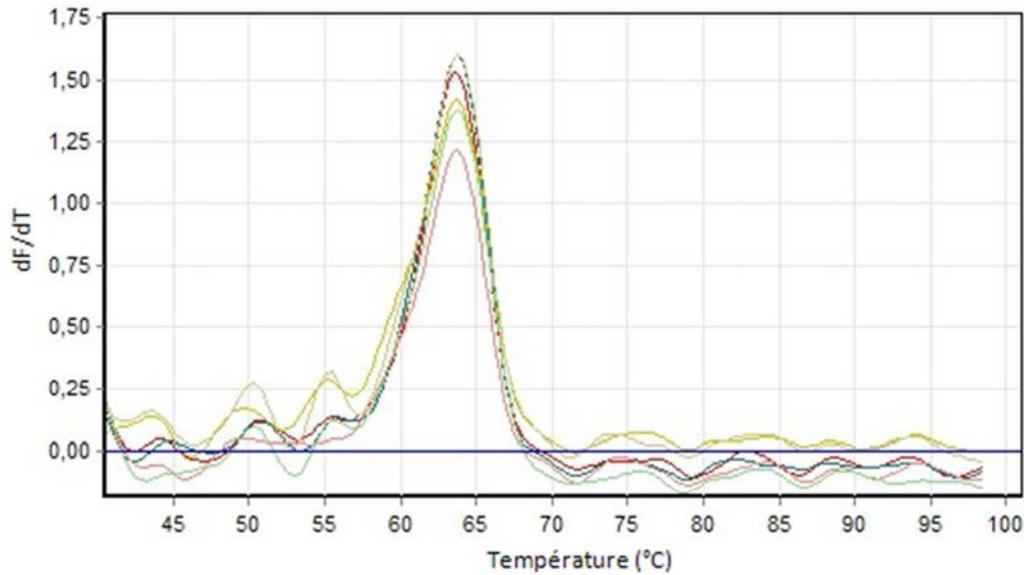


Figure 18: Courbe de dissociation obtenue à partir d'amplicons issus d'une gamme de dilutions logarithmiques d'ADN plasmidique de *C. coli*

#### 1.1.2.2. Variabilité intra et inter-essais de la PCR

Nous avons déterminé pour chaque protocole de PCR en temps réel la variabilité intra et inter-essais. La variabilité intra-essais a été déterminée à partir d'une gamme de dilutions de raison 10 réalisée à partir de chaque stock de plasmides. Toutes les dilutions ont été amplifiées simultanément trois fois lors de la même réaction. Quant à la variabilité inter-essais, elle a été estimée à partir d'une gamme de dilutions de raison 10 amplifiée séparément 4 fois. Les coefficients de variation intra et inter-essais ont été calculés à partir des moyennes et des écarts-types issus des valeurs de Ct obtenues après amplification. L'ensemble des résultats obtenus pour les espèces *C. jejuni* et *C. coli* sont présentés respectivement dans le Tableau 42 et le Tableau 43.

Tableau 42: Coefficients de variation (CV %) obtenus en conditions de répétabilité (CV % intra-essai) et de reproductibilité (CV% inter essai) à partir des gammes de dilutions logarithmiques du stock d'ADN plasmidique de *C. jejuni*

Concentration en <i>C. jejuni</i> (copies de génomes/ $\mu$ L)	$2,71 \times 10^6$	$2,71 \times 10^5$	$2,71 \times 10^4$	$2,71 \times 10^3$	$2,71 \times 10^2$	$2,71 \times 10^1$	$2,71 \times 10^0$
CV intra-essais (%) n=3	0,56	NA	0,2	NA	1,92	0,62	NC*
CV inter-essais (%) n=4	3,27	3,05	1,43	0,59	2,02	1,21	NC*

NA: non analysé; NC\*: non calculable car 0 positif/3

**Tableau 43: Coefficients de variation (CV %) obtenus en conditions de répétabilité (CV % intra essais) et de reproductibilité (CV% inter-essais) à partir des gammes de dilutions logarithmiques du stock d'ADN plasmidique de *C. coli***

Concentration en <i>C. coli</i> (copies de génomes/ $\mu$ L)	$2,85 \times 10^6$	$2,85 \times 10^5$	$2,85 \times 10^4$	$2,85 \times 10^3$	$2,85 \times 10^2$	$2,85 \times 10^1$	$2,85 \times 10^0$
CV intra-essais (%) n=3	0,21	NA	0,31	NA	0,95	0,55	NC*
CV inter-essais (%) n=4	1,46	1,16	1,34	2,29	1,75	2,46	2,43

NA: non analysé; NC\*: non calculable car 1 positif/3

Concernant la variation intra et inter-essais de la PCR *C. jejuni*, les valeurs des coefficients de variation oscillent respectivement entre 0,2% et 1,92 % et entre 0,59% et 3,27%. Les coefficients de variation de la PCR *C. coli* s'échelonnent de 0,21% à 0,95% en conditions de répétabilité et de 1,16% à 2,46% en conditions de reproductibilité.

#### 1.1.2.3. Test sur différentes souches de *Campylobacter*

La méthode de PCR en temps réel développée par Ménard *et al.* (2005) a été validée sur de nombreuses souches de *Campylobacter* collectées lors d'épidémies humaines. Compte tenu des modifications mineures des séquences des amorces et de sondes de la PCR de Ménard *et al.* (2005), nous avons souhaité tester la spécificité de la détection après analyse des Tm sur quelques souches collectées chez différents animaux ou retrouvées dans les eaux. 24 souches d'origines diverses (2 souches isolées chez le porc, 2 souches isolées chez la dinde, 2 souches isolées chez le poulet et 4 souches isolées de l'eau, pour *C. jejuni*; 4 souches isolées chez le porc, 2 souches isolées chez la dinde, 2 souches isolées chez le poulet et 4 isolées de l'eau pour *C. coli* et 2 souche de *C. lari* isolées de l'eau) ont été testées en aveugle. Les résultats ont montré que les deux protocoles mis en place étaient spécifiques soit de l'espèce *C. jejuni* soit de l'espèce *C. coli*, et qu'il n'était pas possible de détecter les souches *C. lari* isolées de l'eau.

#### 1.1.3. Evaluation de la méthode d'extraction d'ADN de *C. jejuni* et *C. coli*

Pour pouvoir détecter les campylobacters par PCR dans un milieu donné, il est nécessaire de réaliser au préalable l'extraction du génome des bactéries. Après avoir évalué la méthode de PCR en temps réel, il était donc indispensable de faire de même avec l'étape qui la précède, à savoir l'étape d'extraction génomique.

### 1.1.3.1. Extraction génomique adaptée à l'analyse d'eau de faible turbidité

L'objectif de ce travail était d'acquies une méthode d'extraction génomique capable d'extraire l'ADN de *C. jejuni* et *C. coli* présent dans un concentrat de grand volume (3 mL). Ce volume correspond au volume du concentrat obtenu après l'étape de concentration des campylobacters à partir d'échantillons d'eau faiblement turbides. L'analyse de l'intégralité du volume a pour objectif final d'augmenter la probabilité de détection des bactéries. Dans ce travail nous avons retenu une méthode d'extraction génomique par combinaison (i) d'un cycle thermique (100°C, 10 min/-80°C, 10 min) en présence (ii) d'une résine de Chelex-100 suivie (iii) d'une concentration/purification de l'ADN sur une colonne de silice de manière à ramener le volume final de 3 mL à 100 µL. L'efficacité et le rendement de cette méthode d'extraction génomique ont été évalués sur des gammes de dilutions de raison 10 de suspensions de *C. coli* et *C. jejuni* réalisées d'une part dans du PBS pH 7,4; et d'autre part dans un tampon composé de 0,05 M de glycine et de 3% d'extrait de bœuf à pH 9. L'évaluation a été opérée sur les deux tampons afin de vérifier l'absence d'interférence des molécules d'extrait de bœuf sur la méthode d'extraction génomique et/ou la méthode de PCR en temps réel.

#### 1.1.3.1.1. Domaine de linéarité, rendement et limite de détection de la méthode

Pour chaque matrice et chaque espèce testées, nous avons déterminé la sensibilité, la linéarité et l'efficacité de l'ensemble « extraction génomique + détection ». Les résultats sont résumés sur la Figure 19 et la Figure 20.

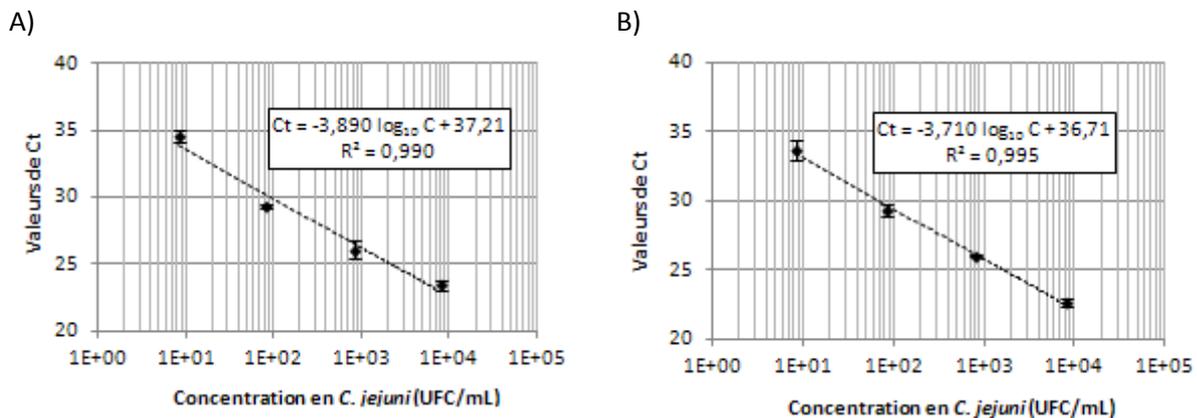


Figure 19: Gamme standard obtenue à partir d'une gamme de dilutions logarithmiques d'une suspension de *C. jejuni* réalisée dans le PBS pH 7,4 (A) et dans la solution éluante (B)

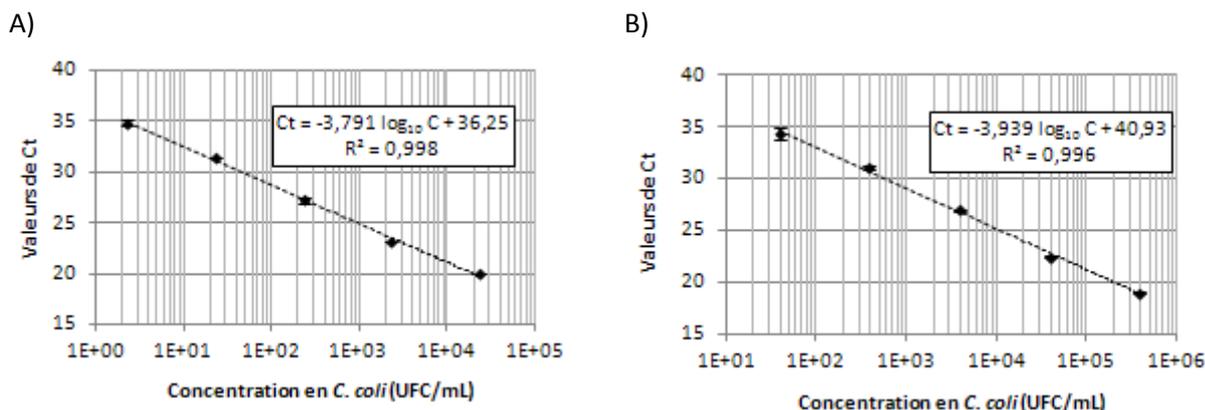


Figure 20: Gamme standard obtenue à partir d'une gamme de dilutions logarithmiques d'une suspension de *C. coli* réalisée dans le PBS pH 7,4 (A) et dans la solution éluante (B)

- Les courbes standards obtenues par dilutions logarithmiques d'une suspension de *C. jejuni* dans du tampon PBS, pH 7,4 et du tampon d'éluion ont respectivement une pente -3,890 et -3,71 et un coefficient de corrélation ( $R^2$ ) de 0,990 et 0,995. Le domaine de linéarité s'étend sur les 4 dilutions testées. L'efficacité de la méthode est de 80,7% dans le tampon PBS et de 86,2% dans le tampon d'éluion et la limite de détection est estimée à 8,3 UFC/mL dans les deux matrices.

- La courbe standard obtenue par PCR en temps réel sur une gamme de dilutions de raison 10 de *C. coli* réalisée dans 3 mL de tampon PBS, pH 7,4, montre une pente de -3,791 et un coefficient de corrélation ( $R^2$ ) de 0,998. Une réponse linéaire est respectée sur les 5 dilutions logarithmiques testées et la limite de détection est estimée à 2,3 UFC/mL. L'efficacité de la PCR est de 83,7%. Lorsque l'évaluation est réalisée dans du tampon d'éluion à 3% d'extrait de bœuf, 0,05 M de glycine, à pH 9, une réponse linéaire est obtenue sur les 5 dilutions logarithmiques testées. La pente de la droite standard est de -3,939 avec un coefficient de corrélation ( $R^2$ ) de 0,996. L'efficacité de la méthode est estimée à 79,5% et la limite de détection à 39 UFC/mL.

#### 1.1.3.1.2. Variations intra et inter-essais de la méthode

Afin de valider l'ensemble du process comprenant « extraction génomique + détection par PCR en temps réel », les coefficients de variation intra et inter-essais ont été déterminés à partir des valeurs moyennes des Ct et des écart-types de différentes quantités de bactéries. Les résultats obtenus sont présentés dans le Tableau 44 et le Tableau 45.

Tableau 44: Coefficients de variation observés lors de l'estimation de la variabilité inter-essais (CV% inter-essais) de l'étape d'extraction pour différentes concentrations de *C. jejuni* dans du tampon PBS et du tampon d'éluion

Matrice	Concentration en <i>C. jejuni</i> (UFC/mL)	$8,3 \times 10^3$	$8,3 \times 10^2$	$8,3 \times 10^1$	$8,3 \times 10^0$	$8,3 \times 10^{-1}$
	PBS	CV inter-essais (%)	1,67	2,31	0,45	1,28
Eluant	Concentration en <i>C. jejuni</i> (UFC/mL)	$8,3 \times 10^3$	$8,3 \times 10^2$	$8,3 \times 10^1$	$8,3 \times 10^0$	$8,3 \times 10^{-1}$
	CV inter-essais (%)	1,31	0,29	1,28	2,02	NC

NC: Non Calculable car 0 positif/3

**Tableau 45: Coefficients de variation observés lors de l'estimation de la variabilité inter-essais (CV% inter-essais) de l'étape d'extraction pour différentes concentrations de *C. coli* dans du tampon PBS et du tampon d'élution**

PBS	Concentration en <i>C. coli</i> (UFC/mL)	$2,3 \times 10^4$	$2,3 \times 10^3$	$2,3 \times 10^2$	$2,3 \times 10^1$	$2,3 \times 10^0$	$2,3 \times 10^{-1}$
	CV inter-essais (%)	0,38	0,07	1,02	0,02	0,87	NC
Eluant	Concentration en <i>C. coli</i> (UFC/mL)	$3,9 \times 10^5$	$3,9 \times 10^4$	$3,9 \times 10^3$	$3,9 \times 10^2$	$3,9 \times 10^1$	$3,9 \times 10^0$
	CV inter-essais (%)	0,47	0,21	0,3	0,47	1,85	NC

NC: Non Calculable car 0 positif/3

Avec l'espèce *C. jejuni*, une variation inter-essais de la méthode comprise entre 0,45% et 2,31% est mesurée lorsque les expérimentations sont réalisées dans du tampon PBS, pH 7,4; et entre 0,29% et 2,02% lorsque ces mêmes expérimentations sont effectuées dans le tampon d'élution composé d'extrait de bœuf à 3%, de glycine à 0,05 M, à pH 9. Concernant les résultats obtenus avec l'espèce *C. coli*, les coefficients de variation inter-essais oscillent entre 0,02% et 1,02% et entre 0,21% et 1,85% lorsque les matrices sont respectivement du PBS et du tampon d'élution.

Les valeurs des coefficients de variation inter-essais ne diffèrent pas significativement entre les deux tampons ce qui indique que la composition de la solution éluante n'interfère pas avec l'ensemble de la méthode (extraction génomique + détection). Il en est de même avec les valeurs de CV observées pour la méthode de détection seule et les valeurs de CV observées pour l'ensemble «extraction génomique + détection». Nous pouvons conclure que le système d'extraction n'engendre pas de variation supplémentaire lors de l'étape de détection par PCR en temps réel.

#### 1.1.3.2. Extraction génomique adaptée à l'analyse d'eau de forte turbidité

La recherche des espèces *C. jejuni* et *C. coli* dans les eaux de rivière nous a conduit à devoir sélectionner une méthode d'extraction d'ADN adaptée à ces matrices complexes pouvant contenir de fortes teneurs en matières en suspension. En effet dans le cas d'eau de forte turbidité, les matières en suspension co-concentrées avec les bactéries pourront colmater les colonnes de silice utilisées. Nous avons donc décidé pour ces matrices particulières de nous tourner vers l'utilisation d'un système de concentration/purification de l'ADN basé sur l'utilisation de billes de silice magnétiques qui vont se lier aux acides nucléiques présents dans le concentrat, alors que les composants étrangers, tels que les matières en suspension, seront éliminés après des lavages successifs. Cette étape est réalisée à l'aide du kit commercial NUCLISENS Magnetic Extraction Reagents (Biomérieux, réf 200293), selon le protocole décrit dans la partie 1.3.1.1.2. du chapitre Matériels et Méthodes. Dans ce contexte, le protocole d'extraction de l'ADN des campylobacters repose sur la combinaison (i) d'une lyse thermique (100°C, 10 minutes et -80°C, 10 minutes) suivie directement (ii) d'une concentration/purification de l'ADN à l'aide des billes de silice magnétiques. Le protocole est réalisé sur 200 µL d'échantillon. Ce volume correspond au volume final du concentrat obtenu après concentration des campylobacters à partir d'eau de forte turbidité.

1.1.3.2.1. Linéarité, efficacité et limite de détection

La sensibilité, la linéarité et l'efficacité de l'ensemble « extraction génomique + détection » ont été déterminées en conditions de reproductibilité sur des volumes de 200 µL d'une gamme de dilutions de raison 10 réalisée à partir de suspensions de *C. jejuni* et *C. coli*. Les expérimentations ont été opérées en triplicat pour chaque espèce dans du PBS (pH 7,4) artificiellement contaminé avec des quantités de *C. jejuni* comprises entre  $8,4 \times 10^{-1}$  et  $8,4 \times 10^4$  UFC/mL et des quantités de *C. coli* comprises entre  $2,3 \times 10^{-1}$  et  $2,3 \times 10^4$  UFC/mL. Les courbes standards obtenues à partir des suspensions de *C. jejuni* et *C. coli* sont présentées respectivement sur la Figure 21 et la Figure 22.

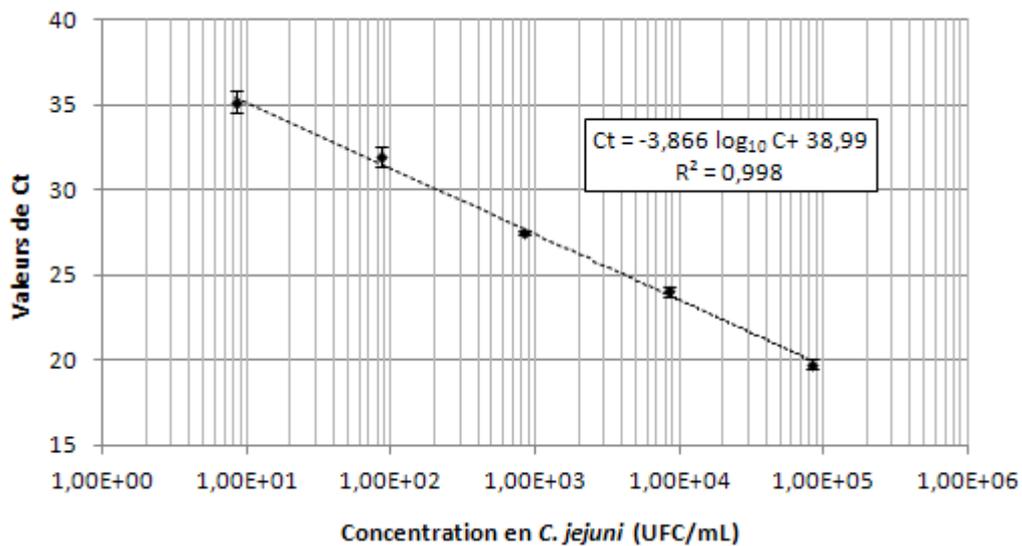


Figure 21: Gamme standard obtenue par PCR en temps réel à partir des dilutions logarithmiques d'une suspension de *C. jejuni* (n=3)

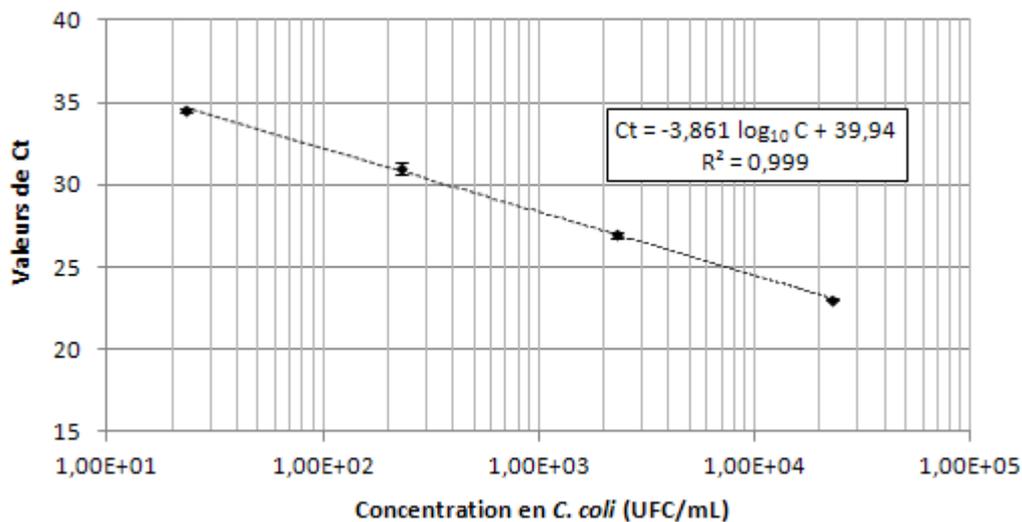


Figure 22: Gamme standard obtenue par PCR en temps réel à partir des dilutions logarithmiques d'une suspension de *C. coli* (n=3)

Pour *C. jejuni*, une pente et un coefficient de corrélation ( $R^2$ ) respectifs de -3,866 et 0,998 sont obtenus lorsque ce système d'extraction est employé. Pour *C. coli* une pente de -3,861 et coefficient de corrélation ( $R^2$ ) de 0,999 ont été mesurés. La limite de détection de la méthode d'extraction génomique + détection par PCR en temps réel est de 8,4 UFC/mL pour *C. jejuni* et de 23 UFC/mL pour *C. coli* et l'efficacité est estimée à 81,6% pour les deux espèces.

#### 1.1.3.2.2. Variabilité inter-essais

La variabilité inter-essais de l'ensemble du process «extraction génomique + détection» a été estimée à partir des moyennes et des écart-types obtenus précédemment. Les valeurs des coefficients de variation (CV%), calculés pour chaque dilution testée, sont résumées dans le Tableau 46. Les valeurs des coefficients de variations inter-essais varient de 0,19 à 1,18% pour des concentrations en *C. jejuni* comprises entre  $2,3 \times 10^4$  et  $2,3 \times 10^1$  UFC/mL. Pour des concentrations en *C. coli* comprises entre  $8,4 \times 10^4$  et  $8,4 \times 10^0$  UFC/mL, les valeurs de CV oscillent entre 0,4% et 1,82%. Toutes ces valeurs ne sont pas significativement différentes de celles observées lors de l'évaluation des méthodes de détection seules, ce qui indique que l'étape d'extraction génomique n'apporte pas de variation supplémentaire à la détection par PCR en temps réel.

**Tableau 46: Coefficients de variation observés lors de l'estimation de la variabilité inter-essais (CV% inter-essais) de l'étape d'extraction pour différentes concentrations de *C. jejuni* et *C. coli***

<i>C. jejuni</i>	Concentration (UFC/mL)	$2,3 \times 10^4$	$2,3 \times 10^3$	$2,3 \times 10^2$	$2,3 \times 10^1$	$2,3 \times 10^0$	$2,3 \times 10^{-1}$
	CV inter-essaiss (%)	0,19	0,73	1,18	0,39	NC	NC
<i>C. coli</i>	Concentration (UFC/mL)	$8,4 \times 10^4$	$8,4 \times 10^3$	$8,4 \times 10^2$	$8,4 \times 10^1$	$8,4 \times 10^0$	$8,4 \times 10^{-1}$
	CV inter-essaiss (%)	1,42	1,17	0,4	1,82	1,77	NC

NC: Non Calculable car 0 positif/3

## 1.2. Mise en évidence de la viabilité de *C. jejuni* et *C. coli*

### 1.2.1. Contexte

Actuellement la seule méthode de référence standardisée permettant de mettre en évidence la viabilité des campylobacters présents dans les milieux hydriques est la méthode normalisée ISO 17995 (2005). Comme nous l'avons précisé précédemment, cette méthode complexe et fastidieuse permet la détection des campylobacters thermotolérants (*C. jejuni*, *C. coli*, *C. lari*) viables dans un échantillon d'eau sans toutefois permettre de spécifier la souche isolée. De manière à simplifier la recherche de ces bactéries dans ces milieux hydriques, différents auteurs ont proposé l'emploi de géloses spécifiques sur lesquelles est déposé le filtre employé pour opérer la concentration. L'identification des bactéries se fait dans un second temps par typage à partir des colonies obtenues par culture des bactéries présentes dans le milieu, en atmosphère et à une température adéquates. Outre la simplification du process de détection, cette technique permet de diminuer le temps analytique et également de minimiser l'interférence d'autres bactéries co-concentrées avec les campylobacters qui pourraient inhiber la croissance des campylobacters thermotolérants dans les bouillons d'enrichissement et générer au final un résultat faussement négatif.

L'utilisation de bouillons d'enrichissement comme ceux proposés dans la norme ISO 17995 (2005) a pour objectif d'optimiser la revivification des bactéries métaboliquement stressées par des conditions physico-chimiques environnementales pouvant être drastiques. Dans une étude préliminaire menée au laboratoire, nous avons montré la plus grande sensibilité de l'utilisation de ces bouillons par rapport à une gélose mCCDA classiquement employée. Nous avons ainsi démontré que l'étape préalable d'enrichissement permettait d'augmenter la sensibilité de la méthode de détection de 2 log<sub>10</sub> sur différentes concentrations en *C. jejuni* ensemencées en quantité équivalente, d'une part directement sur un milieu gélosé sélectif mCCDA, et d'autre part dans un bouillon d'enrichissement sélectif Preston (Tableau 47).

**Tableau 47: Détection de *C. jejuni* par culture sur milieu gélosé mCCDA avec ou non une étape préalable d'enrichissement**

Dilutions	Présence de <i>C. jejuni</i> sur milieu mCCDA	
	Sans enrichissement	Avec enrichissement
10 <sup>-4</sup>	+	+
10 <sup>-5</sup>	+	+
10 <sup>-6</sup>	+	+
10 <sup>-7</sup>	-	+
10 <sup>-8</sup>	-	+
10 <sup>-9</sup>	-	-

(+): détection, (-): absence de détection

L'emploi combiné de deux bouillons différents (Preston et Bolton) démultiplie la probabilité de détection de ces bactéries. En effet, des expérimentations opérées sur des eaux de surface ont révélé la nécessité d'employer simultanément les deux bouillons d'enrichissement car les bactéries ciblées peuvent être décelées soit dans les deux bouillons, soit avec l'un des deux bouillons, selon l'échantillon considéré (Tableau 48).

**Tableau 48: Détection des espèces *C. coli* et *C. jejuni* par la méthode de culture-PCR en fonction du bouillon d'enrichissement employé et du volume d'eau analysé**

Volumes analysés		10 mL	100 mL	1 L
Echantillon 1	Bolton	-	-	+
	Preston	-	+	-
Echantillon 2	Bolton	+	-	+
	Preston	-	+	+
Echantillon 3	Bolton	+	-	+
	Preston	+	+	+

(+): détection, (-): absence de détection

Dans ce contexte et pour la suite de nos travaux nous avons décidé de retenir la méthodologie proposée dans la norme ISO 17995 (2005) pour révéler la viabilité des campylobacters thermotolérants détectés dans les échantillons hydriques.

Concernant l'identification, nous utiliserons la méthode de PCR en temps réel mise en place et décrite précédemment. Cette méthodologie sera employée sur les colonies isolées mais également dans le cas où des tapis bactériens seraient obtenus (cas des échantillons riches en flore). Dans la suite de ce travail méthodologique, il nous est apparu indispensable de tester la robustesse de la méthode de PCR en temps réel lorsqu'elle était employée en complément de la méthode normative (culture-PCR). Ce test a été opéré, sur différentes souches humaines, animales ou environnementales et dans des conditions proches de celles qui seront rencontrées dans l'étude d'occurrence.

### **1.2.2. Robustesse de la méthode de PCR couplée à la méthode de culture pour la révélation de la viabilité des campylobacters**

#### 1.2.2.1. Tests sur différentes souches environnementales

La méthode de culture-PCR a été testée sur différentes souches de *C. jejuni* et *C. coli* caractérisées génétiquement afin de vérifier la spécificité de la méthode. Les souches testées ont été fournies gracieusement par le CNRCH et par l'unité Hygiène et Qualité des Produits Avicoles et Porcins du laboratoire de l'ANSÈS de Ploufragan. Chacune des souches a été mise en culture sur un milieu gélosé mCCDA après une étape préalable d'enrichissement dans un bouillon Preston pendant 48 h à 37°C, en microaérobie. Après 48 h d'incubation à 42°C en atmosphère microaérobie, les colonies isolées ont été récupérées dans 2 mL de PBS pH 7,4; et l'ADN a été extrait puis amplifié en employant les deux protocoles de PCR décrits dans la section 1.1.2 de ce chapitre. Après amplification, l'analyse du Tm associé à chaque souche testée a été réalisée. L'ensemble des résultats est résumé dans le Tableau 49.

Tableau 49: Valeurs des Tm obtenus à partir des amplicons de souches de *C. jejuni*, *C. coli* et *C. lari*

Origine	PCR <i>C. jejuni</i>		PCR <i>C. coli</i>	
	amplification	T°C Melt	amplification	T°C Melt
<b><i>C. jejuni</i></b>				
porc	+	60	-	/
porc	+	60	-	/
poulet	+	60	-	/
poulet	+	60	-	/
dinde	+	60	-	/
dinde	+	60,2	-	/
eau	+	60	-	/
eau	+	60	-	/
eau	+	60	-	/
eau	+	59,8	-	/
-----				
<b><i>C. coli</i></b>				
porc	-	/	+	64
porc	-	/	+	63,7
porc	-	/	+	63,5
porc	-	/	+	63,5
poulet	-	/	+	63,3
poulet	-	/	+	63,5
dinde	-	/	+	63,5
dinde	-	/	+	63,5
eau	-	/	+	63,8
eau	-	/	+	63,5
eau	-	/	+	64
eau	-	/	+	63,7
-----				
<b><i>C. lari</i></b>				
eau	-	/	-	/
eau	-	/	-	/

(+): détection, (-): absence de détection

- En utilisant le jeu d’amorces et de sondes spécifiques de la détection de l’espèce *C. jejuni*, une amplification de l’ADN a été obtenue seulement pour les souches *C. jejuni*, quelle que soit leur origine. Le Tm moyen mesuré à partir des courbes de dissociation est de 60,0°C (ET=0,09°C) (Figure 23).

- En utilisant le jeu d’amorces et de sondes spécifiques de la détection de l’espèce *C. coli*, seul l’ADN des souches *C. coli* a été amplifié. L’analyse de la courbe de dissociation effectuée à partir de chaque amplicon a permis d’estimer un Tm de 63,6°C (ET= 0,22 °C) (Figure 24).

- Aucun signal de fluorescence n’a été détecté lors de l’amplification de l’ADN des souches *C. lari* avec les deux protocoles de PCR.

Au vu des résultats, il apparaît que la méthode de culture-PCR, de part l'analyse du  $T_m$ , permet bien d'opérer une caractérisation des souches provenant de diverses origines, révélées soit *C. jejuni* soit *C. coli*.

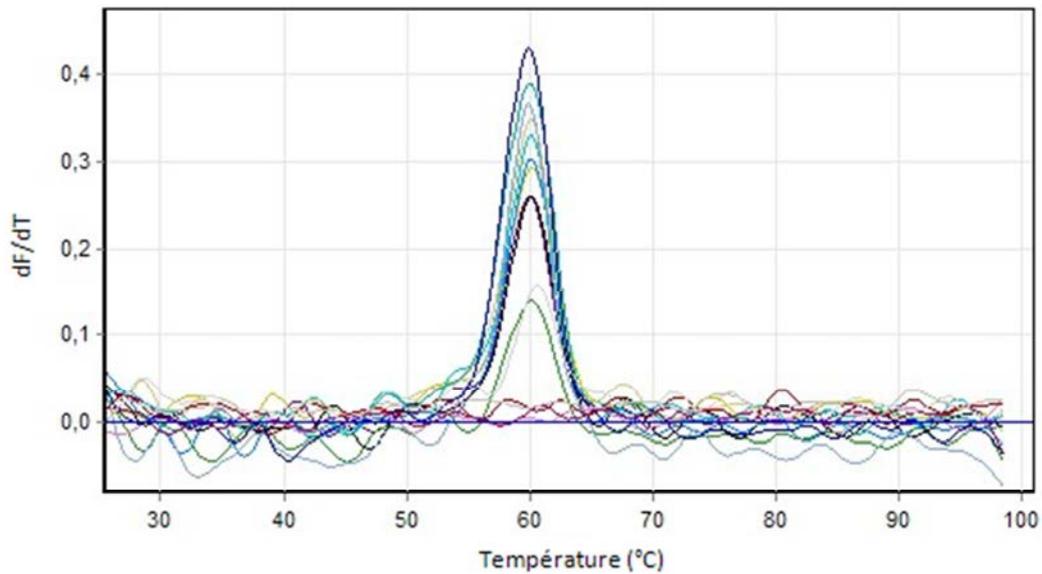


Figure 23: Courbes de dissociation obtenues à partir d'amplicons issus de différentes souches de *Campylobacter* amplifiées par la PCR *C. jejuni*

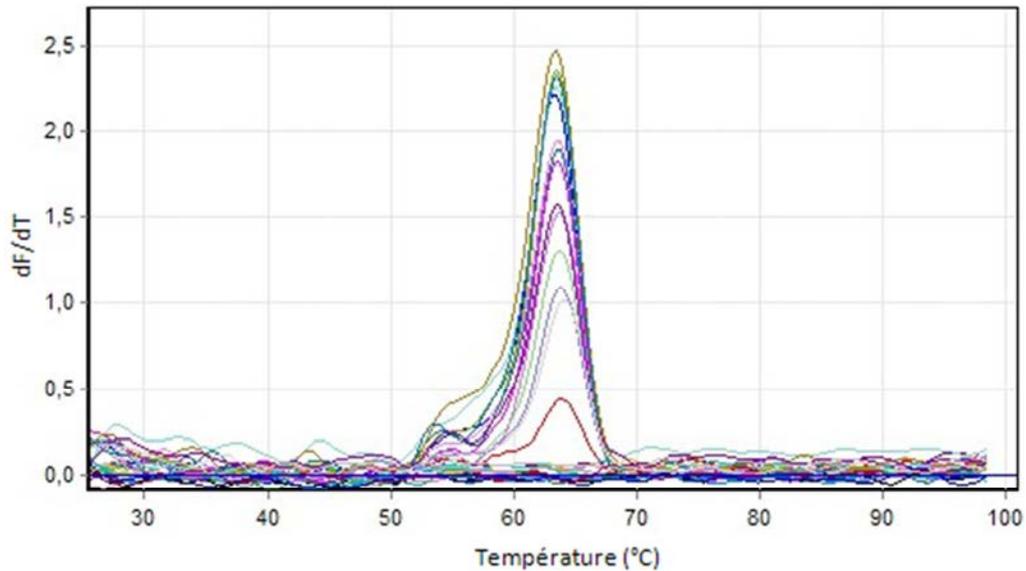


Figure 24: Courbes de dissociation obtenues à partir d'amplicons issus de différentes souches de *Campylobacter* amplifiées par la PCR *C. coli*

### 1.2.2.2. Tests d'identification sur des échantillons environnementaux

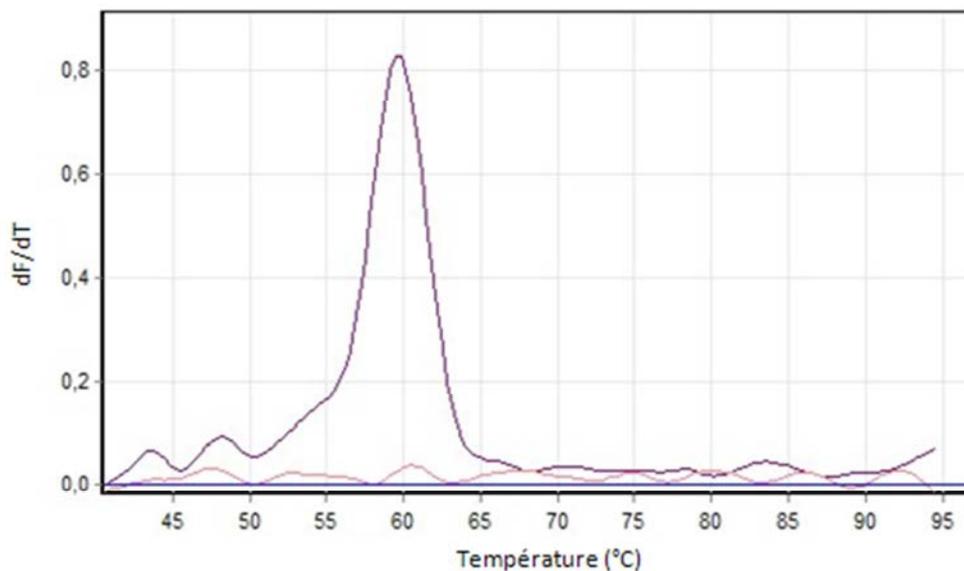
La méthode de culture-PCR a été testée sur des échantillons environnementaux contaminés. Les essais ont été opérés sur des échantillons d'eau de rivière pouvant contenir une flore interférente très importante et de fortes concentrations en matières en suspension. Différents échantillons d'eau de Moselle ont ainsi été testés:

Echantillon A: échantillon d'eau de Moselle exempt de campylobacter, artificiellement contaminé avec une souche de référence *C. jejuni* (NCTC 11168).

Echantillons B et C: échantillons d'eau de Moselle naturellement contaminés avec *C. jejuni* générant divers types de colonies qui sont, soit bien isolées sur le milieu de culture (échantillon B), soit sous forme de tapis donc mêlées à d'autres bactéries (échantillon C).

La détection par PCR en temps réel a été réalisée soit à partir des colonies isolées typiques des campylobacters, soit sur l'ensemble du tapis bactérien. Le  $T_m$  a été déterminé pour chaque amplicon obtenu après amplification. Les résultats présentés sur la Figure 25, montrent une valeur de  $T_m$  respective de 59,9°C; 59,1°C et 59°C quelle que soit la condition testée. Ces résultats confirment que la méthode de PCR mise en place permet l'identification de l'espèce *C. jejuni* provenant d'échantillon d'eau de surface, et ceci à partir de colonies isolées ou noyées dans un tapis bactérien. Pour *C. coli*, des résultats similaires ont été obtenus lors de la réalisation d'expérimentations spécifiques avec un  $T_m$  axé sur la température de 63,6°C (ET=0,22 °C) (Données non montrées).

A)



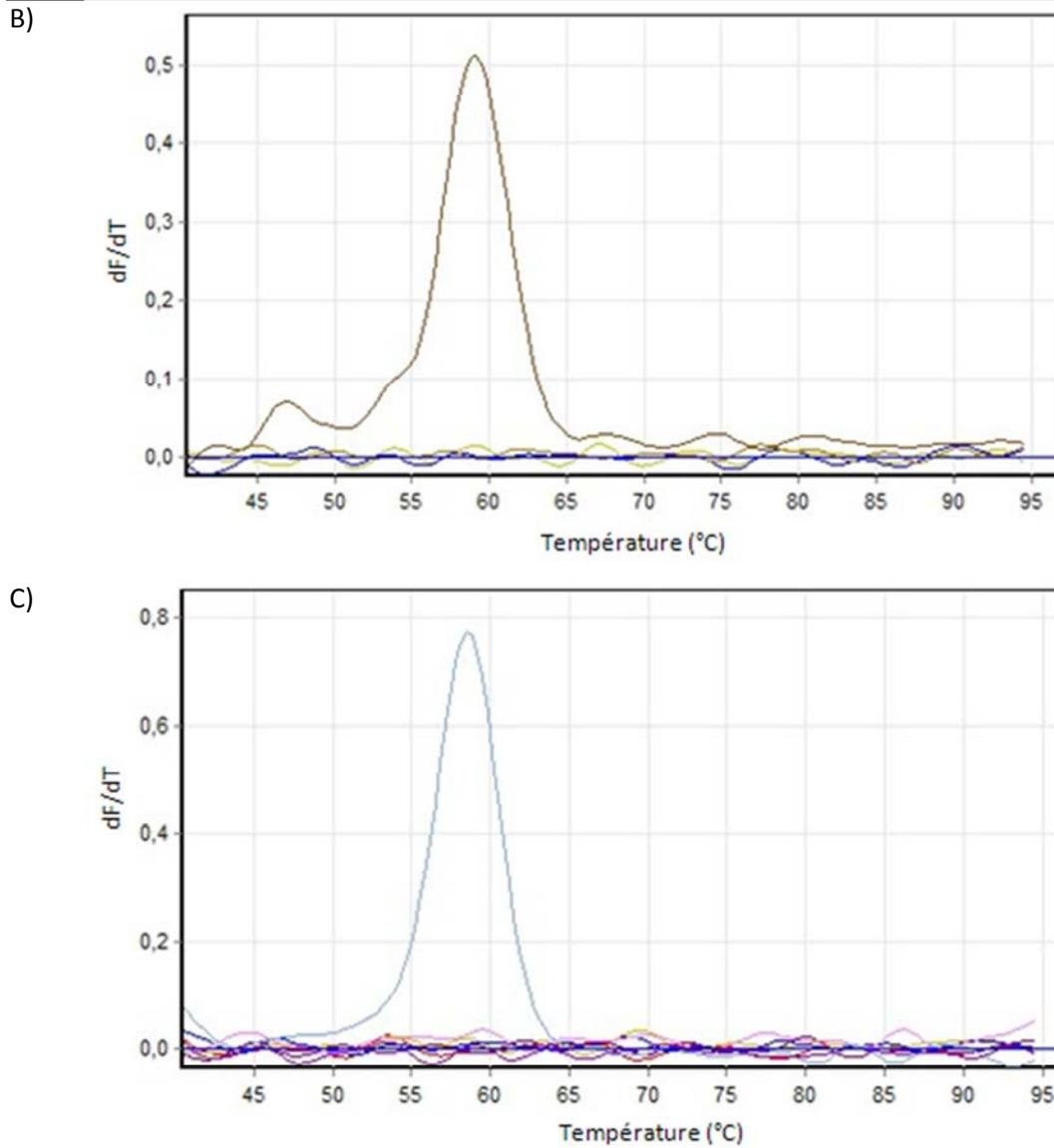


Figure 25: Courbes de dissociation obtenues à partir d'amplicons issus d'un échantillon d'eau de Moselle artificiellement contaminé avec une souche de référence *C. jejuni* (NCTC 11168) (A) ou d'un échantillon d'eau de Moselle naturellement contaminé en *C. jejuni* (colonies isolées sur le milieu gélosé (B) ou présence d'un tapis sur le milieu gélosé (C))

### **1.3. Concentration des campylobacters dans l'eau**

#### **1.3.1. Contexte**

A ce jour la mise en évidence de la présence des campylobacters dans les eaux de surface ou dans les eaux d'alimentation se fait sur des volumes de prises d'essais équivalents, compris entre 0,01 L à 1 L. Si de tels volumes sont compatibles avec une recherche dans des eaux de surface, où les quantités de bactéries ciblées peuvent être importantes, il n'en est pas de même dans des eaux de nappe ou dans des eaux d'alimentation rendues potables après traitement. Pour ces eaux faiblement turbides, l'utilisation de volumes analytiques supérieurs à 1 litre est classiquement recommandée pour effectuer la recherche de nombreux autres pathogènes, présentant notamment des caractéristiques morphologiques très différentes, tels que les virus et les parasites. L'utilisation de volumes analytiques plus importants, pour mettre en évidence la présence des campylobacters thermotolérants dans des eaux d'alimentation, a été prônée par différents auteurs tels que Hänninen *et al.* (2003) qui ont pu mettre en évidence la présence de ces pathogènes dans des échantillons d'eau (de 4 L à 8 L) incriminées dans des épidémies. Pour d'autres auteurs, l'augmentation du volume analytique pourrait être un frein à la détection de ces bactéries car la co-concentration d'une flore autochtone, pouvant empêcher la croissance des bactéries ciblées lors de l'étape de la détection, pourrait générer des résultats faussement négatifs (Abulreesh *et al.*, 2005).

Dans le cadre de ce travail de thèse lors des études de mesure de contamination fécale dans différents milieux hydriques, nous avons suivi les recommandations de la norme ISO 17995 (2005), en termes de volumes analytiques, pour la recherche de ces pathogènes dans les eaux de forte turbidité. Toutefois pour les eaux de faible turbidité, il nous a paru fondamental d'analyser parallèlement des volumes plus importants afin de vérifier que ces eaux étaient exemptes d'une contamination. Dans ce cadre nous avons décidé de développer une méthodologie de concentration permettant l'analyse de volumes de 20 L compatible avec une détection des espèces *C. jejuni* et *C. coli* par les protocoles de PCR mis en place au laboratoire. Pour les eaux de surface, la même démarche a été menée mais sur un volume de 1 L. De manière à pouvoir déterminer la quantité de bactéries présente à l'origine dans les échantillons analysés, il a été nécessaire de déterminer les rendements de chaque méthode.

#### **1.3.2. Evaluation de la méthode de concentration dans les eaux faiblement chargées**

La mise en œuvre des expérimentations, les étapes d'optimisation ainsi que les résultats obtenus lors de ce travail ont été soumis sous une forme détaillée dans un article scientifique paru dans le journal *Applied and Environmental Microbiology* (Tissier *et al.*, 2012). Nous avons donc décidé ci-dessous de présenter les principaux résultats obtenus lors de ce développement.

1.3.2.1. Étude préalable, choix d'une membrane de filtration

Préalablement, un premier travail consistant à sélectionner une membrane adaptée à la filtration d'un grand volume d'eau (>10L) a été réalisé. Notre choix s'est porté sur une membrane plate, de format 47 mm de diamètre pouvant être utilisée classiquement par des laboratoires réalisant des analyses d'eau en routine, sans qu'il soit nécessaire d'avoir à disposition de matériel spécifique supplémentaire. Trois membranes aux caractéristiques physiques très différentes répondaient aux critères établis lors de l'initiation de ce développement (Tableau 50). Dans ce cadre, elles ont été testées afin de sélectionner la plus performante pour concentrer les campylobacters présents dans des échantillons hydriques de grands volumes.

**Tableau 50: Caractéristiques des membranes testées pour la concentration des campylobacters**

Membranes	Nitrate de cellulose (Millipore)	Zetapore (Cuno)	Zetaplus Virosorb 1-MDS (Cuno)
Diamètre	47 mm	47 mm	47 mm
Composition	Ester de cellulose	Cellulose + fibre de verre	nylon
Taille des pores	0,45 µm	0,45 µm	/
Charge	aucune	Chargée positivement	Chargée positivement

La capacité de rétention de chaque membrane a été évaluée par PCR en temps réel ( $RR_{PCR}$ ) et par culture sur milieu gélosé mCCDA ( $RR_c$ ). Les  $RR_{PCR}$  et  $RR_c$  ont été évalués sur 1 L d'eau de réseau artificiellement contaminé avec une quantité respective de *C. coli* de  $1,3 \times 10^5$  et  $3 \times 10^7$  UFC. Le rendement de rétention a donc été déterminé en comparant la quantité de *C. coli* présente dans l'échantillon d'eau avant filtration à celle présente dans l'échantillon après filtration, selon les équations 1 et 2.

$$(1) \quad \text{Rétention mesurée par culture } RR_c(\%) = ((C_i - C_f) / C_i) \times 100$$

Avec:

- $C_i$  la concentration mesurée avant filtration à partir de 100 µL d'échantillon
- $C_f$  la concentration mesurée après filtration à partir de 100 µL de filtrat

$$(2) \quad \text{Rétention mesurée par PCR en temps réel } RR_{PCR}(\%) = 100 - (100 / 10^{((C_{ti} - C_{tf}) / S)})$$

Avec:

- $C_{ti}$ : valeur de Ct mesurée par PCR en temps réel avant filtration à partir de 3 mL d'échantillon
- $C_{tf}$ : la valeur de Ct mesurée par PCR en temps réel après filtration à partir de 3 mL de filtrat
- S: la pente de la droite étalon de la PCR en temps réel.

Il apparaît au vu des résultats présentés dans le Tableau 51 que les rendements d'adsorption mesurés par PCR en temps réel et par culture sont tous supérieurs à 80% quelle que soit la membrane employée.

**Tableau 51: Rendements d'adsorption des différentes membranes mesurés par PCR en temps réel ( $RR_{PCR}$ ) et par culture ( $RR_c$ )**

Membranes	Nitrate de cellulose (Millipore)	Zetapore (Cuno)	Virosorb 1-MDS (Cuno)
$RR_{PCR}(\%)$	90,3 (ET=4,1)	96 (ET=3,5)	83,8 (ET=7,9)
$RR_c (\%)$	90,2 (ET=5,7)	89,6 (ET=4,4)	89,7 (ET= 4)

### 1.3.2.2. Rendement global de la méthode

Les trois membranes sélectionnées présentant la même capacité de rétention, le rendement global de la méthode (concentration + détection) a été déterminé pour chacune d'entre elles. Il s'est avéré que la membrane en nitrate de cellulose permettait d'obtenir les meilleurs rendements. En outre, cette membrane est largement employée par les laboratoires effectuant des analyses d'eau en routine, notamment pour permettre la recherche et le dénombrement de bactéries coliformes et d'*E. coli* (NF EN ISO 9308-1, 2000) ou d'Entérocoques intestinaux (NF EN ISO 7899-2, 2000) dans les eaux d'alimentation. Nous avons donc choisi de retenir cette membrane pour la suite de ce développement. Pour pouvoir récupérer et quantifier le génome des bactéries retenues sur la membrane nous avons montré que l'emploi d'une solution d'éluion à 3% d'extrait de bœuf, 0,05 M de glycine, pH 9, combinée à l'extraction directe du génome sur la membrane permettait d'obtenir les meilleurs rendements (87,3% (ET=22%)). Ces derniers ont été estimés à partir de l'équation (3). Ce protocole a donc été retenu et une évaluation a été opérée sur des échantillons d'1 L et 20 L d'eau de réseau.

- Les expérimentations réalisées sur des échantillons d'1 L d'eau de réseau artificiellement contaminés avec des quantités de *C. coli* de  $4,3 \times 10^4$ ;  $4,3 \times 10^3$ ;  $4,3 \times 10^2$  et  $4,3 \times 10^1$  UFC, ont permis d'obtenir des rendements respectifs de 85,3% (ET=20,8%); 79,7% (ET=10,5%); 66,5% (ET=30,7%) et 83,5% (ET=23,4%). Il a été possible de mesurer, pour seulement un échantillon, un rendement global de la méthode de 4,6% pour une quantité de *C. coli* de 4,3 UFC.

- Pour des échantillons de 20 L d'eau artificiellement contaminés avec  $9,1 \times 10^3$ ;  $9,1 \times 10^2$  et  $9,1 \times 10^1$  UFC *C. coli*, les rendements étaient respectivement de 15,1% (ET=0,8%); 27,5% (ET=0,1%) et 69,5% (ET=10,3%). Afin de confirmer le rendement obtenu pour la plus faible quantité de *C. coli*, nous avons effectué des expérimentations supplémentaires en contaminant artificiellement 20 L d'eau de réseau avec 36 UFC. Des rendements de 78,5% (ET=15,1%) ont été obtenus (n=3) pour cette dernière concentration.

(3) Rendement global de la méthode:  $100/(10^{((Ct_0-Ct_x)/S)})$

Avec:

- $Ct_0$ : valeur de Ct mesurée par PCR en temps réel correspondant à la quantité de génome de campylobacters dans la suspension utilisée pour contaminer l'échantillon d'eau avant l'étape de concentration
- $Ct_x$ : valeur de Ct mesurée par PCR en temps réel correspondant à la quantité de génome obtenue dans le concentrat après l'étape de concentration.
- S: la pente de la droite étalon de la PCR en temps réel.

1.3.2.3. Sensibilité, linéarité et limite de détection

La sensibilité de la méthode a été déterminée pour chaque volume d'eau testé à partir des résultats précédemment obtenus. Sur des échantillons d'1 L d'eau de réseau contaminés avec les différentes quantités de *C. coli* ( $4,3 \times 10^0$ ;  $4,3 \times 10^1$ ;  $4,3 \times 10^2$ ;  $4,3 \times 10^3$  et  $4,3 \times 10^4$  UFC), une droite linéaire de pente de -4,172 et de coefficient de corrélation ( $R^2$ ) de 0,949 a été obtenue (Figure 26). L'efficacité de la méthode est de 74% et la limite de détection est estimée entre 4,3 et 43 UFC (pour 50% et 100% des échantillons, respectivement).

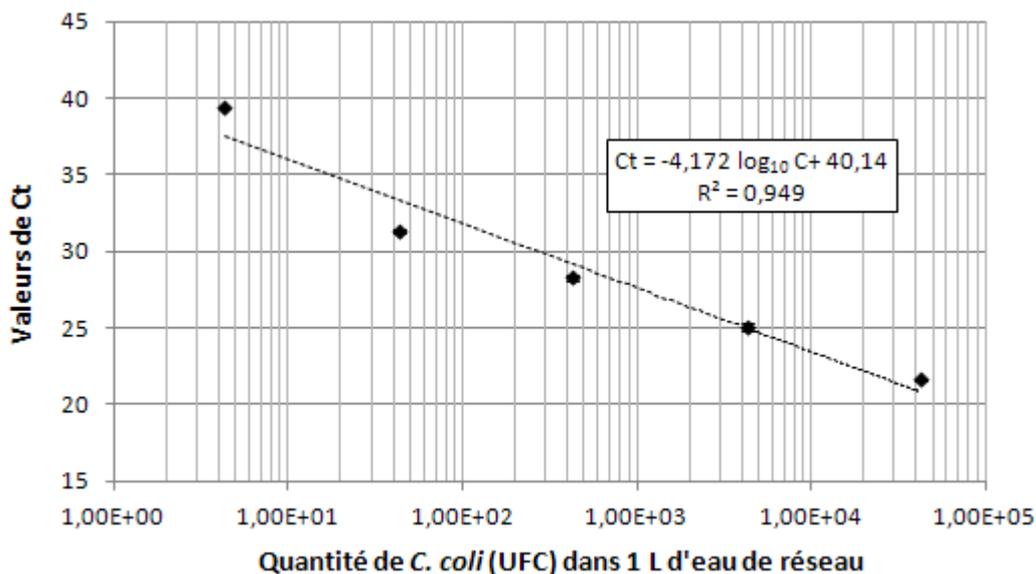


Figure 26: Droite linéaire obtenue par PCR en temps réel à partir d'échantillons d'1L d'eau de réseau artificiellement contaminés avec différentes quantités de *C. coli*

Concernant les échantillons de 20 L d'eau de réseau, une droite de pente -2,374 et de coefficient de corrélation ( $R^2$ ) 0,989 a été obtenue pour des concentrations en *C. coli* comprises entre  $9,1 \times 10^3$  et  $9,1 \times 10^1$  (Figure 27). En prenant en compte les résultats des expérimentations supplémentaires, la limite de détection de la méthode est alors estimée entre 36 et 91 UFC.

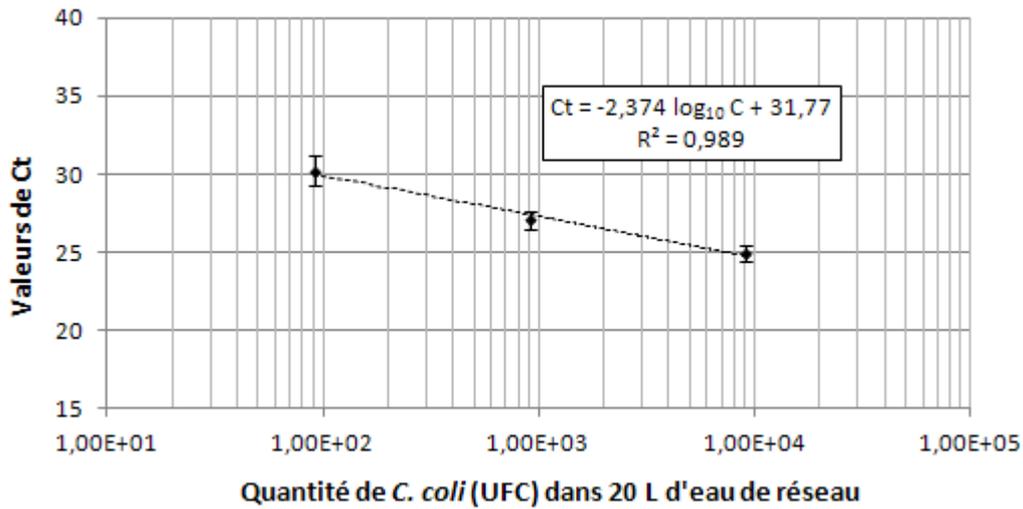


Figure 27: Droite linéaire obtenue par PCR en temps réel à partir d'échantillons de 20L d'eau de réseau artificiellement contaminés avec différentes quantités de *C. coli*

### 1.3.3. Evaluation de la méthode de concentration dans les eaux fortement chargées

Pour des eaux plus chargées en matières en suspension, comme les eaux de rivière, nous avons décidé de retenir la membrane en nitrate de cellulose et d'employer le même protocole de concentration que celui décrit ci-dessus sur des volumes d'1 L d'eau avec cependant quelques modifications adaptées d'Ahmed *et al.* (2009).

#### 1.3.3.1. Détermination du rendement de concentration de la méthode

Après la rétention des bactéries sur la membrane en nitrate de cellulose, celle-ci est introduite dans 5 mL de solution éluante composée de 3% d'extrait de bœuf et 0,05 M de glycine, à pH 9. Après une agitation de 10 minutes avec un vortex, la membrane est retirée et l'éluat est centrifugé à 14 000 rpm pendant 5 minutes afin de culoter les bactéries, qui sont ensuite récupérées dans 200  $\mu$ L de PBS pH 7,4. L'extraction génomique est alors réalisée selon le protocole adapté aux eaux de forte turbidité évalué dans la section 1.1.3.2. de ce chapitre.

L'évaluation de la méthode de détection a été réalisée en triplicat sur des échantillons d'1L d'eau de Moselle artificiellement contaminés avec  $4,8 \times 10^5$  UFC *C. coli*. A ces concentrations et sur ces échantillons, le rendement global de la méthode, estimé selon l'équation 3, a été estimé à 41,2% (ET=1,9%).

1.3.3.2. Linéarité, efficacité et limite de détection de la méthode

Dans un second temps, la sensibilité ainsi que l'efficacité de la méthode ont été déterminées à partir d'une gamme de dilutions logarithmiques d'une suspension de *C. coli*. Chaque dilution a été inoculée dans 1 L d'eau de Moselle et les expérimentations ont été réalisées en triplicat. La droite standard obtenue à partir des différentes quantités de *C. coli*, comprises entre  $2,2 \times 10^4$  à  $2,2 \times 10^1$  UFC, présente une pente de -3,815 et un coefficient de corrélation ( $R^2$ ) de 0,999. L'efficacité de la méthode est de 82,9% et la limite de détection est estimée à 22 UFC (Figure 28).

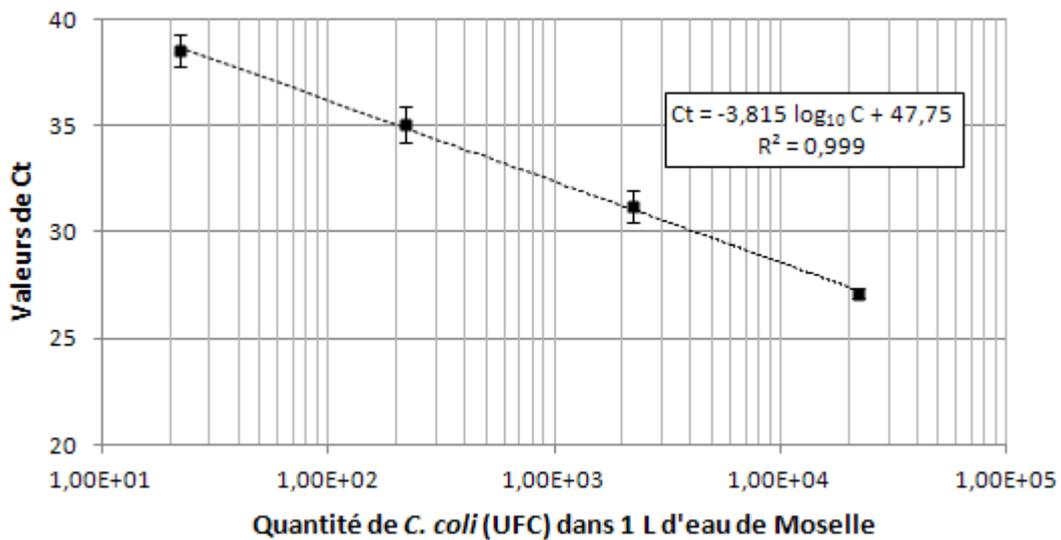


Figure 28: Droite linéaire obtenue par PCR en temps réel à partir d'échantillons d'1L d'eau de Moselle artificiellement contaminés avec différentes quantités de *C. coli*

## **2. LES ADENOVIRUS HUMAINS**

Afin d'étudier le niveau de contamination de différents milieux hydriques par les adénovirus humains, il a été nécessaire de mettre en place et valider les méthodologies permettant:

- ❖ de détecter spécifiquement les adénovirus humains (A à F) en spécifiant plus particulièrement les sérotypes 40 et 41 qui sont les souches virales les plus incriminées dans les épidémies de gastro-entérites humaines
- ❖ de mettre en évidence le caractère infectieux des adénovirus détectés dans les échantillons d'eaux
- ❖ de détecter les adénovirus dans différentes matrices hydriques dont la composition physico-chimique peut être très variable, ce qui, par conséquent, implique l'analyse de différents volumes d'eau.

### **2.1. Détection des adénovirus humains dans l'eau par biologie moléculaire (PCR)**

#### **2.1.1. Contexte**

De nos jours, la détection des adénovirus dans les échantillons hydriques est réalisée à l'aide de méthodes moléculaires. Ces méthodes sont sensibles, spécifiques, et permettent d'obtenir une réponse rapidement. Dans ce travail, nous avons choisi d'utiliser une méthodologie de PCR en temps réel pour mettre en évidence la présence des adénovirus dans les eaux étudiées et pour estimer leur quantité. Il existe un grand nombre de protocoles proposés au travers de la littérature pour mettre en évidence ces pathogènes. De manière à ne pas développer un nouveau protocole, nous avons décidé de sélectionner celui publié par Jothikumar *et al.* (2005) ciblant d'une part tous les sérotypes d'adénovirus humains (adénovirus A-F) via l'utilisation d'une première PCR, et d'autre part ciblant spécifiquement le sous-groupe F (adénovirus entériques sérotypes 40 et 41) responsable d'épidémies de gastro-entérites chez l'Homme. Ces deux méthodes ont fait l'objet d'une évaluation grâce à l'emploi de constructions moléculaires de type plasmidiques et à partir de souches typées obtenues soit par le CHU de Nancy, soit sélectionnées au travers de la collection nationale anglaise de virus pathogènes (Health Protection Agency Culture Collection, Grande Bretagne).

### 2.1.2. Évaluation de la méthode de détection de l'ADN des adénovirus humains

#### 2.1.2.1. Evaluation de la méthode de détection des adénovirus A à F

La méthode de PCR en temps réel développée par Jothikumar *et al.* (2005) cible l'ensemble des adénovirus humains (sérotypes A à F) grâce à l'utilisation d'un jeu d'amorces qui permet d'amplifier une séquence de 96 paires de base codant pour la protéine de la capside, l'hexon, dont les séquences nucléotidiques sont présentées dans le Tableau 52. La révélation du produit d'amplification et la quantification du nombre de particules, initialement présentes dans l'échantillon, s'effectue en temps réel par l'utilisation d'une sonde fluorogénique de type TaqMan.

Pour évaluer ce protocole, il était nécessaire de construire au préalable un étalon moléculaire contenant un nombre de copies connu du gène d'intérêt ciblé. Pour cela une construction plasmidique a été réalisée en incorporant le gène d'un adénovirus 1 à l'intérieur d'un vecteur de type pDrive Cloning Vector (Qiagen). Un stock d'ADN de  $3,38 \times 10^{10}$  copies de génome/ $\mu\text{L}$  a ainsi été généré. A partir de gammes étalon générées avec ce stock d'ADN plasmidique, des tests préliminaires ont été réalisés sur les appareillages du laboratoire afin de définir les meilleures conditions opératoires d'amplification. Les résultats obtenus ont mis en évidence qu'une concentration en amorces et en sonde de  $0,4 \mu\text{M}$  permettait d'obtenir des valeurs de Ct et une intensité de fluorescence optimales. Ces concentrations ont été utilisées pour la suite de ce travail. Les concentrations initiales et finales de tous les réactifs composant le milieu réactionnel de PCR en temps réel sont présentées dans le Tableau 53.

**Tableau 52: Séquences nucléotidiques des amorces et de la sonde TaqMan utilisées pour la détection et la quantification des adénovirus humains par PCR en temps réel (Jothikumar *et al.*, 2005)**

	Dénomination (fonction)	Séquence (5'→3')	Longueur (bases)	Localisation
<b>Amorces</b>	JTVXF (sens)	GGACGCCTCGGAGTACCTGAG	21	18895–18915
	JTVXR (antisens)	ACIGTGGGGTTTCTGAACTTGTT	23	18990–18968
<b>Sonde Taqman</b>	JTVXP (sens)	FAM - CTGGTGCAGTTCGCCCGTGCCA - BHQ	22	18923–18944

**Tableau 53: Composition du milieu réactionnel de PCR quantitative pour la détection et la quantification des adénovirus humains**

Réactifs	Concentration initiale	Volume/échantillon	Concentration finale
Quantitect Probe PCR kit (Qiagen, réf 204343)	/	12,5 $\mu\text{L}$	/
H2O RNase-DNase free (Sigma, W4502)	/	7 $\mu\text{L}$	/
Amorce JTVXF	10 $\mu\text{M}$	1 $\mu\text{L}$	0,4 $\mu\text{M}$
Amorce JTVXR	10 $\mu\text{M}$	1 $\mu\text{L}$	0,4 $\mu\text{M}$
Sonde JTVXP	10 $\mu\text{M}$	1 $\mu\text{L}$	0,4 $\mu\text{M}$
ADN extrait	/	2,5 $\mu\text{L}$	/

L'amplification de l'ADN est réalisée en plusieurs étapes: une étape initiale de 15 secondes à 94°C pour l'activation de la Taq Polymérase, suivie par une succession de 45 cycles à 95°C pendant 15 secondes pour la dénaturation du double brin d'ADN et à 60°C pendant 1 minute pour l'hybridation des amorces et l'élongation du brin complémentaire.

2.1.2.1.1. *Domaine de linéarité, efficacité et limite de détection de la méthode*

La linéarité, l'efficacité ainsi que la limite de détection de la PCR en temps réel ont été déterminées sur les appareillages du laboratoire et dans les conditions opératoires optimisées, sur des gammes de dilutions de raison 10 réalisées à partir du stock d'ADN plasmidique.

En condition de répétabilité, une gamme de dilutions de raison 10 a été réalisée à partir du stock d'ADN plasmidique et toutes les dilutions ont été amplifiées simultanément (n=3). Les résultats de la Figure 29 montrent qu'une réponse linéaire est obtenue sur 6 dilutions logarithmiques pour 100% des échantillons et sur les 7 dilutions logarithmiques testées pour 66,7% des échantillons. L'efficacité du protocole de PCR, calculée à partir de la pente de la droite étalon, est de 85,6% et la limite de détection est estimée entre 3,38 et 33,8 copies de génome/ $\mu$ L.

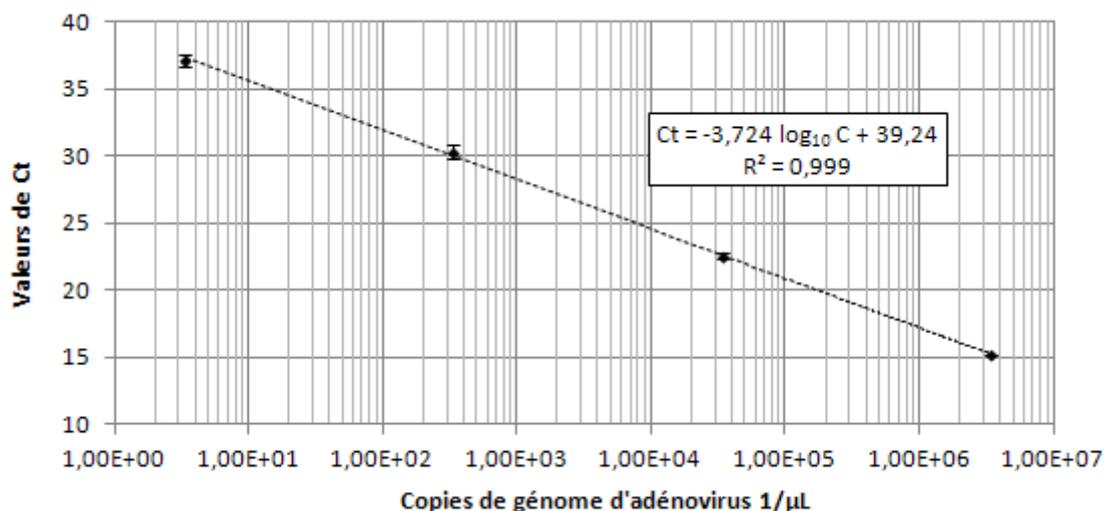


Figure 29: Gamme standard permettant la quantification absolue du génome d'adénovirus 1, obtenue à partir des dilutions logarithmiques du plasmide porteur du gène d'intérêt (n=3) en conditions de répétabilité

Les mêmes critères ont été évalués en conditions de reproductibilité. La Figure 30 correspond à la droite étalon obtenue avec une gamme de dilutions de raison 10 réalisée à partir du stock d'ADN plasmidique amplifiée quatre fois séparément. La pente de cette droite est de -3,518 et le coefficient de corrélation ( $R^2$ ) est de 0,999. Le domaine de linéarité s'étend sur 6 et 7 dilutions logarithmiques pour 100% et 75% des échantillons respectivement. L'efficacité de la PCR est de 92,4% et la limite de détection est comprise entre 3,38 et 33,8 copies de génome/ $\mu$ L.

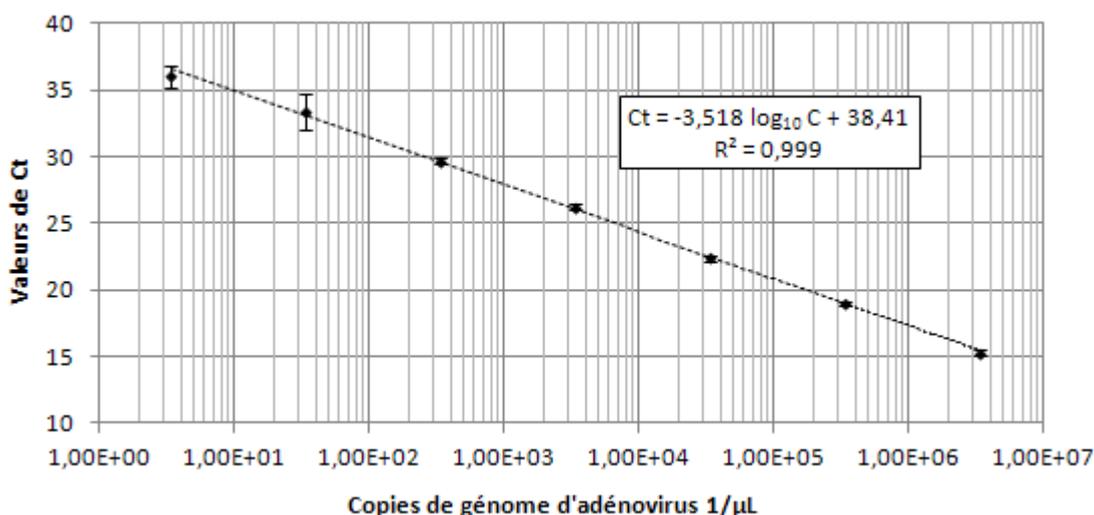


Figure 30: Gamme standard permettant la quantification absolue du génome d'adénovirus 1, obtenue à partir des dilutions logarithmiques du plasmide porteur du gène d'intérêt (n=3) en condition de reproductibilité

#### 2.1.2.1.2. Variabilité intra et inter-essais

A partir des Ct générés, nous avons calculé les coefficients de variation pour chaque dilution testée (Tableau 54). Il s'avère que pour une quantité d'ADN comprise entre  $3,38 \times 10^0$  et  $3,38 \times 10^6$  copies de génome/ $\mu$ L, les coefficients de variation intra et inter-essais varient respectivement de 0,2% à 1,84% et de 0,58% à 4,05%.

Tableau 54: Coefficients de variation obtenus en conditions de répétabilité (CV% intra-essais) et de reproductibilité (CV% inter-essais)

Concentrations en copies de génomes/ $\mu$ L	$3,38 \times 10^6$	$3,38 \times 10^5$	$3,38 \times 10^4$	$3,38 \times 10^3$	$3,38 \times 10^2$	$3,38 \times 10^1$	$3,38 \times 10^0$	$3,38 \times 10^{-1}$
CV % intra-essais (n=3)	0,20	NA	0,88	NA	1,84	NA	1,14*	NC
CV % inter-essais (n=4)	1,13	0,58	0,82	0,91	0,86	4,05	2,21**	NC

NA: Non Analysé; NC: Non Calculé car 0 réplikat positif/3; \*: 2 réplikat positifs/3; \*\*:3 réplikat positifs/4

#### 2.1.2.1.3. Tests sur différentes sérotypes d'adénovirus humains

Des tests ont été réalisés sur de l'ADN d'adénovirus humains 1, 2, 3, 5, 7, 40 et 41 (Sous-groupes B, C et F), dans le but de vérifier le fonctionnement de la méthodologie mise en place. Il ne nous a pas été possible d'obtenir les 51 sérotypes. Pour chaque sérotype testé, 3 dilutions logarithmiques ont été effectuées à partir de chaque suspension virale et amplifiées par PCR. Une amplification a été obtenue pour chaque sérotype et pour chaque dilution testée.

#### 2.1.2.2. Evaluation de la méthode de détection des adénovirus F

Pour spécifier la présence des adénovirus 40 et 41 (sous-groupe F), parmi les adénovirus humain A à F détectés dans les échantillons, nous avons sélectionné la seconde méthode de PCR en temps réel développée par Jothikumar *et al.* (2005). Dans ce protocole, un seul système d'amorces et de sondes fluorogéniques de type FRET (Fluorescent Resonance Energy Transfer) permet de détecter les deux sérotypes (adénovirus 40 et 41) par l'amplification d'une séquence de 118 paires de bases du gène codant pour une des protéines majeures de la capsid, la protéine de la fibre. La différenciation des deux sérotypes d'adénovirus est réalisée à la fin de l'étape d'amplification par l'analyse des courbes de dissociation des produits de PCR. Ces courbes sont générées en mesurant l'intensité de fluorescence lors d'une montée progressive de la température par palier de 0,1°C. Dans le protocole développé par Jothikumar *et al.* (2005), les T<sub>m</sub> des adénovirus 40 et 41 sont respectivement compris entre 58,95 et 59,17°C et entre 62,57 et 63,15°C.

Les tests préliminaires réalisés sur une suspension d'adénovirus 40 (NCPV#293, issu de la collection nationale anglaise de virus pathogènes, HPACC, Grande Bretagne) et d'adénovirus 41 (fourni par le CHU de Nancy), à partir des appareillages du laboratoire et en respectant les conditions opératoires mentionnées par les auteurs, ne nous ont pas permis d'obtenir de signal de fluorescence pour le sérotype 40, alors que le système fonctionne pour l'adénovirus 41. Sur le sérotype 40 à disposition, plusieurs tentatives d'optimisation ont été menées en vain. Il est difficile d'expliquer à ce jour les raisons de cet échec. Dans ce contexte et pour la suite de nos travaux, nous avons décidé de retenir une nouvelle approche basée sur l'emploi du même jeu d'amorces pour la PCR que celui de Jothikumar *et al.* (2005) et de remplacer les sondes FRET par celui d'un intercalant non spécifique, le SYBR Green (Tableau 55). L'utilisation d'une telle combinaison a l'inconvénient de diminuer la spécificité du système de détection. Toutefois, l'analyse des T<sub>m</sub> en mode HRM (High Resolution Melt) après amplification permet de maintenir un haut niveau de spécificité. En effet, la courbe de dissociation est réalisée en mesurant l'intensité de fluorescence générée à partir des amplicons produits, grâce à une augmentation progressive de la température de 75 à 85°C par palier de 0,1°C. Ce procédé permet ainsi de déterminer avec précision des différences de quelques nucléotides au sein de séquences consensus. Rappelons enfin que le protocole de détection des adénovirus F est opéré suite à une détection via une première révélation par une PCR Taq Man ciblant les adénovirus A à F, ce qui assoit confortablement le niveau de spécificité du protocole de détection mis en place (double PCR successives).

**Tableau 55: Séquences nucléotidiques des amorces utilisées pour la détection des adénovirus humains entériques (Jothikumar *et al.*, 2005)**

	Dénomination (fonction)	Séquence (5'→3')	Longueur (bases)	Localisation
<b>Amorces</b>	JTVFF (sens)	AACTTTCTCTCTTAATAGACGCC	23	619-641
	JTVFR (antisens)	AGGGGGCTAGAAAACAAAA	19	718-736

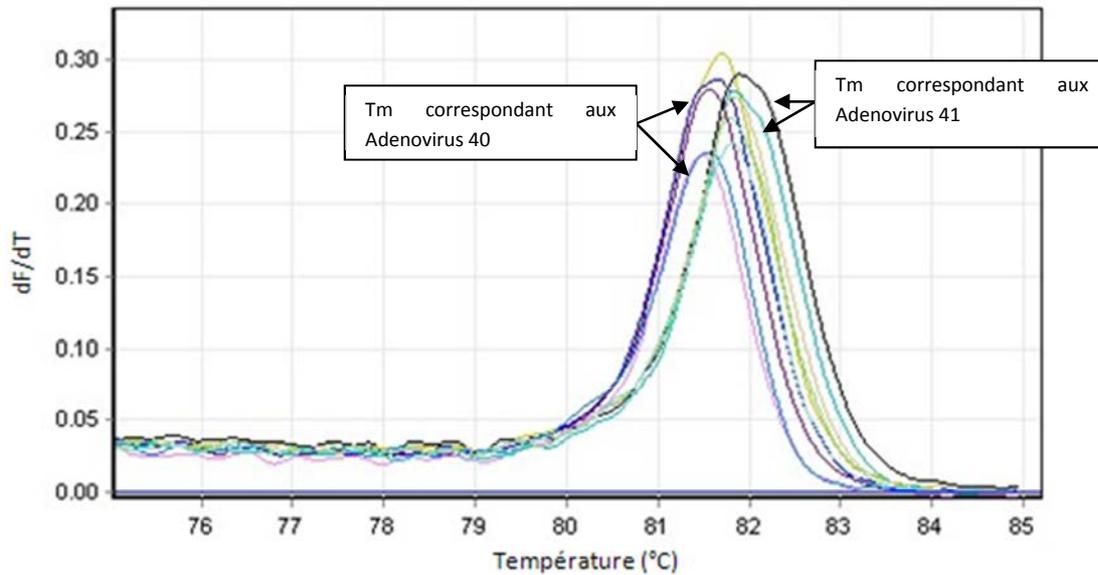
Les concentrations initiales et finales de tous les réactifs composant le milieu réactionnel de PCR en temps réel sont présentées dans le Tableau 56. L'amplification est réalisée en plusieurs étapes qui consistent en une activation enzymatique de la Taq Polymérase à 95°C pendant 15 secondes suivie de 45 cycles composés chacun de 15 secondes à 95°C (dénaturation), et 10 secondes à 60°C (hybridation des amorces et élongation). A la fin de l'étape d'amplification, une courbe de dissociation en mode HRM est réalisée.

**Tableau 56: Composition du milieu réactionnel de PCR quantitative pour la détection des adénovirus humains entériques**

Réactifs	Concentration initiale	Volume/échantillon	Concentration finale
<b>Rotor-Gene Sybr Green (Qiagen, réf 204074)</b>	2X	12,5 µL	1X
<b>H2O RNase-DNase free (Sigma, réf W4502)</b>	/	5 µL	/
<b>Amorce JTVFF</b>	10 µM	2,5 µL	1 µM
<b>Amorce JTVFR</b>	10 µM	2,5 µL	1 µM
<b>ADN extrait</b>	/	2,5 µL	/

#### 2.1.2.2.1. Limite de détection de la méthode

L'évaluation du nouveau protocole de PCR a été réalisée à l'aide de deux plasmides construits à partir du gène ciblé d'un adénovirus 40 et d'un adénovirus 41 dans des vecteurs pDrive Cloning Vector (Qiagen). Des stocks d'ADN plasmidique d'adénovirus 40 et d'adénovirus 41 à une concentration respective de  $6,93 \times 10^{10}$  copies de génomes/µL et  $5,99 \times 10^{10}$  copies de génomes/µL ont ainsi été générés. Une gamme de dilutions de raison 10 a été réalisée à partir de chaque stock d'ADN plasmidique, et toutes les dilutions ont été amplifiées simultanément. Après amplification, l'analyse du Tm associé à chaque souche testée a été réalisée.



**Figure 31: Courbes de dissociation obtenues à partir d'amplicons d'une gamme de dilutions de raison 10 du stock d'ADN plasmidique d'adénovirus 40 et 41, en conditions de répétabilité (n=3)**

A partir de chaque amplicon, nous avons obtenu en mode HRM une valeur moyenne de  $T_m$  de 81,2°C (ET=0,05°C) et de 81,7°C (ET=0,07°C) respectivement pour l'adénovirus 40 et 41. La limite de détection est estimée à 69,3 copies de génomes/ $\mu$ L pour l'adénovirus 40 et à 59,9 copies de génomes/ $\mu$ L pour l'adénovirus 41.

Un séquençage des produits amplifiés a permis de mettre en évidence que seuls 4 nucléotides, sur la séquence amplifiée de 118 paires de bases, diffèrent entre les adénovirus 40 et 41 ce qui explique cette faible différence de  $T_m$  d'environ 0,4°C.

La méthode de PCR a été testée sur des échantillons environnementaux. Pour cela, les adénovirus humains ont été recherchés dans des échantillons de 10 L d'eau de rivière. La PCR TaqMan a permis de détecter la présence d'adénovirus humains dans les 10 échantillons analysés. Dans un second temps, la PCR HRM a été employée pour rechercher la présence spécifique des adénovirus entériques. Deux échantillons se sont révélés positifs, l'un en adénovirus 40 ( $T_m=81,3^\circ\text{C}$ ) et l'autre en adénovirus 41 ( $T_m=81,9^\circ\text{C}$ ). Un séquençage a été réalisé à partir des produits amplifiés pour identifier les sérotypes. L'ensemble des résultats du séquençage confirme bien la mise en évidence d'adénovirus 40 ou 41 dans les deux échantillons déclarés positifs par PCR.

A partir de ces résultats et pour la suite des expériences, nous avons décidé de considérer un échantillon positif en adénovirus 40 ou 41 si deux critères sont réunis, à savoir une émission de fluorescence lors de l'amplification de l'ADN, et une valeur de  $T_m$  des amplicons spécifique des deux sérotypes.

#### 2.1.2.2.2. Variabilité intra et inter-essais

La variabilité de la technique a été évaluée en triplicat, en conditions de répétabilité et de reproductibilité à partir d'une gamme de dilutions de raison 10 réalisée à partir des stocks d'ADN.

En conditions de répétabilité, nous avons obtenu une valeur moyenne de  $T_m$  de 81,2°C (ET=0,05°C) et de 81,7°C (ET=0,07°C), respectivement pour l'adénovirus 40 et 41. La limite de détection est de 69,3 copies de génomes/ $\mu$ L pour l'adénovirus 40 et de 59,9 copies de génomes/ $\mu$ L pour l'adénovirus 41.

En conditions de reproductibilité, la valeur moyenne de  $T_m$  des produits de PCR d'adénovirus 40 et d'adénovirus 41 est respectivement 81,5°C (ET=0,06°C) et 81,9°C (ET=0,08°C), et la limite de détection est identique à celle obtenue en conditions de répétabilité.

#### 2.1.2.2.3. Test sur les différents sérotypes d'adénovirus humains

Le protocole de PCR a été testé sur des suspensions d'adénovirus appartenant aux sérogroupes 1, 2, 3, 5, 7, 40 et 41. A l'issue du test, seul l'ADN des adénovirus 40 et 41 a pu être détecté, avec des  $T_m$  compris entre 81,1°C et 82°C. Ces derniers résultats indiquent que la PCR mise en place au laboratoire est donc bien spécifique des adénovirus entériques.

### 2.1.3. Evaluation de la méthode d'extraction de l'ADN des adénovirus humains

Préalablement à l'amplification de l'ADN des virus par PCR, il est nécessaire d'opérer une extraction du génome viral. Cette étape se fait par le biais de réactifs chimiques qui vont lyser la capsid et libérer l'ADN qui sera dans un second temps récupéré dans un plus faible volume par un procédé de concentration sur colonnes ou billes de silice. Dans le cadre de ce travail, le kit commercial NUCLISENS Magnetic Extraction Reagents (Biomérieux, réf 200293) a été sélectionné pour l'extraction génomique de l'ADN des adénovirus humains issus d'échantillons environnementaux. Ce système présente plusieurs avantages qui sont (i) la capacité à traiter un volume d'échantillon important (5 mL) et (ii) d'être adapté à des échantillons pouvant contenir une quantité importante de matières en suspensions importante.

L'évaluation de la méthode d'extraction a été opérée sur différentes dilutions logarithmiques d'une suspension d'adénovirus 1 infectieux préparée dans du PBS à pH 7,4. Cette méthode a également été évaluée en présence de virus dilué dans du tampon d'élution, composé de 0,05 M de glycine et de 3% d'extrait de bœuf à pH 9,5 employé pour éluer les particules virales lors de l'étape de concentration. Ces derniers essais avaient pour objectif de tester le système en présence d'une solution contenant des teneurs importantes en protéines apportées par l'extrait de bœuf.

2.1.3.1. Linéarité, rendement et limite de détection de la méthode

L'extraction génomique a été réalisée à partir de 5 mL de chaque tampon artificiellement contaminé avec 100 µL d'une gamme de dilutions de raison 10 d'adénovirus 1 infectieux. La linéarité, la sensibilité et l'efficacité de l'ensemble « extraction génomique + détection » ont été vérifiées en conditions de reproductibilité (n=3) et les résultats sont présentés sur la Figure 32 et la Figure 33.

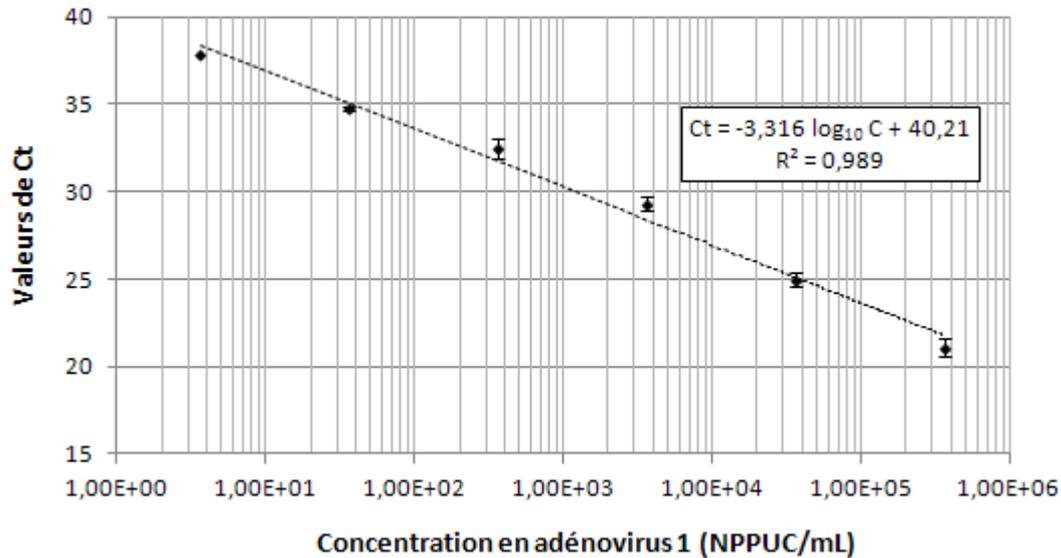


Figure 32: Droite standard obtenue par PCR en temps réel après extraction génomique de différentes quantités d'adénovirus 1 inoculées dans du tampon PBS

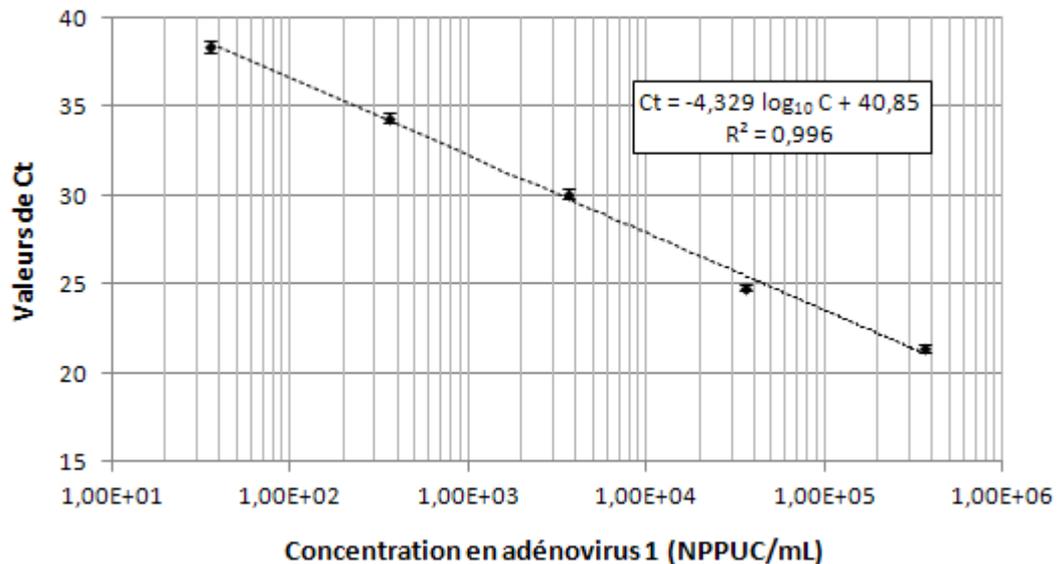


Figure 33: Droite standard obtenue par PCR en temps réel après extraction génomique de différentes quantités d'adénovirus 1 inoculées dans du tampon d'éluion

- La droite standard obtenue à partir de la gamme de dilutions de raison 10 réalisée dans du tampon PBS pH7,4 présente une pente de -3,316 et un coefficient de corrélation ( $R^2$ ) de 0,989. Le domaine de linéarité s'étend sur 5 unités logarithmiques pour 100% des échantillons et sur 6 unités logarithmiques pour 33,3% des échantillons. La limite de détection est comprise entre 3,6 NPPUC/mL (33,3% des échantillons) et 36 NPPUC/mL (100% des échantillons). L'efficacité de la méthode, calculée à partir de la pente de la droite, est estimée à 100,3%.
- Lorsque les mêmes expérimentations sont effectuées dans du tampon d'élution, la droite standard obtenue présente une pente et un coefficient de corrélation ( $R^2$ ) respectivement de -4,329 et 0,996. Une réponse linéaire sur 5 unités logarithmiques est respectée avec une limite de détection estimée à 36 NPPUC/mL et une efficacité à 70,2%.

### 2.1.3.2. Variabilité inter-essais

A partir des valeurs de Ct obtenues précédemment dans chaque tampon, les coefficients de variation ont été calculés et sont rapportés dans le Tableau 57.

**Tableau 57: Coefficients de variation déterminés en conditions de reproductibilité (CV% inter-essais) lors de l'extraction de l'ADN de différentes quantités d'adénovirus 1 inoculées dans du tampon PBS et du tampon d'élution**

Concentration en adénovirus 1 (NPPUC/mL)		$3,6 \times 10^5$	$3,6 \times 10^4$	$3,6 \times 10^3$	$3,6 \times 10^2$	$3,6 \times 10^1$	$3,6 \times 10^0$
CV% (n=3)	Tampon PBS	2,53	1,38	1,3	1,77	0,31	NC*
	Tampon d'élution	1,11	0,69	0,95	0,85	1,94	NC

NC: non déterminé car 0 répliquat positif/3 en PCR; NC\*: non déterminé car 1 répliquat positif/3 en PCR

Il a été mesuré pour des concentrations en adénovirus comprises entre  $3,6 \times 10^5$  et  $3,6 \times 10^1$  NPPUC/mL des variations inter-essais de 0,31% à 2,53% et de 0,69% à 1,94% respectivement lorsque le virus est dilué dans le tampon PBS et dans le tampon d'élution. Étant donné la similitude des valeurs obtenues à celles de la PCR en temps réel à proprement parlé, nous pouvons estimer que l'étape d'extraction génomique n'apporte pas de variation supplémentaire à l'étape de détection.

Ce protocole sera employé dans l'étude d'évaluation du niveau de pollution virale de différents milieux hydriques pour l'extraction du génome viral à partir de concentrats issus d'échantillons d'eaux propres (eaux d'alimentation, eaux de nappe) et d'échantillons d'eaux fortement turbides (eaux de rivière).

## **2.2. Mise en évidence de l'infectiosité des adénovirus humains**

### **2.2.1. Contexte**

La détection du génome d'adénovirus dans un échantillon d'eau informe sur la présence de ce virus mais ne permet pas d'attester de son infectiosité. La mise en évidence du caractère infectieux des adénovirus se fait classiquement par l'intermédiaire de méthode de culture sur cellules spécifiques. Cependant ces méthodes présentent un certain nombre d'inconvénients dont le principal est de ne pouvoir obtenir un résultat rapidement, puisque 7 à 12 jours sont nécessaires pour obtenir une réponse. Afin de diminuer le délai analytique, différents auteurs ont proposé des méthodes couplées de culture cellulaire et PCR: Integrated Cell Culture PCR (ICC-PCR). L'intérêt de l'ICC-PCR est de pouvoir mettre en évidence une multiplication du génome des virions en formation au sein des cellules en cours d'infection. La mise en évidence de cette multiplication peut se faire très tôt dans le cycle infectant. L'autre avantage est que cette multiplication permet d'améliorer la sensibilité de détection de la méthode. Au début de nos travaux, toutes les méthodes d'ICC-PCR à disposition au travers de la littérature étaient basées sur la détection du génome viral au sein de tapis cellulaire inoculés dans des flasques de culture. Toutefois, ce procédé ne permet d'analyser qu'une fraction des cellules infectées. En outre, l'obtention d'informations de type semi-quantitatives, en lien avec la quantité de virus dans l'échantillon, est plus complexe à obtenir car elle nécessite de réaliser des dilutions de l'échantillon et l'inoculation de différentes flasques de culture. Dans l'objectif de simplifier et miniaturiser le process de détection des adénovirus par ICC-PCR, nous avons décidé de développer une méthode axée sur une recherche en microplaque de format 96 puits permettant l'analyse de différentes dilutions sur la même plaque. L'utilisation d'un tel format permet en outre de réaliser simultanément une quantification par culture cellulaire traditionnelle avant d'opérer l'analyse par ICC-PCR. Enfin, ce système peut être automatisé pour l'analyse de grandes séries d'échantillons.

### **2.2.2. Détection des adénovirus humains infectieux par ICC-PCR en microplaque**

#### **2.2.2.1. Evaluation de la méthode d'extraction génomique des virus inoculés sur les cellules en tapis dans les micropuits**

La recherche des adénovirus infectieux par la méthode d'ICC-PCR en microplaques de 96 puits nous a conduit à devoir sélectionner une méthode d'extraction génomique adaptée à l'analyse de volumes de 800  $\mu$ L de suspension virale. Ces volumes correspondent à l'analyse de 8 puits, chacun inoculé avec 100  $\mu$ L d'une suspension virale (ou de sa dilution). Nous avons décidé d'employer le système de concentration/ purification de l'ADN basé sur la filtration sur des colonnes à membrane de silice. Cette étape est réalisée à l'aide du kit commercial Qiampl Viral RNA mini kit (Qiagen).

La linéarité et la sensibilité de l'ensemble « extraction génomique + détection par PCR en temps réel » ont été déterminées à partir de volumes de 800 µL de dilutions de raison 10 réalisées à partir d'une suspension virale d'adénovirus 1 infectieux. Les expérimentations ont été effectuées en duplicat dans du milieu de survie, composé de « Minimum Essential Medium » stérile (MEM) de Eagle (Sigma, réf M5650) contenant du rouge de phénol à titre d'indicateur de pH, de L-Glutamine à raison de 1% (Sigma, réf G7513) et de sérum de veau fœtal (Invitrogen, réf 10500-064) décomplémenté à la chaleur (30 min à 56°C) à raison de 2%, artificiellement contaminé avec des quantités d'adénovirus 1 comprises entre  $1,8 \times 10^1$  et  $1,8 \times 10^5$  NPPUC/mL. 100 µL de chaque dilution ont été inoculés dans 8 puits présentant un tapis cellulaire de cellules A549, lignée cellulaire issues d'un carcinome de poumon humain. Après trois cycles de congélation/décongélation, l'ensemble « virus + cellules » a été récupéré et l'ADN viral a été extrait à l'aide du kit commercial QIAmp Viral RNA mini kit (Qiagen, réf 53906), selon le protocole décrit dans la section 1.3.1.1. du chapitre Matériels et Méthodes.

Parallèlement, une gamme de dilutions de raison 10 a été réalisée dans du PBS, pH 7,4 avec le même stock de virus employé précédemment. L'ADN a été extrait à partir du même volume sur des quantités d'adénovirus comprises entre  $1,8 \times 10^1$  et  $1,8 \times 10^5$  NPPUC/mL. Les résultats sont présentés sur la Figure 34.

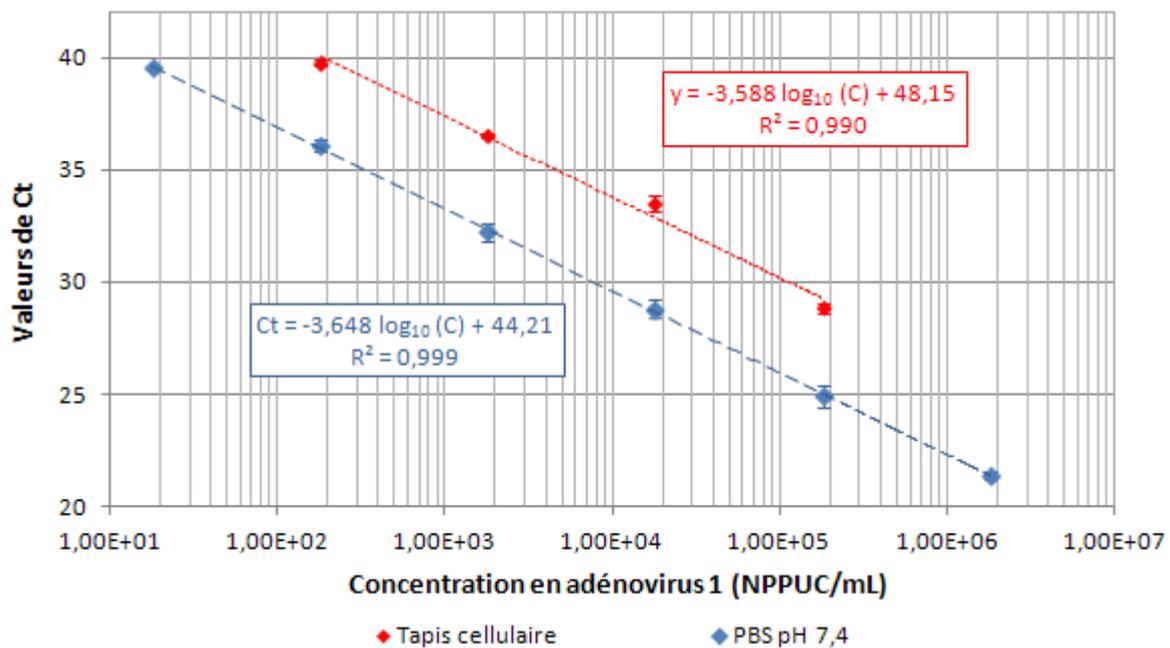


Figure 34: Courbes standards obtenues par PCR en temps réel après extraction génomique de différentes quantités d'adénovirus 1 inoculées sur un tapis cellulaire et dans du PBS pH 7,4 (n=2)

La courbe standard obtenue par dilutions de raison 10 d'une suspension d'adénovirus 1 sur le tapis cellulaire A549 présente une pente de -3,588 et un coefficient de corrélation ( $R^2$ ) de 0,990. Le domaine de linéarité s'étend sur 4 dilutions logarithmiques et l'efficacité de la méthode est estimée à 90,1%. La limite de détection de la méthode est de 180 NPPUC/mL.

Lorsque l'extraction génomique est effectuée sur une gamme de dilutions de raison 10 réalisée dans du PBS pH 7,4, la droite standard obtenue présente une pente de 3,648 et un coefficient de corrélation ( $R^2$ ) de 0,999. L'efficacité de la méthode est estimée à 87,9% et la limite de détection à 18 NPPUC/mL.

L'obtention d'une différence de résultats (plus de 1  $\log_{10}$ ) entre des Ct mesurés sur la même concentration de virus inoculée dans deux milieux peut être clairement liée à la présence des cellules dans le milieu de culture par rapport au PBS. Il semblerait que l'ADN cellulaire co-extrait avec l'ADN viral ou le grand nombre de protéines issues des cellules, ou encore la présence d'autres molécules qui interfèrerait avec la capacité des membranes de silice des colonnes à retenir l'ADN viral, ou alors qui provoquerait une interférence sur la méthode de détection. Il n'est pas possible de déterminer quelle hypothèse est la plus plausible. Cependant, malgré cette interférence de la matrice sur le procédé d'extraction, il peut être observé que celle-ci est régulière quelle que soit la concentration testée. Ce dernier constat est important car dans cette configuration expérimentale ces résultats n'interfèrent pas sur une possible quantification.

#### 2.2.2.2. Evaluation de la méthode d'ICC-PCR en microplaque de 96 puits.

L'évaluation de la méthode d'ICC-PCR a été opérée sur une gamme de dilutions de raison 10 réalisée en duplicat à partir d'une suspension d'adénovirus 1 infectieux. 100  $\mu$ L de chaque dilution de la gamme ont été inoculés dans 8 puits de microplaque présentant un tapis de cellules A549, incubés à 37°C sous atmosphère enrichie en CO<sub>2</sub>. La multiplication virale a été suivie toutes les 12 heures jusqu'à 4 jours d'incubation sur l'ensemble des 8 puits par le biais de l'augmentation de la quantité de génome mesurée par PCR en temps réel.

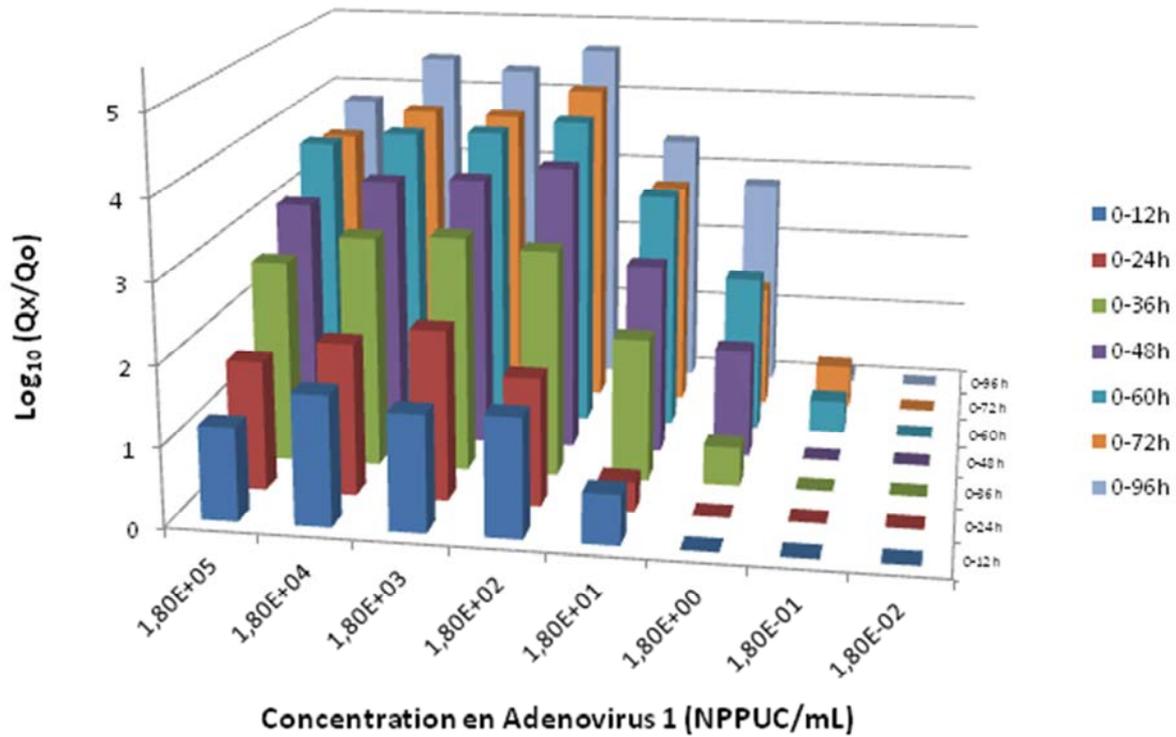


Figure 35: Evolution de la quantité de génome au cours du temps mesurée par ICC-PCR sur cellules A549 pour différentes quantités d'adénovirus 1 infectieux

Tableau 58: Quantité de génome d'adénovirus 1 mesurée au cours du temps par PCR en temps réel lors de l'infection des cellules A549 (ICC-PCR) (n=2)

Concentration en adénovirus 1 (NPPUC/mL)	Augmentation de la quantité de génome au cours du temps en log <sub>10</sub>						
	0-12h	0-24h	0-36h	0-48h	0-60h	0-72h	0-96h
1,8 x 10 <sup>5</sup>	1,18	1,64	2,6	3,08	3,65	3,53	3,81
1,8 x 10 <sup>4</sup>	1,64	1,93	2,97	3,43	3,83	3,92	4,45
1,8 x 10 <sup>3</sup>	1,47	2,15	3,02	3,49	3,88	3,89	4,31
1,8 x 10 <sup>2</sup>	1,44	1,62	2,9	3,69	4,06	4,27	4,63
1,8 x 10 <sup>1</sup>	0,63	0,38	1,82	2,46	3,11	2,97	3,38
1,8 x 10 <sup>0</sup>	0	0	0,49	1,4	2,04	1,59	2,8
1,8 x 10 <sup>-1</sup>	0	0	0	0	0,42	0,56	0,11
1,8 x 10 <sup>-2</sup>	0	0	0	0	0	0	0

Les résultats de la Figure 35 et du Tableau 58 montrent qu'il est possible de mettre en évidence une multiplication d'adénovirus infectieux pour une gamme de concentrations comprises entre 1,8 x 10<sup>5</sup> et 1,8 x 10<sup>1</sup> NPPUC/mL dès 12 heures d'incubation, et jusqu'à une concentration de 1,8 x 10<sup>0</sup> NPPUC/mL après seulement 36 heures d'incubation au sein des cellules A549. Une augmentation de la quantité de génome de 0,49 log<sub>10</sub> (ET=0,09 log<sub>10</sub>) et de 2,8 log<sub>10</sub> (ET=0,29 log<sub>10</sub>) a été observée respectivement après 36 heures et 96 heures d'incubation.

Pour une concentration de  $1,8 \times 10^{-1}$  NPPUC/mL, une légère augmentation de la quantité de génome de  $0,42 \log_{10}$  (ET=0,6  $\log_{10}$ ),  $0,56 \log_{10}$  (ET=0,79  $\log_{10}$ ) et  $0,11 \log_{10}$  (ET=0,15  $\log_{10}$ ) a été observée respectivement après 60 h, 72 h, et 92 h d'incubation. Pour la concentration  $1,8 \times 10^{-2}$  NPPUC/mL, aucune multiplication de génome n'a pu être mesurée au cours de ces expérimentations.

### 2.2.2.3. Essai comparatif entre la méthode de culture cellulaire, la PCR en temps réel mise en place au laboratoire et la méthode couplée d'ICC-PCR

De manière à valider le système, nous avons comparé la sensibilité de la méthode d'ICC-PCR par rapport à celle de la PCR temps réel décrite précédemment et celle de culture cellulaire, sur des solutions identiques d'adénovirus 1 diluées dans du PBS pH 7,4. Les résultats obtenus pour chaque méthode testée sont présentés dans le Tableau 59.

Avec la méthode de culture cellulaire, il est possible de détecter après 4 jours d'incubation la concentration virale de  $1,8 \times 10^4$  NPPUC/mL et la concentration virale de  $1,8 \times 10^1$  NPPUC/mL après 8 jours d'incubation. Comparativement à la méthode de culture cellulaire, sur la même période d'incubation, une différence de 2 à plus de 4  $\log_{10}$  en faveur de l'ICC-PCR peut être observée. L'amplification des virus au sein des cellules permet d'être plus sensible que la PCR en temps réel de 1 à 2  $\log_{10}$  environ. Dans ce contexte, nous avons décidé de retenir cette méthodologie pour déterminer l'infectiosité des virus qui seront détectés dans les eaux analysées. La mesure sera opérée après 96 heures d'incubation.

**Tableau 59: Sensibilité de détection des méthodes de culture cellulaire et d'ICC-PCR après 96h d'inoculation sur cellules A549 en comparaison avec la méthode de détection par PCR en temps réel**

Titre en adénovirus 1 (NPPUC/mL)	qPCR	Culture cellulaire		ICC-PCR	
	0h	96h	8jours	96h	8jours
$1,8 \times 10^5$	+	+	+	+	+
$1,8 \times 10^4$	+	+	+	+	+
$1,8 \times 10^3$	+	-	+	+	+
$1,8 \times 10^2$	+	-	+	+	+
$1,8 \times 10^1$	+ (*)	-	+	+	+
$1,8 \times 10^0$	-	-	-	+	+
$1,8 \times 10^{-1}$	-	-	-	+	-
$1,8 \times 10^{-2}$	-	-	-	-	-

(\*) : Détection par PCR en temps réel uniquement dans le PBS pH 7,4

## **2.3. Concentration des adénovirus dans l'eau**

### **2.3.1. Contexte**

Pour détecter les adénovirus dans les échantillons hydriques, il est nécessaire de procéder à une étape de concentration afin de récupérer les virus sous un faible volume. Dans le domaine de la virologie environnementale, un très grand nombre de procédés plus ou moins complexes, basés sur des principes très différents ont été proposés au travers de la littérature scientifique (filtration, ultrafiltration, précipitation, adsorption-élution, centrifugation....)

A ce jour, la seule méthode normalisée et validée pour concentrer les virus entériques dans l'eau est celle décrite dans la norme XP T90-451 (AFNOR, 1996). Il s'agit d'une méthode d'adsorption-élution reposant sur l'emploi d'une laine de verre ensimée. Cette méthode peu coûteuse présente l'avantage d'être facile à mettre en œuvre. Elle offre surtout la possibilité de pouvoir filtrer sans colmater des eaux de diverse nature, plus ou moins turbides. Les volumes analysés sont très variables, entre 10 à 20 litres pour les eaux de surface, et entre 50 et 1000 L pour les eaux d'alimentation. Son principe est basé sur l'adsorption des virus sur de la laine de verre suivie d'une élution fractionnée, dont l'objectif est de désorber les virus de la laine de verre grâce à l'emploi d'un tampon riche en protéines issues d'extrait de bœuf à un pH de 9,5. Afin de récupérer les virus dans un concentrat d'environ 10 mL, une seconde étape de concentration, basée sur une précipitation des particules virales à l'acide chlorhydrique, est également réalisée sur les particules présentes dans l'éluat primaire.

Dans le cadre de notre travail de thèse, il était indispensable de déterminer les rendements de concentration de cette méthode afin de pouvoir déterminer la quantité de particules virales présentes dans les échantillons contaminés. Ce travail d'évaluation a été opéré sur différentes matrices hydriques représentatives des eaux de surface (eaux fortement turbides) ou d'eaux de nappe et d'alimentation (eaux faiblement turbides).

### **2.3.2. Evaluation de la méthode de concentration des adénovirus dans les eaux faiblement chargées**

#### **2.3.2.1. Détermination du volume d'analyse optimal**

Selon les eaux à analyser et le volume à traiter, la quantité de laine de verre à employer diffère. Dans un premier temps, nous avons donc déterminé le rendement de la méthode selon le volume analysé et la quantité de laine de verre employée. Les expérimentations ont été réalisées sur différents volumes d'échantillons d'eau de réseau artificiellement contaminés avec  $6,4 \times 10^5$  NPPUC d'adénovirus 1 purifiés. Pour chaque condition expérimentale, le rendement de concentration, le rendement global (méthode de concentration + méthode de détection moléculaire) et l'interférence de la matrice sur la méthode ont été déterminés en triplicat. Les résultats obtenus sont présentés dans le Tableau 60.

**Tableau 60: Rendements de concentration, rendement global et interférence mesurés à partir d'échantillons d'eau de réseau artificiellement contaminés avec de l'adénovirus 1, en fonction du diamètre de la cartouche et du volume d'échantillon filtré**

Diamètre de la cartouche de	Quantité de laine de verre	Volume analysé	Rendements % (ET)		
			Concentration	Global	Interférence
20 mm	5g	1 L	12,8 (1,7)	8,7 (1,4)	32,1 (5,8)
20 mm	5g	20 L	10,5 (2,9)	6,1 (0,8)	38,1 (18,5)
42 mm	50g	20 L	25,5 (8,6)	15,8 (3,8)	36,8 (5,5)
42 mm	50g	50 L	29,5 (11,7)	8,4 (1,6)	70,4 (6,6)
42 mm	50g	100 L	10,5 (1,5)	3,5 (2,5)	68,3 (19)

Pour un même diamètre de cartouche de filtration, les rendements globaux de la méthode obtenus pour des échantillons de 20, 50 et 100 litres d'eau de réseau sont respectivement de 15,8% (ET=3,8%), 8,4% (ET=1,6%) et 3,5% (ET=2,5%). Pour une même cartouche de filtration et une même quantité de virus inoculée, il est observé qu'avec l'augmentation du volume analytique, le rendement diminue. Nous avons montré que cette diminution de rendement était liée à la présence de molécules co-concentrées avec les virus, initialement présentes dans l'échantillon, qui vont interférer avec la méthode de détection. Ainsi, contrairement au rendement global de la méthode, le rendement d'inhibition (interférence) augmente avec le volume analytique puisqu'il est de 36,8% (ET=5,5%) et 68,3% (ET=19%) respectivement pour des volumes d'analyse de 20 L et 100 L d'eau. Cependant, les résultats montrent que pour les volumes de 50 et 100 L, une interférence identique est obtenue. Dans ce cadre, la diminution du rendement global de la méthode serait due à une diminution du rendement de concentration attribuée à l'augmentation du volume analytique. Pour la suite de nos travaux, nous avons donc décidé de limiter volontairement le volume analytique à 50 L. Pour ce volume un rendement de concentration de 29,5% (ET=11,7%) a été mesuré.

#### 2.3.2.2. Evaluation de la méthode de concentration dans ces milieux hydriques

La linéarité et la limite de détection de la méthode a été vérifiée sur des échantillons de 50 L d'eau de réseau artificiellement contaminés avec une gamme de dilutions de raison 10 réalisée à partir d'une suspension d'adénovirus 1. Pour chaque dilution testée ( $7,4 \times 10^2$  à  $7,4 \times 10^6$ ), les expérimentations ont été effectuées en duplicat. Les résultats sont présentés sur la Figure 36. Une droite standard de pente -3,033 et de coefficient de corrélation ( $R^2$ ) 0,980 est mesurée. La limite de détection de la méthode est estimée à  $7,4 \times 10^2$  NPPUC dans 50 L d'eau de réseau.

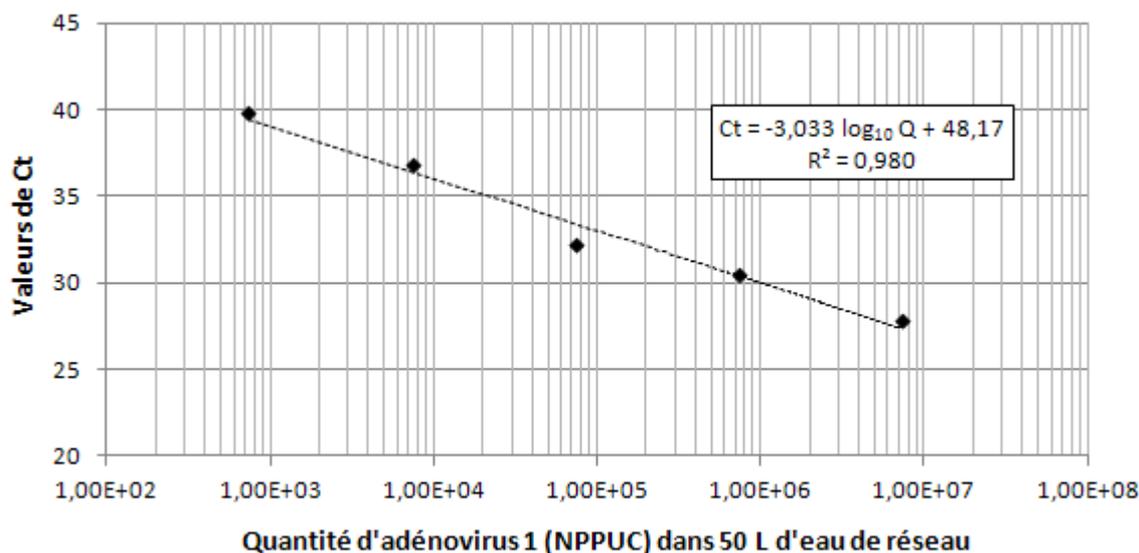


Figure 36: Droite standard obtenue par PCR en temps réel pour différentes quantités d'adénovirus 1 inocuées dans des échantillons de 50L d'eau de réseau

### 2.3.3. Evaluation de la méthode de concentration des adénovirus dans les eaux turbides

Dans les eaux de surface, où la quantité de matières organiques est plus importante, nous avons décidé d'employer la méthode d'adsorption-élution sur laine de verre de la norme XP T90-451 (AFNOR, 1996) selon le protocole modifié par Ogorzaly *et al.* (2008), décrit dans la partie 2.2 du chapitre Matériels et Méthodes.

La méthode a été évaluée en triplicat sur des échantillons de 10 L d'eau de Moselle artificiellement contaminés avec  $3,2 \times 10^7$  NPPUC/mL d'adénovirus 1 purifiés. Au préalable, nous avons vérifié que l'eau de Moselle utilisée dans cette partie du travail n'était pas naturellement contaminée en adénovirus humains. Nous avons obtenu un rendement de concentration de 30,7% (ET=3,9%) et un rendement global de la méthode de 8,4% (ET=2,1%). Ces derniers résultats s'expliquent par une inhibition importante (72,9% (ET=3,3%)) de la méthode de détection moléculaire employée, due à la présence d'une part non négligeable de matières organiques.

La linéarité et la limite de détection de la méthode ont été déterminées sur une gamme de dilutions de raison 10 d'adénovirus 1. La courbe standard obtenue présente une pente de -4,36 et un coefficient de corrélation ( $R^2$ ) de 0,999. La limite de détection, à défaut de concentrations intermédiaires entre  $6,4 \times 10^2$  et  $6,4 \times 10^3$  NPPUC, a été déterminée à  $6,4 \times 10^3$  NPPUC.

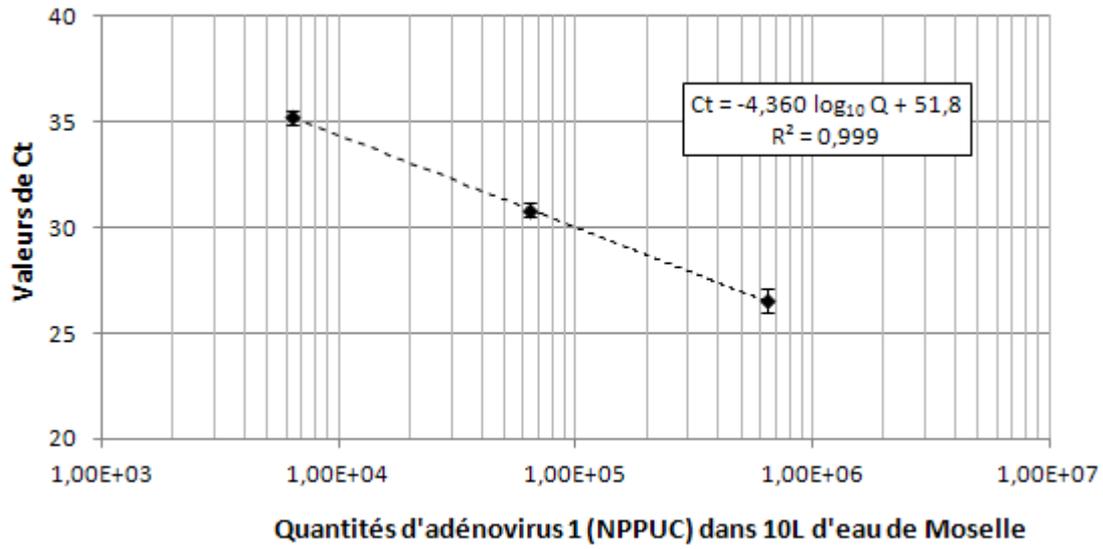


Figure 37: Droite standard obtenue par PCR en temps réel pour différentes quantités d'adénovirus 1 inoculées dans des échantillons de 10 L d'eau de Moselle

### 3. **CRYPTOSPORIDIUM**

Dans le cadre de cette thèse, il était nécessaire d'avoir à disposition différentes méthodologies permettant:

- ❖ de déterminer spécifiquement la présence d'oocystes de *Cryptosporidium* responsables chez l'Homme d'épidémies de gastro-entérites (*Cryptosporidium parvum*, *Cryptosporidium hominis* et *Cryptosporidium meleagridis*)
- ❖ de révéler le caractère viable des oocystes détectés dans les eaux
- ❖ de détecter les oocystes dans des eaux d'origine et de caractéristiques physico-chimiques diverses (eaux brutes, eaux d'alimentation) ce qui par conséquent implique l'analyse de différents volumes (10 L à 100 L).

Les différentes méthodologies développées et/ou évaluées au cours de ce travail, sont présentées ci-dessous.

#### 3.1. **Détection des espèces de *Cryptosporidium* pathogènes pour l'Homme par biologie moléculaire**

##### 3.1.1. **Contexte**

A ce jour, la technique de référence utilisée pour détecter les oocystes de *Cryptosporidium* dans l'eau est la technique normalisée NF T90-455 (AFNOR, 2001). Elle consiste à dénombrer par microscopie à épifluorescence, les oocystes de *Cryptosporidium* après marquage par un anticorps spécifique. Cette technique quantitative est cependant non spécifique car tous les oocystes de *Cryptosporidium* d'origine humaine et animale peuvent être dénombrés sans distinction. Toutefois, la spéciation des espèces pathogènes pour l'Homme détectées dans l'échantillon hydrique analysé était indispensable dans le cadre de ce travail afin d'affiner l'analyse quantitative de risque.

Dans ce contexte, nous avons orienté nos travaux sur la détection et la quantification des oocystes des espèces de *Cryptosporidium* pathogènes ou potentiellement pathogènes pour l'Homme (*Cryptosporidium parvum*, *Cryptosporidium hominis* et *Cryptosporidium meleagridis*) par PCR en temps réel. Un protocole de PCR en temps réel, permettant l'amplification d'une séquence ciblée du gène COWP codant pour des protéines de paroi des oocystes de *Cryptosporidium*, a été développé en collaboration avec le Laboratoire de Chimie Physique et Microbiologie pour l'Environnement de Nancy. Après avoir sélectionné des amorces et une sonde fluorogénique de type TaqMan, permettant l'amplification et la révélation du produit de PCR généré, une mise au point des conditions réactionnelles a été opérée et le protocole de détection a été validé à partir d'un étalon moléculaire spécialement construit à cet effet.

### 3.1.2. Développement et évaluation de la méthode de détection de *Cryptosporidium* par PCR en temps réel

#### 3.1.2.1. Choix de la cible

La disponibilité d'une séquence d'intérêt commune aux trois espèces de *Cryptosporidium* pathogènes ciblées (*C. hominis*, *C. parvum* et *C. meleagridis*) constituait une contrainte de premier ordre. Notre choix s'est porté sur le gène de la protéine de paroi (gène COWP) qui est présent en une seule copie sur le génome. La séquence de la protéine de paroi est largement séquencée (souvent dans son intégralité) et référencée dans la base de données GeneBank pour de nombreuses espèces de *Cryptosporidium*.

Afin de déterminer la zone d'intérêt permettant la détection spécifique des trois espèces, un premier travail d'alignement des séquences de *C. parvum*, *C. hominis*, et *C. meleagridis* disponibles pour le gène COWP a été réalisé grâce au logiciel ClustalX. A partir de ces séquences alignées, en utilisant le logiciel Primer Express et en tenant compte des critères de sélection édités dans le Tableau 61, nous avons sélectionné un couple d'amorces et une sonde TaqMan permettant l'amplification d'une séquence de 140 pb du gène COWP (Tableau 62).

**Tableau 61: Critères de sélection des amorces et de la sonde TaqMan pour la PCR en temps réel (logiciel Primer Express)**

<b>Amorces</b>	<b>Sonde TaqMan</b>
Tm compris entre 58 et 60°C	Tm compris entre 68 et 70°C
Pourcentage de GC compris entre 20 et 80%	Pourcentage de GC compris entre 20 et 80%
Longueur: 9 à 40 bases	Longueur: 9 à 40 bases
Différence entre le Tm des deux amorces inférieur à 2°C	Pas de base G en 5'
	Pas plus de 4 G contigus
	Pas plus de G que de C

---

**Tableau 62: Séquences nucléotidiques des amorces et de la sonde utilisées pour la détection et la quantification de *C. parvum*, *C. hominis* et *C. meleagridis* par PCR en temps réel**

	Dénomination (fonction)	Séquence (5'→3')	Longueur (bases)	Localisation
<b>Amorces</b>	CpF (sens)	ACACAGCTCCTCCTAATCCAGAA	23	455-477
	CpR (antisens)	TTGCAGGGAGATATTGAACACATC	24	572-595
<b>Sonde Taqman</b>	CpP (sens)	FAM-CAACAAATTGATACCGTTTGTCTTCTGGTTTTG- TAMRA	34	523-556

La spécificité des amorces et de la sonde TaqMan a été évaluée en requêtant sur la banque de données GenBank par le test BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) disponible sur le site NCBI (National Center for biotechnology Information). Ce test permet de comparer les séquences des amorces et de la sonde avec toutes les séquences répertoriées dans la base de données et de vérifier l'absence d'amplification non spécifique. La vérification de la spécificité via l'intermédiaire de requêtes d'alignement est d'autant plus importante que ces amorces et cette sonde seront utilisées pour l'analyse d'échantillons environnementaux pouvant contenir de nombreux micro-organismes aux génomes divers et variés. A l'origine de la mise en place de ces travaux, le test BLAST effectué sur le couple d'amorces utilisé pour la PCR quantitative a montré la spécificité de la détection du gène COWP des espèces *C. parvum*, *C. hominis* et *C. meleagridis* uniquement.

### 3.1.2.2. Evaluation de la méthode de PCR en temps réel

La concentration en amorces et la concentration en sonde sont deux paramètres importants qui peuvent avoir un impact non négligeable sur la sensibilité de la PCR. Des expérimentations spécifiques ont donc été réalisées afin de déterminer leurs concentrations optimales lors de la réaction de PCR. Il s'est avéré qu'une concentration en amorces sens et anti-sens de 0,9 µM permettait d'obtenir des valeurs de Ct et d'intensité de fluorescence optimales. Concernant la sonde fluorogénique, la concentration de 0,35 µM s'est révélée être la concentration permettant le meilleur compromis entre la sensibilité et l'intensité de fluorescence. Les concentrations initiales et finales ainsi que le volume des réactifs entrant dans la composition du milieu réactionnel de PCR quantitative sont résumés dans le Tableau 63.

**Tableau 63: Composition du milieu réactionnel de PCR en temps réel pour la détection et la quantification de *C. parvum*, *C. hominis* et *C. meleagridis***

Réactifs	Concentration initiale	Volume/échantillon	Concentration finale
TaqMan Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems, réf 4304437)	2X	12,5 µL	1X
H2O RNase-DNase free (Sigma, réf W4502)	/	5,25 µL	/
Amorce CpF	10 µM	2,25 µL	0,9 µM
Amorce CpR	10 µM	2,25 µL	0,9 µM
Sonde CpP	10 µM	0,25 µL	0,1 µM
ADN extrait	/	2,5 µL	/

L'amplification de l'ADN est réalisée en plusieurs étapes: une étape initiale de 2 minutes à 50°C suivie d'une activation enzymatique de 10 minutes à 95°C, et une succession de 45 cycles chacun composé de 15 secondes à 95°C et d'1 minute à 60°C.

A partir des conditions réactionnelles sélectionnées ci-dessus, une évaluation du protocole de PCR a été opérée à partir d'étalon moléculaire. Cet étalon a été produit en incorporant le gène ciblé COWP de *Cryptosporidium parvum* à l'intérieur d'un vecteur de type pDrive Cloning Vector (Qiagen). Un stock d'ADN de  $1,6 \times 10^{11}$  copies de génome/ $\mu\text{L}$  a ainsi été généré. L'évaluation a été opérée au laboratoire sur une gamme standard produite par dilutions logarithmiques du stock d'ADN en déterminant d'une part l'efficacité, la linéarité, ainsi que la sensibilité, et d'autre part, la reproductibilité et la répétabilité de la méthode.

### 3.1.2.2.1. Linéarité, efficacité et limite de détection

Ces paramètres ont été estimés en conditions de répétabilité et de reproductibilité sur une gamme de dilutions de raison 10 réalisée à partir du stock d'ADN plasmique de *C. parvum*, dont les quantités de génome varient de  $1,6 \times 10^0$  à  $1,6 \times 10^6$  copies de génome/ $\mu\text{L}$ . Les résultats sont présentés sur la Figure 38 et la Figure 39.

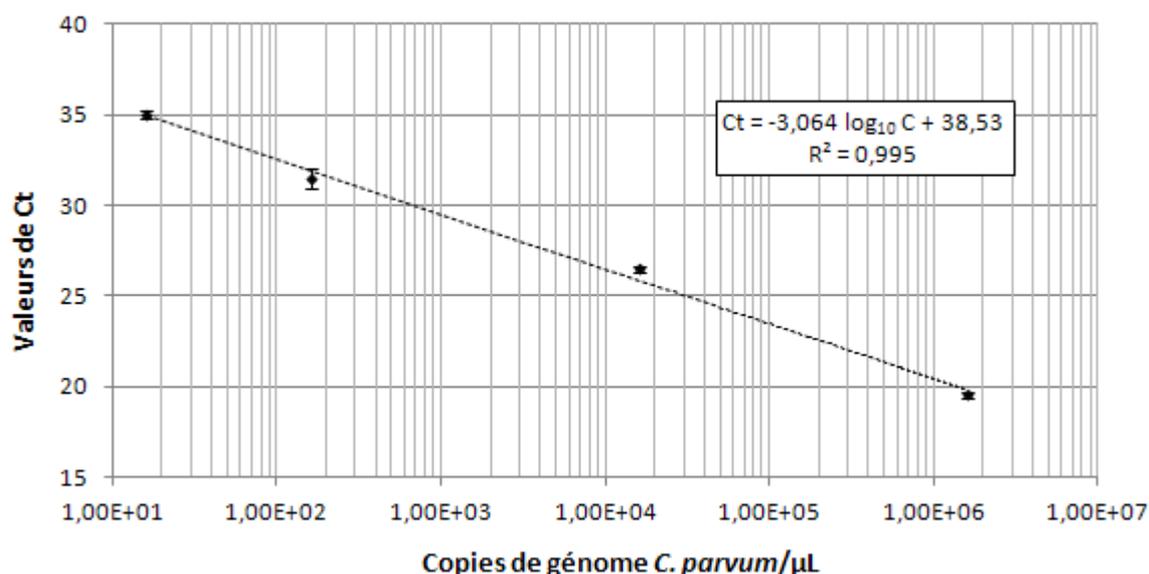


Figure 38: Gamme standard permettant la quantification absolue du génome de *Cryptosporidium parvum*, obtenue à partir des dilutions logarithmiques du stock d'ADN plasmidique porteur du gène d'intérêt (n=3) en condition de répétabilité

Lorsque les différents points de la gamme de dilutions logarithmiques réalisée à partir du stock plasmidique sont amplifiés simultanément trois fois, nous obtenons une droite standard dont la linéarité est respectée sur 6 unités logarithmiques avec une pente de -3,064 et un coefficient de corrélation ( $R^2$ ) de 0,995. L'efficacité de la PCR, calculée à partir de la valeur de la pente de la droite, est de 112% et la limite de détection est estimée à 16 copies de génome/ $\mu\text{L}$ .

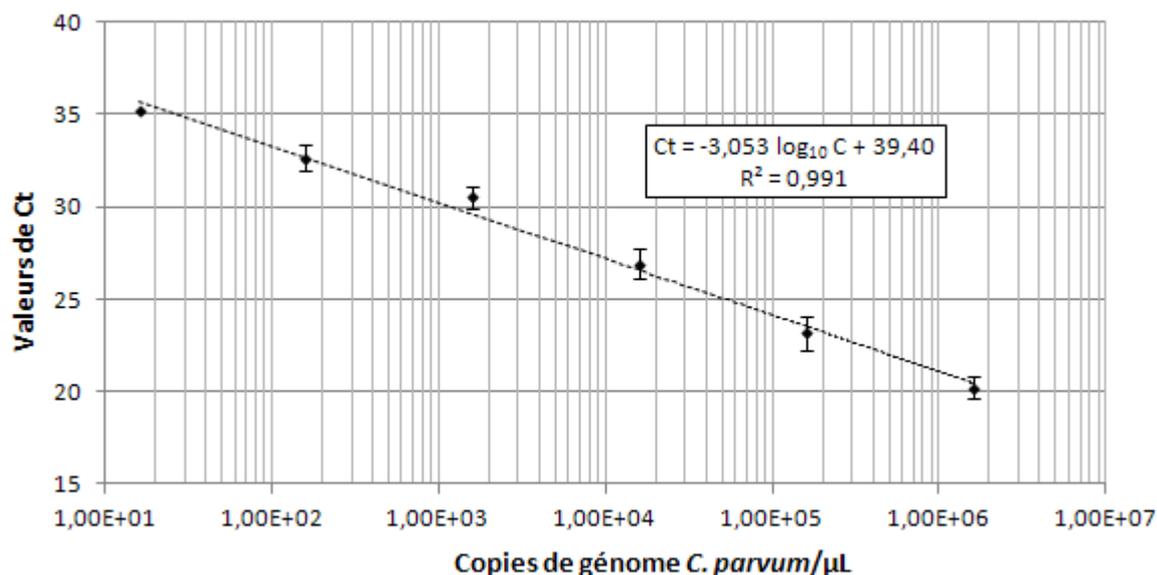


Figure 39: Gamme standard permettant la quantification absolue du génome de *Cryptosporidium parvum*, obtenue à partir des dilutions logarithmiques du stock d'ADN plasmidique porteur du gène d'intérêt (n=4) en condition de reproductibilité

En conditions de reproductibilité, les points de la gamme réalisée à partir du stock d'ADN plasmidique, amplifiés quatre fois séparément, ont permis d'obtenir une droite standard linéaire sur 5 dilutions logarithmiques pour 100% des échantillons et sur 6 dilutions logarithmiques pour 25% des échantillons (concentration minimale de  $1,6 \times 10^1$  copies de génome/ μL). La pente de la droite est de -3,053 avec un coefficient de corrélation ( $R^2$ ) de 0,991. L'efficacité de la méthode est de 112,6% et la limite de détection oscille entre 16 et 160 copies de génome/μL.

#### 3.1.2.2.2. Variabilité intra et inter-essais

Afin de valider le protocole de quantification, les variations intra et inter-essais de la PCR quantitative ont été estimées à partir des valeurs de Ct obtenues respectivement en conditions de répétabilité et de reproductibilité. Les résultats obtenus sont présentés dans le Tableau 64.

Tableau 64: Coefficients de variation obtenus en conditions de répétabilité (CV % intra-essais) et de reproductibilité (CV% inter-essais)

Concentrations (copies de génome/μL)	$1,6 \times 10^6$	$1,6 \times 10^5$	$1,6 \times 10^4$	$1,6 \times 10^3$	$1,6 \times 10^2$	$1,6 \times 10^1$	$1,6 \times 10^0$
CV % intra-essais (n=3)	0,74	NA	0,72	NA	1,79	0,91	NC
CV % inter-essais (n=4)	2,88	3,88	3,09	1,85	2,04	NC*	NC

NA: Non Analysé; NC: non calculable car 0 positif; NC\*: non calculable car 1 positif/4

Des valeurs de coefficients de variation comprises entre 0,74% et 1,79 % et entre 1,85% et 3,88% ont été respectivement observées en conditions de répétabilité et de reproductibilité.

### 3.1.3. Évaluation de la méthode d'extraction génomique

Après avoir évalué la méthode de détection par PCR en temps réel, il était nécessaire de faire également une évaluation de la méthode d'extraction génomique, étape qui, pour rappel, précède celle de la PCR en temps réel. L'objectif de ce travail était de proposer une méthode d'extraction génomique capable d'extraire l'ADN des parasites présents dans des volumes d'échantillons pouvant varier de 100 µL à 1000 µL selon la nature de l'eau à analyser.

#### 3.1.3.1. Extraction génomique sur des concentrats d'eau peu turbide (eau de nappe ou eau du robinet)

L'analyse des eaux de nappe ou d'alimentation va conduire à obtenir des concentrats peu chargés en matières en suspension. Dans ce cadre, les traitements qui suivront l'étape de concentration, tels que l'étape de purification (type IMS), conduira à obtenir un échantillon de faible volume (55 µL). Une fraction de l'échantillon (la moitié du volume) sera employée pour effectuer la détection du génome des oocystes par PCR en temps réel. Préalablement, l'extraction du génome sera opérée sur la fraction diluée (1/2) dans un tampon PBS pH 7,4 de manière à obtenir un volume final de 100 µL.

Une étude préliminaire initiée au laboratoire en 2006, sur différents systèmes d'extraction génomique commercialisés, avait permis de montrer que le système QIAmp viral RNA mini kit (Qiagen, réf 53906) était relativement prometteur en termes d'efficacité. Des adaptations sur le protocole de lyse devaient encore être opérées. En effet les parasites *Cryptosporidium* sont des micro-organismes constitués d'une double paroi ce qui rend plus difficile la libération de l'ADN lors de l'étape d'extraction génomique. Dans ce contexte, l'optimisation de l'étape de lyse de la paroi des oocystes constituait une étape clef pour pouvoir obtenir des rendements d'extraction optimaux.

Dans le cadre de ce travail, nous avons évalué la combinaison de deux procédés qui sont (i) la lyse thermique par la succession de trois cycles de chaleur (100°C) et congélation (-80°C) classiquement réalisée pour extraire le génome de ces pathogènes, et (ii) la lyse chimique à l'aide d'un agent de dénaturation des protéines de type thiocyanate de guanidium. Des tests expérimentaux ont été opérés sur des volumes de 100 µL d'une gamme de dilutions logarithmiques d'une suspension de *C. parvum* (concentration initiale de  $2,4 \times 10^5$  oocystes/mL), en présence ou non de thiocyanate de guanidium (vol/vol 50%), et dans des conditions thermiques de 3 cycles de chaleur/congélation (100°C, 5 minutes/-80°C, 5 minutes). Les expérimentations ont été réalisées en triplicat et les résultats sont présentés dans le Tableau 65.

**Tableau 65: Coefficients de variation (CV%) obtenus après extraction génomique d'une suspension de 100 µL d'oocystes de *C. parvum* à différentes concentrations, en présence ou non de thiocyanate de guanidium**

Concentration (oocystes/mL)		$2,4 \times 10^5$	$2,4 \times 10^4$	$2,4 \times 10^3$	$2,4 \times 10^2$	$2,4 \times 10^1$	$2,4 \times 10^0$
<b>Sans thiocyanate de guanidium</b>	Valeurs de Ct	26,97	29,88	34,14	37,9	NEG	NEG
	CV (%)	4,70	4,18	1,61	2,33	NC*	NC*
<b>Avec thiocyanate de guanidium</b>	Valeurs de Ct	24,76	28,68	33,48	36,41	39,17	NEG
	CV (%)	1,85	1,93	1,60	1,05	NC**	NC*

NC\*: non calculable car 0 positif/3; NC\*\*: non calculable car 2 positifs/3

Quelle que soit la concentration en oocystes de *C. parvum*, en présence de thiocyanate de guanidium les valeurs de Ct et des coefficients de variation (CV%) sont toujours plus faibles que celles obtenues en l'absence de thiocyanate de guanidium, ce qui permet d'indiquer une meilleure efficacité de lyse lorsque du thiocyanate de guanidium est employé.

Le protocole d'extraction génomique de l'ADN de *C. parvum* par succession de trois cycles à 100°C, 5 min/-80°C, 5 min, en présence de thiocyanate de guanidium suivie d'une purification/concentration de l'ADN sur colonne à membrane de silice (QIAmp viral RNA mini kit (Qiagen, réf 53906)), a été évalué dans un second temps, ceci dans le but de vérifier que l'étape d'extraction/purification de l'ADN n'engendrait pas de variation supplémentaire à celle de la détection par PCR en temps réel. Les résultats concernant la linéarité, l'efficacité et la sensibilité de la méthode sont présentés sur la Figure 40.

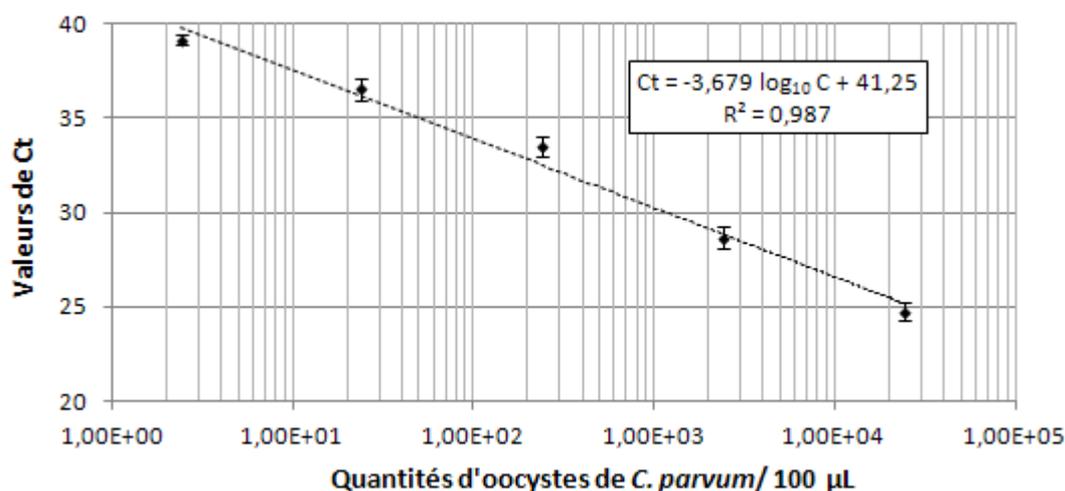


Figure 40: Droite standard obtenue par PCR en temps réel après extraction génomique de 100 µL d'une suspension d'oocystes de *C. parvum* à différentes concentrations en présence de thiocyanate de guanidium

Il est constaté qu'une relation linéaire est respectée sur 5 unités logarithmiques. La droite standard obtenue présente une pente de -3,679 et un coefficient de corrélation ( $R^2$ ) de 0,987. La limite de détection de la méthode est comprise entre 2,4 et 24 oocystes (respectivement pour 66,6% et 100% des échantillons) et l'efficacité est estimée à 86,9%.

### 3.1.3.2. Extraction génomique sur des concentrats d'eau fortement turbide

La concentration des oocystes de *Cryptosporidium* présents dans des milieux hydriques turbides, tels que les eaux de surface, peut conduire à l'obtention d'éluats très fortement chargés en matières en suspension. Dans ce cadre, pour que le rendement de l'étape de purification (IMS) soit efficace, il est recommandé de diluer l'éluat et de traiter l'ensemble du volume obtenu en multipliant le nombre de tubes lors de l'étape d'IMS. Cette opération aura pour conséquence d'augmenter le volume final à analyser. De manière à pouvoir effectuer la recherche de génome de *Cryptosporidium* pathogènes pour l'Homme dans des volumes d'échantillons plus importants (volume fixé à 1mL), nous avons du mettre en place un second protocole d'extraction adapté à ce type de volume.

Pour de tels volumes, nous avons montré, lors d'une étude préliminaire, qu'il était nécessaire d'employer une résine de type Chelex qui va chélater les particules présentes dans le milieu pouvant interférer avec la méthode d'extraction. Dans la littérature, cette résine est largement utilisée en association avec la combinaison de cycles de congélation-décongélation. Un procédé visant à opérer une succession de 3 cycles de congélation/décongélation en présence de résine Chelex-100 à une concentration de 2,5% (v/w) a été testé. Après centrifugation à 4000 rpm pendant 10 minutes, le surnageant contenant l'ADN est récupéré puis mélangé avec un tampon de thiocyanate de guanidium à hauteur de 50% (vol/vol). Les acides nucléiques sont ensuite purifiés et concentrés sur des colonnes à membrane de silice à l'aide du kit commercial Qiamp Viral RNA mini kit (Qiagen, réf 53906), selon les instructions du fabricant.

3.1.3.2.1. Linéarité, efficacité et limite de détection de la méthode

Le protocole d'extraction génomique décrit ci-dessus a été évalué en triplicat sur une gamme de dilutions de raison 10 réalisée à partir d'une suspension purifiée de *C. parvum* à une concentration initiale de  $2,6 \times 10^6$  oocystes/mL. Pour chaque dilution testée, l'ADN a été extrait puis amplifié par PCR en temps réel. La linéarité, la sensibilité et la limite de détection ont été évaluées et les résultats sont présentés sur la Figure 41.

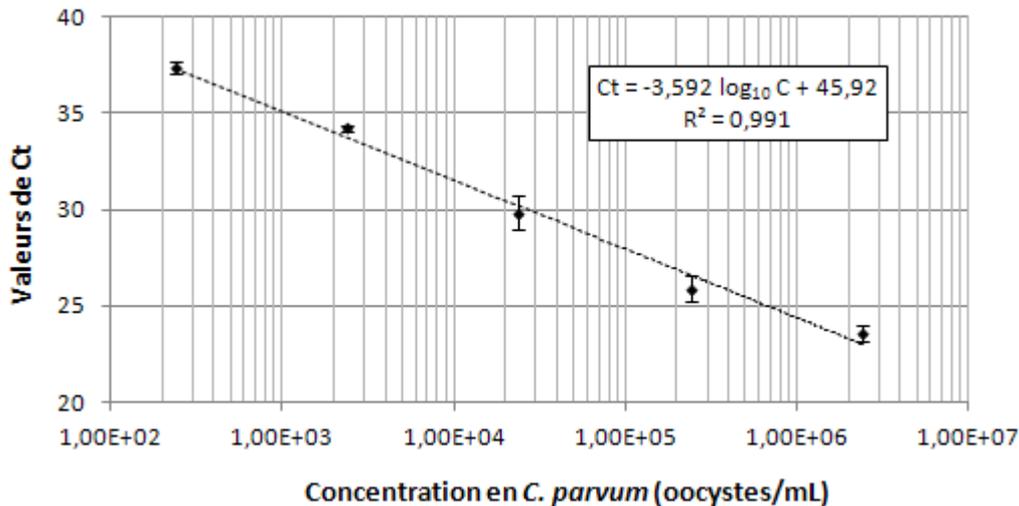


Figure 41: Droite standard obtenue par PCR en temps réel pour différentes concentrations d'oocystes de *C. parvum*

Il est observé une réponse linéaire sur 5 unités logarithmiques pour 100% des échantillons avec une limite de détection estimée à 240 oocystes/mL. La pente et le coefficient de corrélation ( $R^2$ ) de la droite standard sont respectivement de -3,592 et de 0,991. L'efficacité du système « extraction génomique + détection », calculée à partir de la valeur de la pente, est estimée à 89,8%.

3.1.3.2.2. Variabilité intra-essais

La variabilité intra-essais des mesures a également été vérifiée et les résultats sont présentés dans le Tableau 66.

Tableau 66: Coefficients de variation observés lors de l'estimation de la variabilité intra-essais (CV% intra-essais) du système d'extraction génomique pour différentes concentrations d'oocystes de *C. parvum* (n=3)

Concentration (oocystes/mL)	$2,4 \times 10^6$	$2,4 \times 10^5$	$2,4 \times 10^4$	$2,4 \times 10^3$	$2,4 \times 10^2$	$2,4 \times 10^1$
Moyenne des Ct	23,61	25,87	29,83	34,24	37,38	NC
CV (%)	1,70	2,67	2,93	0,44	0,84	NC

NC: Non Calculé car 0 positif/3

Pour chaque dilution nous avons calculé le coefficient de variation (CV%) à partir des Ct générés pour chaque réplicat. Les résultats obtenus sont homogènes avec des coefficients de variation compris entre 0,44% et 2,93%. Ces valeurs sont similaires à celles obtenues lors de l'évaluation de la PCR en temps réel ce qui nous permet de conclure que l'étape d'extraction n'engendre pas de variation supplémentaire lors de la détection.

### **3.2. Estimation de la viabilité de *Cryptosporidium***

#### **3.2.1. Contexte**

Parmi toutes les méthodes décrites dans la littérature pour détecter les oocystes de *Cryptosporidium*, seuls les outils moléculaires tels que l'hybridation in situ (Smith *et al.*, 2004), la RT-PCR (Jenkins *et al.*, 2000) ou la méthode de PCR combinée à une culture sur cellules (ICC-PCR) (Di Giovanni et LeChevallier, 2005) peuvent être employées pour obtenir simultanément les informations concernant le génotype présent dans l'échantillon et la viabilité des espèces.

Dans le cadre de cette thèse, nous nous sommes en premier lieu intéressé à mettre en place un protocole d'ICC-PCR sur les cellules MDCK. Cette méthode a pour objectif de tracer quantitativement une augmentation du nombre de copies de génome au sein des cellules infectées par les parasites *Cryptosporidium* indiquant par conséquent leur viabilité et leur infectiosité. Les premiers résultats des expérimentations réalisées sur des suspensions d'oocystes viables (90%) ont mis en évidence des résultats très concluants, avec une augmentation de génome de plus de 1 log<sub>10</sub> au sein des cellules après 72 heures d'incubation à 37°C sous atmosphère enrichie en CO<sub>2</sub>. Cependant des résultats relativement surprenants concernant une augmentation de la quantité de génome au sein des cellules, lorsque des extraits d'ADN purifiés de *C. parvum* étaient inoculés en présence des cellules, ne nous ont pas permis de poursuivre dans cette voie d'évaluation. A ce jour nous ne disposons pas d'éléments scientifiques supplémentaires suffisants pour expliquer ces derniers résultats.

Une seconde approche combinant la méthode de PCR en temps réel avec l'utilisation d'un colorant vital tel que le monoazide d'éthidium (EMA) a été évaluée. Brescia *et al.* (2009) ont proposé d'utiliser une molécule similaire, le monoazide de propidium (PMA), en combinaison avec la PCR pour la mise en évidence de la viabilité de *Cryptosporidium*. L'EMA et le PMA sont des molécules qui peuvent (i) pénétrer dans les cellules endommagées (non viables), (ii) se lier de façon covalente aux acides nucléiques sous l'action d'une photoactivation (flash lumineux de 500 watt pendant 15 minutes) et (iii) bloquer l'amplification de l'ADN lors de la PCR. Par conséquent l'absence d'une amplification d'un fragment génomique ciblé issu d'un micro-organisme présent dans un échantillon positif traité à l'EMA signera que le pathogène détecté n'est pas viable, alors que l'amplification et la révélation des amplicons de ce même micro-organisme indiquera qu'il est viable. Les résultats présentés dans cette partie ont fait l'objet d'une communication affichée lors du 16<sup>ième</sup> colloque international sur la microbiologie de l'eau relative à la santé de l'IWA (International Water Association) et un article scientifique est en cours de rédaction.

### 3.2.2. Évaluation de la méthode combinée d'EMA-PCR en temps réel

#### 3.2.2.1. Détermination de la concentration optimale en EMA à employer pour discriminer les formes viables des formes non viables

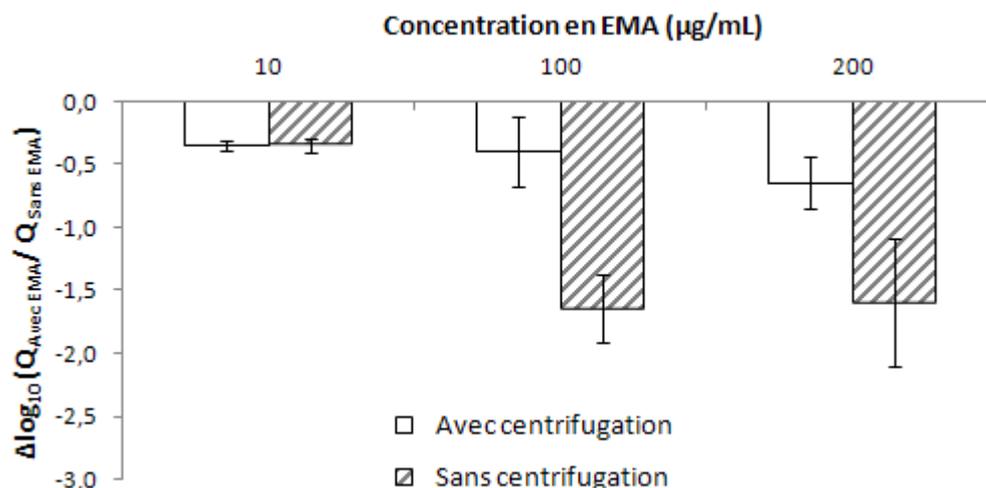
L'utilisation d'une concentration d'EMA trop importante lors de la réalisation des expérimentations peut avoir une influence négative sur la méthode de détection moléculaire (Rueckert et Morgan, 2007). Dans ce contexte, il était nécessaire dans un premier temps de déterminer la concentration maximale d'EMA pouvant être employée sans qu'il se produise d'interférence sur la méthode de détection moléculaire employée pour révéler le génome des oocystes. Des tests expérimentaux ont été réalisés à partir de 100 µL d'une suspension purifiée d'oocystes de *C. parvum* à une concentration de  $6,8 \times 10^5$  oocystes/mL. Pour rappel, ce volume correspond au volume final à analyser suite à la concentration des oocystes présents dans l'eau. Une proportion d'oocystes viables de 97% a été déterminée dans la suspension de travail par microscopie à épifluorescence à l'aide du couplage de colorants fluorogéniques (DAPI/PI). Dans ce travail d'évaluation, différentes concentrations en EMA ont été testées (10, 100 et 200 µg/mL) et les valeurs de Ct obtenues pour chaque concentration, lors de l'amplification de l'ADN par PCR en temps réel, ont été comparées à la valeur de Ct obtenue avec un échantillon non traité à l'EMA. La différence de signal obtenue est alors exprimée selon l'équation 4.

$$(4) \quad \Delta \log_{10} (Q_{\text{avec EMA}}/Q_{\text{sans EMA}}) = (Ct_{\text{sans EMA}} - Ct_{\text{avec EMA}})/S$$

Avec:

- Ct sans EMA et Ct avec EMA: les valeurs de Ct mesurées par PCR en temps réel respectivement dans l'échantillon non traité et dans l'échantillon traité à l'EMA
- S: la pente de la droite standard obtenue par PCR en temps réel.

Parallèlement, nous avons évalué l'impact d'une étape de centrifugation afin d'éliminer l'EMA résiduel avant l'étape d'extraction génomique sur les différentes concentrations testées dans ce travail. Les résultats de ce test sont présentés sur la Figure 42.



**Figure 42: Impact de l'étape de centrifugation sur la détection des oocystes viables par PCR en temps réel en fonction des différentes concentrations en EMA**

Les résultats obtenus sur la suspension d'oocystes viables de *C. parvum* montrent un impact significatif de la concentration en EMA sur la quantification de l'ADN dans les échantillons n'ayant pas subi de centrifugation pour éliminer le résiduel d'EMA. Ainsi, en l'absence de l'étape de centrifugation, et en comparaison avec les échantillons non traités, les plus fortes concentrations en EMA (100 et 200 μg/mL) induisent une réduction du signal de plus d'1,5 log<sub>10</sub> (1,64 log<sub>10</sub> (ET=0,27 log<sub>10</sub>) et 1,60 log<sub>10</sub> (ET=0,51 log<sub>10</sub>) pour des concentrations respectives en EMA de 100 et 200 μg/mL). De telles réductions ne sont pas observées lorsque les échantillons sont centrifugés avant l'étape d'extraction génomique (0,40 log<sub>10</sub> (ET=0,28 log<sub>10</sub>) et 0,65 log<sub>10</sub> (ET=0,21 log<sub>10</sub>) respectivement pour des concentrations en EMA de 100 et 200 μg/mL). Cependant, il faut signaler que même en présence d'une étape de centrifugation, un impact est observé sur le signal obtenu en PCR.

Tenant compte de ces derniers résultats, nous avons décidé d'employer, pour la suite du développement, des concentrations en EMA inférieures ou égales à 100 μg/mL et d'ajouter une étape d'élimination du résiduel d'EMA systématiquement après traitement. L'efficacité de l'EMA à discriminer la présence d'oocystes viables et non viables a été testée sur trois suspensions d'oocystes.

- Une suspension d'oocystes viables (contenant 97% d'oocystes viables), nommée suspension A.
- Une suspension d'oocystes non viables issue de la suspension A, dont les oocystes ont été inactivés par la chaleur (70°C, 60 min). Cette suspension est nommée suspension B et contient 97,2% d'oocystes non viables (mesurés par DAPI/PI).
- Une suspension d'ADN libre issue de la suspension A, ayant subi une succession de 3 cycles de chaleur/congélation (100°C, 5 min/-80°C, 5 min). Cette suspension est nommée suspension C.

Pour chaque suspension, trois concentrations différentes en EMA ont été employées (10, 50 et 100 µg/mL) et les valeurs de Ct obtenues en PCR en temps réel ont été comparées avec celles obtenues pour les mêmes suspensions non traitées à l'EMA. Chaque expérimentation a été réalisée en triplicat et les résultats sont présentés sur la Figure 43.

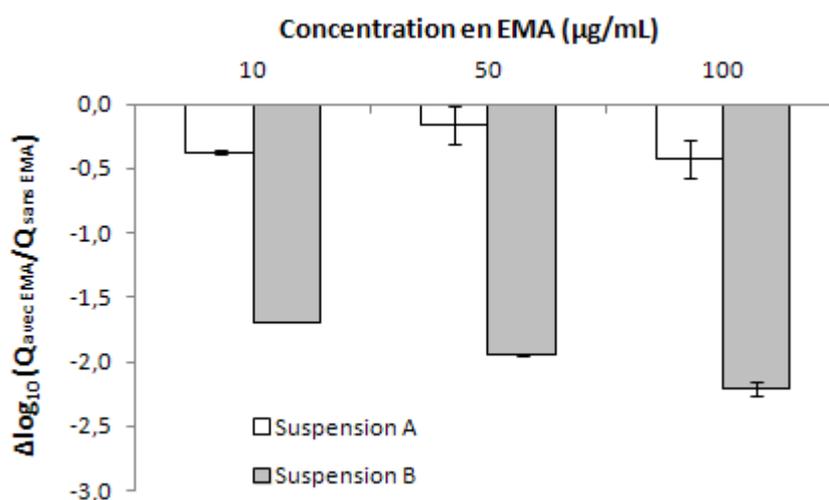


Figure 43: Impact de la concentration en EMA sur la détection d'ADN de *C. parvum* issus de suspensions d'oocystes viables (suspension A) ou d'oocystes non viables (suspension B)

- Concernant la suspension d'oocystes viables (suspension A), le traitement à l'EMA n'induit pas de réduction du signal ( $<0,5 \log_{10}$ ) comparé au signal obtenu dans les échantillons non traités, quelle que soit la concentration en EMA utilisée. Ainsi une réduction de  $0,37 \log_{10}$  (ET=0,02  $\log_{10}$ );  $0,16 \log_{10}$  (ET=0,14  $\log_{10}$ ) et  $0,43 \log_{10}$  (ET=0,15  $\log_{10}$ ) est observée respectivement pour des concentrations en EMA de 10, 50 et 100 µg/mL.

- D'après les résultats obtenus avec la suspension d'oocystes non viables (suspension B), on observe une réduction de la quantité de génome détectée par PCR en temps réel de plus d' $1,5 \log_{10}$  pour les trois concentrations en EMA testées. Il n'a pas été possible d'obtenir une réduction complète du signal de PCR dans les échantillons traités, du fait de la présence de 2,8% d'oocystes encore viables dans la suspension, inactivés par la chaleur (mesurés par DAPI/PI). Il est constaté que la réduction du signal est d'autant plus faible que la concentration en EMA est faible. Ainsi, une réduction du signal de fluorescence de  $1,69 \log_{10}$  (ET=0,003  $\log_{10}$ ),  $1,95 \log_{10}$  (ET=0,004  $\log_{10}$ ) et  $2,21 \log_{10}$  (ET=0,06  $\log_{10}$ ) est constatée pour des concentrations respectives en EMA de 10, 50 et 100 µg/mL.

- Concernant les résultats obtenus avec la suspension C, il est apparu une réduction du signal de plus de  $2 \log_{10}$  en comparaison avec les échantillons non traités, et ce quelle que soit la concentration en EMA testée (données non montrées).

Au vu de l'ensemble des résultats obtenus sur les différentes suspensions d'oocystes de *C. parvum*, il apparaît que l'utilisation de l'EMA couplé à la PCR peut fournir une information sur la viabilité des oocystes de *Cryptosporidium*. Pour cela, il est nécessaire de limiter la quantité d'EMA à employer à 100 µg/mL et de rajouter une étape de centrifugation. Le choix de retenir la concentration de 100 µg/mL s'est fait sur la base d'un compromis entre la réduction du signal de la PCR et la possible consommation de l'EMA utilisée lors du traitement par des ADN autres que ceux des oocystes issus de micro-organismes co-concentrés et qui pourraient être également présents dans le concentrat. La consommation de ces molécules (EMA ou PMA), lors de leur utilisation dans des matrices complexes issues de l'environnement, a en effet été relatée par différents auteurs.

### 3.2.2.2. Sensibilité de la méthode d'EMA-PCR

Après avoir déterminé la concentration adéquate en EMA à employer pour discriminer les oocystes viables des oocystes non viables, nous avons évalué la sensibilité de la méthode à partir de dilutions des suspensions A (94,3% d'oocystes viables dénombrés par DAPI/PI), et B (93,7% d'oocystes non viables dénombrés par DAPI/PI). Comme précédemment, la suspension B est issue de la suspension A dont les oocystes ont été inactivés par la chaleur (70°C, 60 min). A partir de chaque suspension, une gamme de dilutions de raison 10 a été réalisée en triplicat et chaque dilution a été traitée avec 100 µg/mL d'EMA. En parallèle, une gamme témoin a été réalisée en triplicat à partir de la suspension A sans que les échantillons n'aient subi de traitement à l'EMA. Pour chaque gamme de dilutions, l'ADN des parasites a été extrait et amplifié par PCR en temps réel et les résultats sont présentés sur la Figure 44.

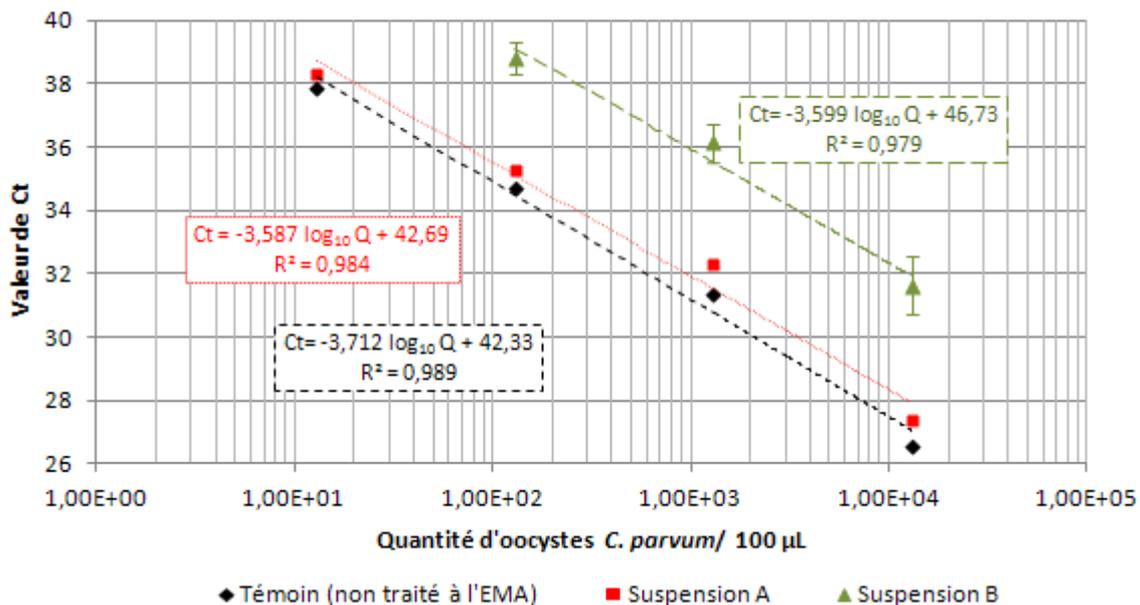


Figure 44: Droites standards obtenues par PCR en temps réel pour différentes quantités d'oocystes viables (suspension A) et non viables (suspension B) traités ou non avec 100 µg/mL d'EMA

En comparant le signal de la PCR en temps réel mesuré pour chaque échantillon témoin et ceux de la suspension A dont les oocystes ont été traités à l'EMA, il apparaît que le traitement à l'EMA induit une réduction du signal de fluorescence de  $0,15 \log_{10}$  (ET=0,04  $\log_{10}$ ) à  $0,23 \log_{10}$  (ET=0,09  $\log_{10}$ ) par rapport aux oocystes viables non traités, pour des quantités comprises entre  $1,3 \times 10^1$  à  $1,3 \times 10^4$  oocystes.

Concernant la suspension B, une réduction du signal de  $1,22 \log_{10}$  (ET=0,11  $\log_{10}$ ) à  $1,5 \log_{10}$  (ET=0,37  $\log_{10}$ ) est mesurée dans les échantillons traités par rapport aux échantillons témoin non traités avec de l'EMA, pour des quantités d'oocystes comprises entre  $1,3 \times 10^2$  et  $1,3 \times 10^4$  oocystes, respectivement. Nous n'avons pas obtenu de signal de fluorescence pour l'échantillon traité à l'EMA contenant 13 oocystes alors qu'il est possible de détecter l'ADN pour ce même échantillon non traité à la chaleur.

Les résultats de ces expériences mettent en évidence qu'il est possible de discriminer les formes viables des formes non viables par comparaison des valeurs de Ct entre des échantillons traités à l'EMA et des échantillons non traités, pour des concentration en oocystes comprises entre  $1,3 \times 10^2$  à  $1,3 \times 10^4$  oocystes. L'absence de fluorescence observée dans la suspension B contenant  $1,3 \times 10^1$  oocystes traités à l'EMA indique que nous avons atteint la limite de détection de la méthode. La réduction du signal mesurée pour cet échantillon n'est seulement que de  $0,64 \log_{10}$  (ET=0,08  $\log_{10}$ ) alors que la proportion d'oocystes non viables mesurée par DAPI/PI est de 89% (ET=5,6%).

### **3.3. Concentration des oocystes de *Cryptosporidium* dans l'eau**

En France, la recherche et le dénombrement des oocystes de *Cryptosporidium* dans les échantillons hydriques sont réalisés avec la méthode normative NF T90-455 (AFNOR, 2001). Cette norme propose une méthodologie adaptée à la recherche de *Cryptosporidium* dans des volumes d'eaux compris entre 20 L (eaux de surface ou eaux résiduaires épurées) à 200 L (eaux d'alimentation et eaux souterraines). L'étape de concentration consiste à filtrer l'échantillon d'eau à travers une cartouche en polyéthersulfone de porosité 1  $\mu\text{m}$ . Les oocystes retenus sur le filtre sont alors récupérés à l'aide d'une solution éluante. Une seconde étape visant à purifier les oocystes présents dans le concentrat par séparation immunomagnétique (IMS) est ensuite réalisée dans le but d'obtenir les oocystes dans un volume de l'ordre de 100  $\mu\text{L}$ . Les oocystes sont alors dénombrés par immunofluorescence. Le rendement de la méthode normalisée a été évalué par des essais inter-laboratoires et les résultats obtenus sont indiqués en annexe de la norme. Des rendements de 41,3% dans les eaux d'alimentation et de 56,1% dans les eaux de surface font offices de référence.

Dans notre travail de thèse, nous avons décidé d'utiliser cette méthode pour détecter les oocystes de *Cryptosporidium* dans les eaux de surface, les eaux de nappes et les eaux traitées. Parallèlement à la détection des oocystes par microscopie, il sera réalisé la détection de génome de *Cryptosporidium* d'intérêts ciblés spécifiquement.

Nous avons mis en place la méthode normalisée au laboratoire. De manière à valider le process nous avons décidé de vérifier les rendements indiqués dans la norme uniquement sur des eaux peu turbides. Cette évaluation a été réalisée d'une part sur les oocystes détectés par microscopie et également en se basant sur la détection génomique effectuée par PCR. Il est important de signaler qu'étant donné le coût des consommables nécessaires à la réalisation de cette méthode, l'étude n'a pu être exhaustive en termes de répliquat.

L'évaluation du rendement de la méthode normalisée a été réalisée à partir d'échantillons d'eau de réseau (100L) artificiellement contaminés avec  $5,2 \times 10^5$ ;  $5,2 \times 10^4$  et  $5,2 \times 10^3$  oocystes *C. parvum*. Après filtration sur cartouche Envirochek et purification par séparation immunomagnétique, 100 µL de concentrat final sont obtenus. La moitié de ce concentrat a été analysée par immunofluorescence selon le protocole strict de la norme NF T90-455 (AFNOR, 2001), et l'autre moitié a été analysée par PCR en temps réel après dilution dans un tampon PBS pH 7,4. La quantité d'oocystes après concentration a été comparée à la quantité initialement introduite dans les 100 L d'échantillon et le rendement de concentration a été calculé pour chaque expérimentation. Les résultats sont présentés dans le Tableau 67.

**Tableau 67: Rendements de la méthode de concentration sur cartouche Envirochek, purification par IMS et détection soit par immunofluorescence soit par PCR en temps réel**

<b>Quantité d'oocystes <i>C. parvum</i></b>	<b><math>5,2 \times 10^5</math></b>	<b><math>5,2 \times 10^4</math></b>	<b><math>5,2 \times 10^3</math></b>	<b>Moyenne</b>
<b>Rendements (%) obtenus par immunofluorescence</b>	66,1	39,4	35,2	46,9 (ET=16,7)
<b>Rendements (%) obtenus par PCR en temps réel</b>	87,8	24,9	32,3	48,4 (ET=34,4)

Les résultats montrent que la méthode de concentration-détection par immunofluorescence selon la norme NF T90-455 (AFNOR, 2001) permet d'obtenir un rendement qui oscille entre 35,2% et 66,1% pour des quantités de parasites comprises entre  $5,2 \times 10^3$  et  $5,2 \times 10^5$  oocystes. Lorsque l'étape de détection est réalisée par PCR en temps réel, des rendements de 24,9% à 87,8 % sont obtenus pour les mêmes quantités d'oocystes. Ces résultats, concordants avec ceux indiqués dans le document normatif, ont permis de valider le process de concentration des oocystes mis en place au laboratoire.

## 4. DISCUSSION

### 4.1. Les méthodes de concentration

La première étape de la détection de tout agent pathogène dans un milieu hydrique consiste à opérer sa concentration sous de faibles volumes. Selon le type d'eau considéré (eaux de surface, eaux de nappe ou eaux traitées), le volume à concentrer sera différent et d'autant plus important que la concentration des agents ciblés sera faible. Ainsi pour les eaux de surface, réceptacle de nombreuses sources de contamination microbiologique, l'analyse de grands volumes n'est pas nécessaire contrairement aux eaux naturellement épurées (eaux souterraines) ou ayant subies un traitement de potabilisation (eaux d'alimentation).

A ce jour, il n'existe pas de méthode universelle permettant de concentrer simultanément tous les micro-organismes pathogènes pour l'Homme présents dans l'eau. Les caractéristiques très disparates entre, par exemple, la taille des protozoaires tels que *Cryptosporidium* ou *Giardia*, qui oscille entre 4 et 15  $\mu\text{m}$ , celle des bactéries qui est de l'ordre de 1  $\mu\text{m}$  et celle des virus qui varie entre 20 et 100 nm, constitue le principal frein. En outre, indépendamment des contraintes inhérentes aux micro-organismes, il est souvent très difficile d'employer la même méthodologie pour rechercher les pathogènes dans des eaux pouvant présenter des caractéristiques physico-chimiques très différentes, et de surcroît, analyser les mêmes volumes analytiques. En effet, si dans les eaux du robinet il est possible d'analyser des volumes supérieurs à 50 L dus à une faible turbidité, dans les eaux de surface, où les matières en suspension sont en grande quantité, l'analyse de mêmes volumes entraînera le colmatage du système, ou bien impactera sur le système de détection en provoquant une importante interférence sur la méthode de détection.

Plusieurs travaux publiés se sont intéressés à l'évaluation de méthodologies permettant la concentration simultanée de bactéries, parasites et virus entériques avec le même système (Hill *et al.*, 2005; Hill *et al.*, 2007; Polaczyk *et al.*, 2007; Polaczyk *et al.*, 2008). Par exemple, Polaczyk *et al.* (2007) ont évalué la méthode de filtration sur la membrane électropositive 1-MDS pour la concentration du bactériophage MS2, la bactérie *Salmonella enterica* et le parasite *C. parvum* dans des échantillons d'eau du robinet. Malgré un rendement de rétention de plus de 90% pour l'ensemble des pathogènes testés, les auteurs ont montré que le rendement global de la méthode était très variable en fonction des conditions d'élution employées, avec des rendements maximaux de  $92 \pm 10\%$  pour le bactériophage MS2, de  $29 \pm 4,2\%$  pour la bactérie *S. enterica* et de  $50 \pm 9,9\%$  pour le parasite *C. parvum*. Au début de ce travail de thèse, nous avons travaillé au développement d'une méthodologie pour la concentration simultanée des adénovirus, des campylobacters et des oocystes de *Cryptosporidium*, basée sur le principe d'adsorption-élution sur laine de verre. Malgré des résultats encourageants, tels qu'une capacité de rétention des trois micro-organismes de plus de 90%, un travail considérable restait encore à entreprendre notamment pour l'optimisation du protocole d'élution. Par conséquent, pour des raisons de temps, nous avons dû abandonner cette méthode et nous rediriger vers l'utilisation de techniques classiquement employées pour la concentration de chaque pathogène séparément.

#### 4.1.1. *Campylobacter*

Pour les campylobacters, la méthode normalisée ISO 17995 (2005) recommande la concentration de ces bactéries par la filtration d'échantillons d'eau de 10 mL, 100 mL et 1 L sur une membrane en ester de cellulose. Si les volumes définis sont suffisants pour mettre en évidence la présence de ces bactéries dans les eaux de surface, il n'en est pas de même pour des eaux épurées naturellement ou celles rendues potables par un traitement adapté. En effet, Hänninen *et al.* (2003) ont mis en évidence la présence de campylobacters dans des échantillons de 4 L à 10 L d'eaux du robinet et souterraines suspectées d'être à l'origine d'une épidémie de gastro-entérites d'origine hydrique. De même, l'augmentation du volume analytique de 100 mL à 1 L voire 2 L, leur a permis de détecter l'indicateur bactérien *E. coli* dans des échantillons pour lesquels ils n'avaient pu mettre en évidence la présence de ces bactéries. Ils suggèrent donc que les volumes de 100 mL ou 1 L classiquement recommandés sont trop faibles pour détecter les campylobacters dans ce type d'échantillon. Des volumes supérieurs à 1 L sont d'ailleurs régulièrement employés pour la recherche d'autres pathogènes tels que les virus ou les parasites. Ainsi, à titre d'exemple, pour la détection des entérovirus ou des oocystes de *Cryptosporidium*, les procédures normalisées (AFNOR, 1996, 2001) recommandent l'analyse de 10 L à 1000 L d'eau selon la nature de l'échantillon.

Concernant la concentration des bactéries, quelques auteurs ont évalué l'efficacité de membranes ou de cartouches pour l'analyse de volumes supérieurs à 1 L. Polaczyk *et al.* (2007) obtiennent des rendements de 12 à 29% avec une membrane électropositive, lors de tests réalisés sur des échantillons de 20 L d'eau du robinet artificiellement contaminés avec une quantité de *Salmonella enterica* de  $10^4$  UFC. De même, des rendements supérieurs à 50% ont été observés avec des filtres électro-négatifs, lors d'expérimentations réalisées sur des échantillons de plus de 15 L d'eau du robinet artificiellement contaminés avec *Salmonella thyphimurium* (Block et Rolland, 1979) ou *Legionella pneumophila* (Payment *et al.*, 1989).

En tenant compte de toutes ces observations, nous avons développé une méthode permettant la détection de *C. jejuni* et *C. coli* dans des échantillons de 1 L à 20 L d'eau de robinet ou d'eau de faible turbidité. Le protocole retenu consiste en une filtration sur une membrane en ester de cellulose de porosité 0,45 µm suivie de l'élution des bactéries à l'aide d'un éluant composé de 3% d'extrait de bœuf, 0,05 M de glycine, pH 9. Le rendement global, estimé par PCR en temps réel sur des échantillons d'1 L d'eau du robinet s'élève à  $87,3 \pm 22\%$ . L'augmentation du volume analytique à 20 L a permis d'obtenir un rendement global de la méthode de 69,5% (ET=10,3%) et 78,5% (ET=15,1%) pour des quantités inoculées de *C. coli* de 91 UFC et 36 UFC. Dans des eaux de turbidité plus importante telles que les eaux de surface, nous avons montré que la méthode mise en place ne pouvait fonctionner. Après avoir effectué quelques modifications du protocole, l'évaluation réalisée sur des échantillons d'1 L d'eau de rivière nous a permis d'estimer un rendement de concentration autour de 41,2% (ET=1,9%), à partir du rendement global de la méthode.

#### **4.1.2. Adénovirus humains**

Concernant la concentration des virus entériques tel que les adénovirus, un très grand nombre de méthodes plus ou moins complexes ont été développées et évaluées dans la littérature scientifique. Ces méthodes sont basées par exemple sur le principe d'adsorption-élution sur laine de verre ou sur membrane, ou d'ultrafiltration (Sobsey et Glass, 1984 ; Vilagines *et al.*, 1993 ; Lambertini *et al.*, 2008).

Au début de ce travail, des essais de concentration des adénovirus par ultrafiltration ont été réalisés à partir d'échantillons d'eau du robinet et d'eau de rivière mais en raison d'un colmatage rapide des membranes lors de la filtration des échantillons d'eau rivière, limitant le volume analytique, nous avons choisi de ne pas retenir cette méthode. Pour la suite des évaluations, et dans l'objectif d'employer la même méthodologie pour l'analyse de tous les types d'eaux (eaux de rivière, eaux de nappe et eaux d'alimentation), notre choix s'est porté très rapidement sur la méthode normalisée XP T90-451 (AFNOR, 1996), employée pour la concentration des entérovirus. Cette méthode présente l'avantage d'être robuste et adaptée à l'analyse de matrices hydriques de nature physico-chimique très différente. Nous avons évalué la méthode sur différents volumes d'eau du robinet afin de déterminer le volume optimal pour la recherche des adénovirus. Il s'avère qu'un volume de 50 L nous a permis d'obtenir les meilleurs résultats avec un rendement de concentration estimé à 29,5% (ET=11,7%). Dans la littérature, les données du taux de récupération de la méthode d'adsorption-élution sur laine de verre sont extrêmement variables en fonction notamment du virus et des conditions expérimentales employées lors de l'évaluation de la méthode. Ainsi, pour les entérovirus, la méthode normalisée (AFNOR, 1996) rapporte des taux de récupération de 74% (ET=21,2%) lors d'essais inter-laboratoires réalisés lors de la validation de la méthode, et Vilaginès *et al.* (1993) observent des taux de récupération qui oscillent entre  $61,6 \pm 24,5\%$  et  $77 \pm 6\%$ . Pour les adénovirus, les rendements sont beaucoup plus faibles. Lambertini *et al.* (2008) obtiennent des rendements de 28% dans l'eau du robinet et Albinana-Gimenez *et al.* (2009) entre 0,7% et 1,36% dans de l'eau du robinet mélangée à 50% avec de l'eau distillée. Dans les eaux plus turbides, après modifications du protocole, nous avons déterminé un rendement de concentration de 30,7% (ET=3,9%) dans 10 L d'eau de rivière.

#### **4.1.3. *Cryptosporidium***

Concernant la concentration des oocystes de *Cryptosporidium* dans l'eau, actuellement en France, la méthode de référence est la méthode normalisée NF T90-455 (AFNOR, 2001) qui consiste en une filtration à travers une cartouche de polyéthersulfone de porosité 1  $\mu\text{m}$ . Pour des raisons économiques, les expérimentations ont été réalisées uniquement sur des échantillons d'eau d'alimentation et seul le rendement global de la méthode a été évalué au cours de cette étude. Les résultats obtenus par la technique moléculaire ont été comparés à ceux obtenus par immunofluorescence qui est la méthode de détection recommandée dans la méthode normalisée (AFNOR, 2001).

Les expérimentations réalisées sur des échantillons de 100 L d'eau de réseau artificiellement contaminés avec des quantités d'oocystes comprises entre  $5,2 \times 10^3$  et  $5,2 \times 10^5$  ont permis de déterminer un rendement de la méthode de 48,4% (ET=34,4%) par PCR en temps réel et de 46,9% (ET=16,7%) par immunofluorescence. Ces derniers résultats sont comparables à ceux rapportés dans la méthode normalisée, déterminés lors d'essais inter-laboratoires pour la validation de la norme. Ainsi, les quatorze laboratoires participants ont obtenus un taux de récupération moyen en oocystes de 41,3% (ET=12,3%) lors d'essais réalisés sur 100 L d'eau du robinet artificiellement contaminés avec environ 200 oocystes. Par biologie moléculaire, Fontaine et Guillot (2003) observent des rendements de 78,2% (ET=61,8%) et 78,5% (ET=20,4%) sur des échantillons de 100 L d'eau du robinet dopés respectivement avec 8,3 et 775 oocystes. Dans les eaux plus turbides, telles que les eaux de rivière, les données de la littérature mentionnent des rendements de 56,1% (AFNOR, 2001) et entre 39% (ET=40%) et 49% (ET=38%) (Shaw *et al.*, 2008) lorsque la détection est effectuée par immunofluorescence; et entre 49,6% (ET=19,3%) et 57,6% (ET=10,7%) lorsque la détection est réalisée par PCR en temps réel (Fontaine et Guillot, 2003).

Il est important de signaler que tous les développements et les évaluations des méthodes de concentration ont été réalisés sur des échantillons d'eaux à un moment donné. Les caractéristiques physico-chimiques des eaux étant variables au cours du temps, les rendements déterminés au cours de ce travail pourront eux aussi évoluer, de même que les volumes analytiques fixés initialement, en fonction de la qualité de l'eau.

#### **4.2. Les méthodes de détection**

Dans le cadre de ce travail de thèse, il était nécessaire de mettre en place différents types de méthodologies qui permettent (i) de mettre en évidence rapidement la présence des bactéries, parasites ou virus entériques dans différents milieux hydriques environnementaux, d'une part en quantifiant le niveau de contamination, et d'autre part en recherchant spécifiquement certaines espèces parmi l'ensemble détecté et (ii) de révéler le caractère viable ou infectieux des pathogènes ciblés. Tout comme les techniques de concentration, il n'existe pas de méthode de détection universelle capable d'obtenir simultanément toutes ces informations pour les trois micro-organismes dans les différents milieux hydriques. Pour répondre au premier point, notre choix s'est naturellement porté sur les méthodes de PCR en temps réel. Ces outils moléculaires permettent de détecter et quantifier de façon rapide, sensible et spécifique le génome des agents ciblés sans faire de distinction selon leur état de viabilité et/ou d'infectiosité.

#### **4.2.1. Campylobacter**

Concernant la détection des campylobacters, nous avons donc décidé de nous intéresser plus particulièrement à la détection des deux espèces les plus majoritairement retrouvées dans les campylobactérioses humaines d'origine hydrique, *C. jejuni* et *C. coli*.

L'évaluation des deux systèmes de PCR adaptés des protocoles développés par le CNRCH, a été réalisée à l'aide d'étalons moléculaires et nous a permis de mettre en évidence une sensibilité des techniques de 27,1 copies de génomes/ $\mu\text{L}$  (soit 135,5 copies/réaction) pour la PCR *C. jejuni*, et entre 2,85 et 28,5 copies de génomes/ $\mu\text{L}$  (soit 14,3 à 143 copies/réactions) pour la PCR *C. coli*, avec des rendements respectifs de 75,4% et 78,2%. La variabilité des mesures est toujours inférieure à 3,5% pour les deux PCR. Nos résultats sont en adéquation avec ceux obtenus par Ahmed *et al.* (2009) qui observent une sensibilité de leur technique de PCR entre 1 et 10 copies de génomes/réaction avec une variabilité intra et inter-essais oscillant entre 3% et 5%, ou encore avec LaGier *et al.* (2004) qui obtiennent une sensibilité de 10 copies de génomes. A partir des expérimentations réalisées avec un éluant composé de 3% d'extrait de bœuf et de 0,05 M de glycine, pH 9; employé lors de l'étape de concentration-élution des bactéries, nous avons déterminé une sensibilité de la méthode à 8,3 UFC/mL pour *C. jejuni* et de 39 UFC/mL pour *C. coli* avec une efficacité respective de 86,2% et 79,5% et une variabilité des mesures inférieure à 2%. L'adaptation apportée au protocole de détection pour rechercher la présence de *C. jejuni* et *C. coli* dans les eaux turbides telles que les eaux de rivière, afin de réduire l'effet inhibiteur des matières en suspensions co-concentrées avec les bactéries, a permis d'obtenir un protocole dont la sensibilité est de 8,4 UFC/mL pour *C. jejuni* et 23 UFC/mL pour *C. coli*, avec une efficacité de 81,6% pour les deux systèmes. Les résultats obtenus sont tout à fait satisfaisants par rapport à ceux déjà publiés, dont les limites de détection des méthodes sont comprises entre 1 et 20 UFC/mL (Best *et al.*, 2003; Yang *et al.*, 2003).

#### **4.2.2. Adénovirus humains**

En ce qui concerne la détection des adénovirus humains dans les échantillons hydriques, il s'avère que celle-ci est généralement réalisée à l'aide de méthodes moléculaires. Nous avons choisi d'employer les deux protocoles de PCR en temps réel développés par Jothikumar *et al.* (2005) dont l'un permet la détection de l'ensemble des adénovirus humains et l'autre celle des adénovirus dits « entériques » (adénovirus 40 et 41) spécifiquement. Une sensibilité de la méthode de PCR TaqMan, ciblant l'ensemble des adénovirus humains, comprise entre 3,38 et 33,8 copies de génomes/ $\mu\text{L}$  (8,5 à 85 copies de génome/réaction) a été obtenue avec une efficacité qui oscille entre 85,6% et 92,4%. Ces résultats sont similaires à ceux de Jothikumar *et al.* (2005) qui observent une sensibilité entre 5 et 350 copies de génomes/réaction et une efficacité comprise entre 87,5% et 92,3%; ou encore avec d'autres protocoles de PCR déjà publiés (Jiang *et al.*, 2005; Huang *et al.*, 2008).

Les expérimentations réalisées à partir de particules infectieuses d'adénovirus inoculées dans une solution éluante composée de 3% d'extrait de bœuf, 0,05 M de glycine, à pH 9,5 ; employée pour éluer les virus adsorbés à la laine de verre lors de l'étape de concentration, ont permis de mettre en évidence une perte de sensibilité de la méthode de détection d'1 log<sub>10</sub> et une efficacité de 70%, comparées aux résultats obtenus dans du PBS. L'effet inhibiteur de l'extrait de bœuf sur les méthodes de PCR avait déjà été montré dans différentes études (Abbaszadegan *et al.*, 1993; Schwab *et al.*, 1995; Shieh *et al.*, 1995).

Pour la détection spécifique des adénovirus 40 et 41, parmi l'ensemble des adénovirus humains, n'ayant pu obtenir un signal de fluorescence dans les conditions opératoires mentionnées par Jothikumar *et al.* (2005), une PCR HRM a donc été mise au point à partir des amorces dessinées par les auteurs. A l'aide d'étalons moléculaires d'adénovirus 40 et 41, il a été possible de déterminer une sensibilité de la technique comprise entre 40 et 69,3 copies de génomes/μL (100 à 173 copies de génomes/réactions). Notre technique est donc moins sensible que la PCR FRET originale, pour laquelle la sensibilité se situe entre 3 et 5 copies/réactions, mais nos résultats sont tout de même satisfaisants puisque d'une manière générale, la sensibilité des PCR employées pour la détection des virus varie entre 1 et 100 copies de génomes (Heim *et al.*, 2003 ; Zhang *et al.*, 2006, Kirs et Smith, 2007).

#### **4.2.3. *Cryptosporidium***

En ce qui concerne la détection des oocystes de *Cryptosporidium* dans les échantillons hydriques, celle-ci est classiquement réalisée par observation microscopique. L'immunofluorescence, considérée comme la technique de référence pour la mise en évidence de ce parasite, présente néanmoins l'inconvénient majeur de ne pas permettre la distinction des espèces de *Cryptosporidium*. Or, parmi les nombreuses espèces de ce parasite, seules quelques-unes sont pathogènes ou sont potentiellement pathogènes pour l'Homme.

Une PCR quantitative de type TaqMan a été mise au point dans le cadre ce travail de manière à cibler spécifiquement trois espèces de *Cryptosporidium* pathogènes pour l'Homme (*C. hominis*, *C. parvum*, et *C. meleagridis*). Les expérimentations réalisées à partir d'un étalon moléculaire nous a permis de déterminer une sensibilité comprise entre 16 et 160 copies de génome/μL (40 à 400 copies de génome/réaction). Fontaine et Guillot (2002) ont développé une technique de PCR en temps réel pour la détection spécifique des espèces *C. parvum* et *C. hominis* et observent une sensibilité de 6 copies de génome par réaction. Nous avons testé la PCR TaqMan développée précédemment sur des suspensions d'oocystes purifiées à partir de selles de veaux contaminés avec l'espèce *C. parvum*. L'étape d'extraction génomique, adaptée à la nature de l'échantillon, n'apporte pas de variation supplémentaire à la PCR en temps réel. Ainsi, en fonction du protocole d'extraction génomique employé, la limite de détection de la méthode a été estimée entre 2,4 et 240 oocystes, ce qui est tout à fait satisfaisant avec les données de la littérature pour lesquelles les limites de détection oscillent entre 5 et 100 oocystes (Fontaine et Guillot, 2003; Minarovicova *et al.*, 2007).

### **4.3. Mise en évidence de la viabilité**

Bien que les résultats obtenus avec les techniques moléculaires attestent de la présence d'une contamination de l'échantillon hydrique de manière rapide, sensible et spécifique, elles ne peuvent témoigner du caractère viable ou infectieux du micro-organisme détecté. Cette information est primordiale afin de relier la présence d'un pathogène dans l'eau à un risque potentiel d'infection pour le consommateur en cas d'ingestion.

#### **4.3.1. *Campylobacter***

La méthode de culture par enrichissement selon la norme ISO 17995 (2005) est la méthode de référence pour mettre en évidence la présence de campylobacters viables dans l'eau. Toutefois, bien que l'utilisation de bouillons d'enrichissement soit recommandée pour les prélèvements environnementaux (Moore *et al.*, 2005), dans le but de favoriser la détection des campylobacters dans les prélèvements où ces bactéries sont en faible nombre, ou stressées et/ou en présence d'une flore compétitive abondante, elle induit une augmentation du délai de réponse de 24 à 48 heures par rapport à la méthode de culture directe sur gélose, et ne permet pas d'indiquer directement les espèces présentes dans l'échantillon. Dans ce contexte, nous avons évalué l'intérêt de l'utilisation de bouillons et, contrairement à Blaser et Cody (1986), nous avons montré que cette étape d'enrichissement permettait d'augmenter la sensibilité de 2 log<sub>10</sub>.

Cependant, dans les échantillons environnementaux, où la flore interférente peut être importante, l'utilisation de bouillons d'enrichissement peut induire une inhibition de la croissance des campylobacters en raison d'une compétition pour les nutriments du milieu (Fricker, 1987). Les essais opérés sur des échantillons d'eau de rivière artificiellement contaminés montrent que l'emploi combiné de deux bouillons, dont l'un est plus sélectif que l'autre, comme préconisé dans la norme ISO 17995 (2005), permet d'augmenter la probabilité de détection des campylobacters dans ce type d'échantillon. L'utilisation de la PCR combinée à la culture avait pour objectif de mettre en évidence la présence de *C. jejuni* et *C. coli* parmi l'ensemble des colonies obtenues par culture. Dans le cas de la méthode normative, la mise en évidence des bactéries campylobacters est réalisée par des tests phénotypiques qui impliquent l'isolement des colonies. Dans le cas où un tapis bactérien est obtenu, l'isolement des bactéries peut prendre beaucoup de temps et par conséquent augmenter le délai de réponse. En outre il est possible de ne pas aboutir à des résultats concluants. Le typage par PCR est beaucoup plus rapide que les méthodes phénotypiques car toutes les colonies, typiques ou non des campylobacters, sont récupérées. L'ADN de l'ensemble des colonies est soumis à l'amplification après extraction par la chaleur.

Nous avons montré, au travers d'expérimentations réalisées à partir d'échantillons d'eau de rivière, que la présence de la flore interférente n'avait pas d'influence sur l'intensité de fluorescence de la réaction de PCR, ni sur le Tm mesuré à partir des amplicons. Toutefois, malgré un gain de temps et un pouvoir discriminant plus important que les méthodes phénotypiques, la technique de PCR couplée à la culture ne peut mettre en évidence la présence possible des formes VNC. Ces formes, incapables de se multiplier sur des milieux gélosés, conservent néanmoins une faible activité métabolique et peuvent redevenir cultivables, donc pathogènes à la faveur d'un passage dans le tube digestif d'un animal à sang chaud qui pourrait être le consommateur (AFSSA, 2004). De manière à mettre en évidence ces formes VNC, nous avons évalué, au début de ce travail de thèse la possibilité d'employer un système couplé d'EMA-PCR. L'EMA est un colorant vital qui se lie de façon covalente à l'ADN des cellules mortes, empêchant son amplification lors de la PCR. Ainsi seul l'ADN des cellules viables est amplifié. Cette méthode déjà employée par Rudi *et al.* (2005) pour la discrimination des cellules viables et non viables à partir de chairs de poulet, a été testée sur des suspensions de cellules *C. jejuni*. Après de multiples tentatives et différentes adaptations, nous avons dû renoncer à son utilisation dans la suite de notre travail.

#### **4.3.2. Adénovirus humains**

Pour la mise en évidence du caractère infectieux des adénovirus détectés par PCR, la méthode la plus couramment employée est la culture cellulaire ou la méthode de couplage d'ICC-PCR. Cette dernière présente l'avantage d'être plus sensible, plus rapide (Chapron *et al.*, 2000; Grabow *et al.*, 2001; Lee et Jeong, 2004), et permet de mettre en évidence l'infectiosité des virus ne présentant pas d'effet cytopathogène comme les adénovirus 40 et 41. Généralement réalisée en format flasque, nous avons étudié la possibilité de l'employer en microplaque de 96 puits, qui représente en outre l'avantage d'analyser la totalité de l'échantillon. Nous avons montré que cette technique, mise au point sur le système cellulaire A549 était plus sensible de  $2 \log_{10}$  à plus de  $4 \log_{10}$  par rapport à la méthode de culture cellulaire, et de 1 à  $2 \log_{10}$  comparativement à la PCR en temps réel. Le temps optimal pour observer une augmentation significative de la quantité d'ADN au sein des cellules, témoignant d'une répllication virale, a été déterminé à 96 heures. Pour les adénovirus 40 et 41, plusieurs tests reprenant ce principe ont été réalisés sur des cellules A549 mais ce sont soldés par des résultats non concluants. Ces résultats étaient prévisibles car ces virus entériques sont connus pour être difficilement cultivables sur de nombreuses lignées cellulaires (Brown et Petric, 1986; Grabow *et al.*, 1992; Pinto *et al.*, 1995; Jiang, 2006). Des tests complémentaires sur de nouvelles lignées cellulaires (cellules HEK 293) ont été entrepris à la fin de ce travail de thèse, et se poursuivent actuellement au laboratoire dans l'objectif de proposer une méthode validée pour mettre en évidence l'infectiosité des souches isolées et conservées dans l'échantillothèque.

#### **4.3.3. *Cryptosporidium***

Concernant la mise en évidence de la viabilité des oocystes de *Cryptosporidium*, nous avons choisi de développer la méthode d'EMA-PCR, combinant l'utilisation d'un colorant vital, le monoazide d'éthidium, à la détection par PCR en temps réel. Dans la littérature, de nombreuses études emploient cette méthode de couplage pour mettre en évidence la viabilité des campylobacters (Rudi *et al.*, 2005, Flekna *et al.*, 2007), de *Legionella* (Chang *et al.*, 2009 ; Delgado-Vescogliosi *et al.*, 2009), *E. coli* (Gedalanga et Olson, 2009). En 2009, Brescia *et al.* ont développé la méthode de PMA-PCR qui combine l'utilisation du PMA et la détection par la technique de PCR conventionnelle. A partir du protocole de ces derniers, nous avons alors évalué la possibilité d'employer l'EMA-PCR pour la mise en évidence des oocystes viables dans l'eau. Les conditions opératoires optimales, déterminées sur des suspensions d'oocystes viables et non viables inactivés par la chaleur, s'avèrent être un traitement à l'EMA à une concentration de 100 µg/mL suivie d'une étape de centrifugation, préalablement à l'extraction génomique, afin d'éliminer l'EMA résiduel. L'effet inhibiteur de l'EMA sur le process de détection a déjà été mentionné par Nocker et Camper (2006), ou par Rueckert et Morgan (2007), pour des concentrations en EMA supérieures à 14,3 µM. L'évaluation de ce protocole a ensuite été réalisée sur différentes quantités d'oocystes et la limite de détection de la méthode a été estimée à 130 oocystes ce qui est proche de celle déterminée par la méthode de PMA-PCR développée par Brescia *et al.* (2009), comprise entre 10 et 100 oocystes.



***Partie 2: Niveau de contamination  
fécale de différents milieux hydriques  
environnementaux par des  
campylobacters, des adénovirus  
humains et des parasites  
Cryptosporidium***

---



Les données relatives à la contamination des milieux hydriques destinés à des fins alimentaires sont très fragmentaires. Si de nombreuses informations ont été collectées à propos des indicateurs de contamination fécale, en revanche pour d'autres micro-organismes pourtant régulièrement incriminés dans les épidémies d'origine hydrique, tels que les trois micro-organismes d'intérêt, *Campylobacter*, *Cryptosporidium* et les adénovirus, les données en lien avec leur présence dans ces milieux sont peu nombreuses. Le but de cette étude était donc d'améliorer notre niveau de connaissances sur le flux de ces pathogènes ainsi que de leur état de viabilité ou de virulence dans différentes ressources hydriques (eaux de surface et eaux de nappe) utilisées comme des ressources brutes, et dans l'eau d'alimentation produite et distribuée à partir de ces mêmes eaux.

La zone retenue dans le cadre de cette étude est celle du bassin hydrologique de la Moselle, de la ressource jusqu'à la confluence avec la rivière et le canal de la Meurthe. Sur ce tronçon d'écoulement de plus de 100 km, diverses communes de taille très différente captent de l'eau soit directement dans la Moselle soit dans des nappes alluviales rechargées par cette rivière, pour produire de l'eau potable.

L'étude proposée ci-dessous a été menée en deux temps. Nous nous sommes tout d'abord focalisés sur une commune située dans le bassin Nancéen produisant de l'eau de consommation après captage et traitement d'une eau brute issue du mélange d'une eau puisée dans la rivière (Moselle) et d'une eau puisée dans une nappe alluviale. Il a été recherché au niveau de ce site (nommé site E) les trois micro-organismes ciblés, *Campylobacter*, *Cryptosporidium* et les adénovirus humains, simultanément dans l'eau de la rivière, dans l'eau de nappe et dans l'eau traitée en sortie de station, à l'aide des différents outils mis en place au laboratoire et précédemment évalués. Parallèlement, dans ces trois milieux, les paramètres physico-chimiques (T°C, pH, turbidité, conductivité,...) ont été mesurés, et la recherche de bactéries indicatrices d'une contamination fécale (*E. coli*, Entérocoques et les spores de bactérie ASR) a été opérée selon les normes analytiques actuellement en vigueur. Cette étude a été conduite sur une période d'une année à raison d'un prélèvement bimensuel.

Dans un second temps nous sommes focalisés sur la mesure de ces différents micro-organismes et des paramètres physico-chimiques dans des eaux brutes (eau de Moselle et/ou eau de nappe alluviale) au cours d'une campagne de mesure au niveau de 8 sites de production situés le long de la Moselle entre la ressource jusqu'à la confluence avec la Meurthe. Les différents résultats obtenus ont été comparés entre eux de manière à pouvoir identifier des corrélations.

Ce travail a fait l'objet d'une présentation scientifique et sera valorisée très prochainement au travers d'un article.

## 1. DESCRIPTION DES SITES D'ETUDE

Pour réaliser ce travail, notre choix s'est porté sur une zone d'étude située sur la rivière Moselle entre sa source et sa confluence avec la Meurthe (Figure 45).

La rivière Moselle prend sa source dans les Vosges, s'écoule sur 560 km vers l'Allemagne, se jette dans le Rhin au niveau de la ville de Coblenz. Entre la source de la Moselle et sa confluence avec la Meurthe, plusieurs collectivités captent l'eau de la rivière ainsi que des nappes alluviales, plus ou moins influencées hydrologiquement par la rivière, pour produire l'eau potable.

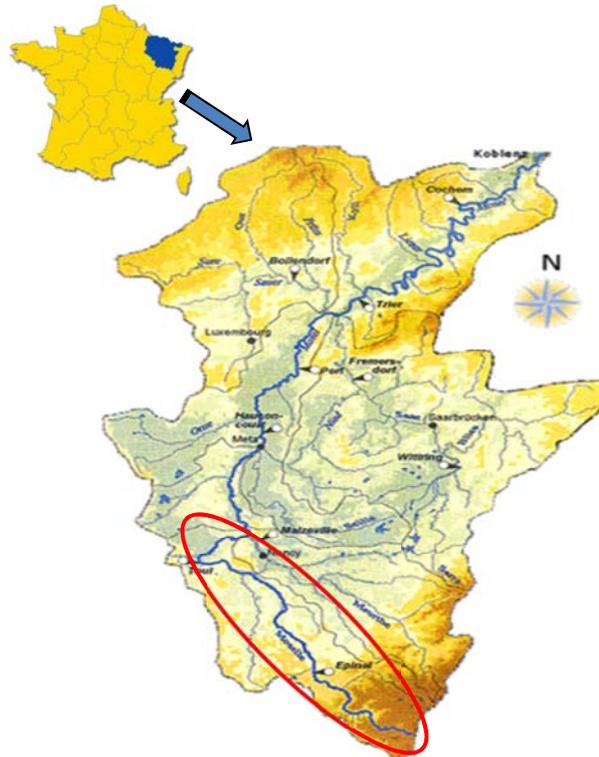


Figure 45 : Situation géographique du site d'étude sur le bassin versant de la Moselle.

Au cours de cette étude d'occurrence deux plans d'échantillonnages ont été organisés.

Le premier s'est focalisé sur un seul site, nommé site E. Ce site de production correspond à une unité de potabilisation d'une collectivité localisée dans le bassin nancéen. Cette unité de distribution a pour particularité de produire de l'eau potable à partir du mélange de deux ressources, traitées différemment. L'eau brute de la première ressource est captée directement dans la Moselle. Elle est traitée au sein d'une usine selon un procédé de traitement de type coagulation-floculation-sédimentation, filtration sur sable suivi d'une désinfection finale au dioxyde de chlore. L'eau de la seconde ressource est une eau de nappe alluviale jouxtant la Moselle et située au niveau du site de production. Cette eau de nappe est mélangée à l'eau traitée juste avant la désinfection au chlore gazeux. Le mélange se fait dans des proportions variables quotidiennement en fonction de la quantité d'eau disponible dans les puits ainsi que de la qualité physico-chimique de la Moselle (turbidité). En sortie de station de traitement, l'eau est acheminée dans un réservoir avant distribution dans lequel elle sera de nouveau mélangée en proportion variable avec une eau traitée provenant d'une ressource hydrologique différente non influencée par la Moselle. En termes de volume produit, il peut être estimé que l'usine de traitement du site E couvre environ 15 à 20% des besoins en eau de la collectivité. Il faut signaler que cette usine sera très prochainement rénovée complètement avec l'intégration d'un nouveau process de traitement. Dans le cadre de cette étude, les analyses ont été réalisées sur l'eau captée au niveau de la Moselle au niveau de la prise d'eau, sur l'eau de la nappe alluviale et sur l'eau mélangée en sortie d'usine. Les prélèvements ont été réalisés selon une fréquence bi-mensuelle de juin 2010 à mai 2011, de manière à inclure un effet saison.

Le deuxième plan d'échantillonnage a été réalisé sur huit sites différents répartis le long de la Moselle, sur un tronçon d'environ 70 km entre le site A, le plus en amont, et le site H, proche de la confluence avec la Meurthe. Ces huit sites, dont le site E, correspondent à des unités de potabilisation qui utilisent de l'eau brute captée soit exclusivement dans la Moselle (site D et site F), soit exclusivement dans des nappes alluviales de la Moselle (site A, site B, site C, site G et site H), soit dans la Moselle et dans une nappe alluviale de la Moselle (site E). Selon le type d'eau employée, leur qualité et la taille de la collectivité, les traitements de potabilisation diffèrent (simple chloration, filtration sur sable avec traitement primaire ou filtration sur membrane). La campagne de prélèvements a été réalisée en mars 2011 sur deux jours, dans le sens amont-aval de la rivière (du site le plus proche de la ressource vers le site le plus éloigné). Quel que soit le site considéré, il a été réalisé systématiquement des analyses sur (i) l'eau de la Moselle prélevée dans un périmètre proche de l'usine de traitement ou au niveau de la prise d'eau des sites utilisant cette ressource, sur (ii) l'eau provenant des captages en nappe alluviale pour les usines utilisant cette ressource et (iii) sur l'eau traitée en sortie de station de potabilisation. Compte tenu d'interconnexions et des mélanges possibles avec d'autres ressources hydrologiques employées en complément par les collectivités, il a été décidé de ne pas réaliser d'analyses sur des eaux directement distribuées aux consommateurs.

## 2. CONCENTRATION DES PATHOGENES CIBLES DANS LA MOSELLE

### 2.1. Pollution fécale de la Moselle au niveau du site E

Pour le site E, 20 prélèvements d'eau de rivière au niveau du point de captage ont été réalisés sur la période d'étude de juin 2010 à mai 2011. Les résultats concernant les paramètres physico-chimiques et microbiologiques, tels que les indicateurs bactériens, les campylobacters, les adénovirus humains ainsi que les parasites *Cryptosporidium*, sont présentés ci-dessous.

#### 2.1.1. Paramètres physico-chimiques

A chaque prélèvement, les paramètres physico-chimiques tels que la température, la turbidité, le pH, le carbone organique total (COT) ainsi que la conductivité ont été mesurés. Les résultats obtenus sont présentés paramètre par paramètre sur les figures 46, 47, 48, 49 et 50. Une synthèse des résultats est présentée dans le Tableau 68.

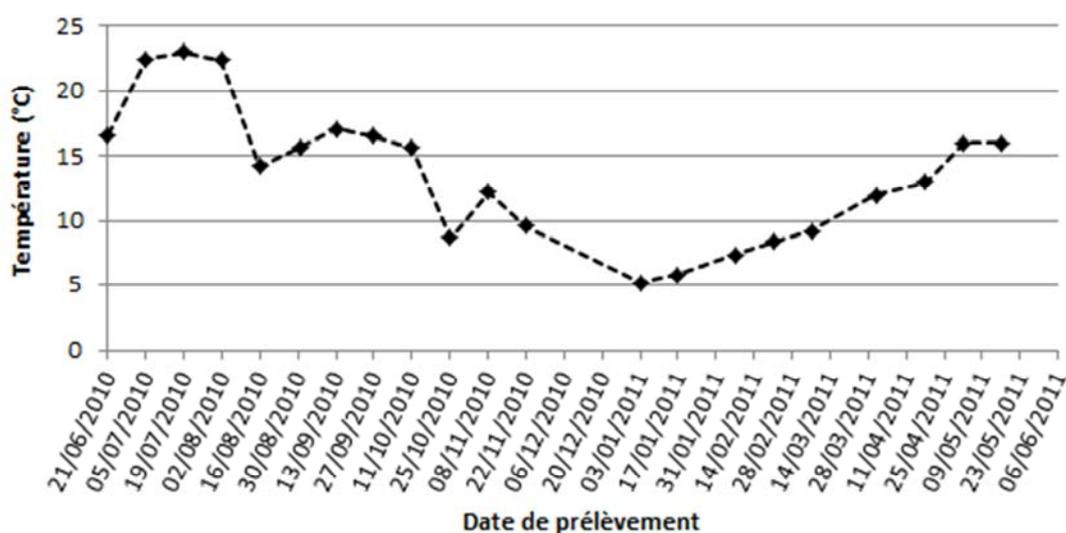


Figure 46: Température de l'eau (°C) mesurée dans la Moselle au niveau du site E entre juin 2010 et mai 2011

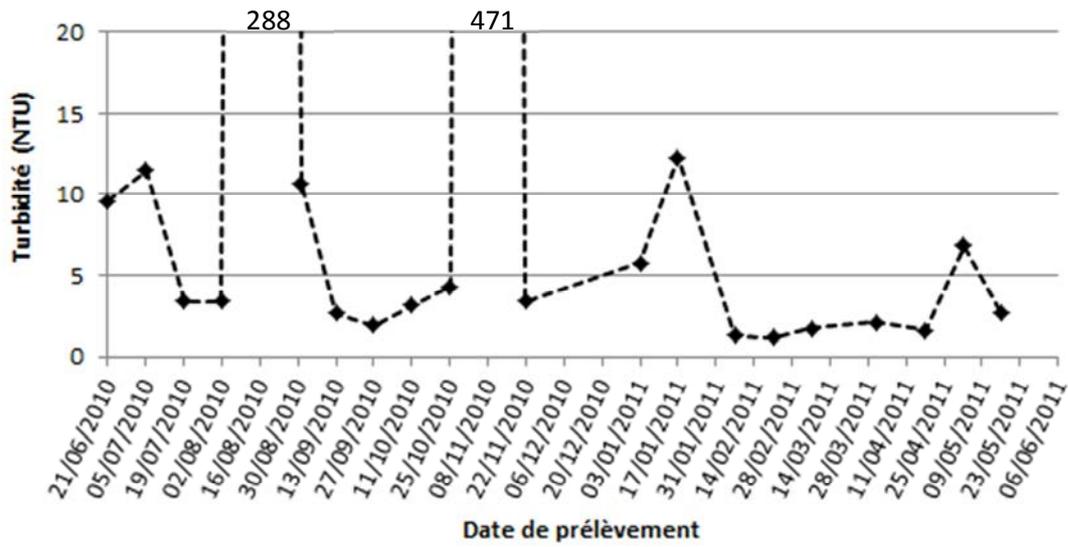


Figure 47: Turbidité (NTU) mesurée dans la Moselle au niveau du site E entre juin 2010 et mai 2011

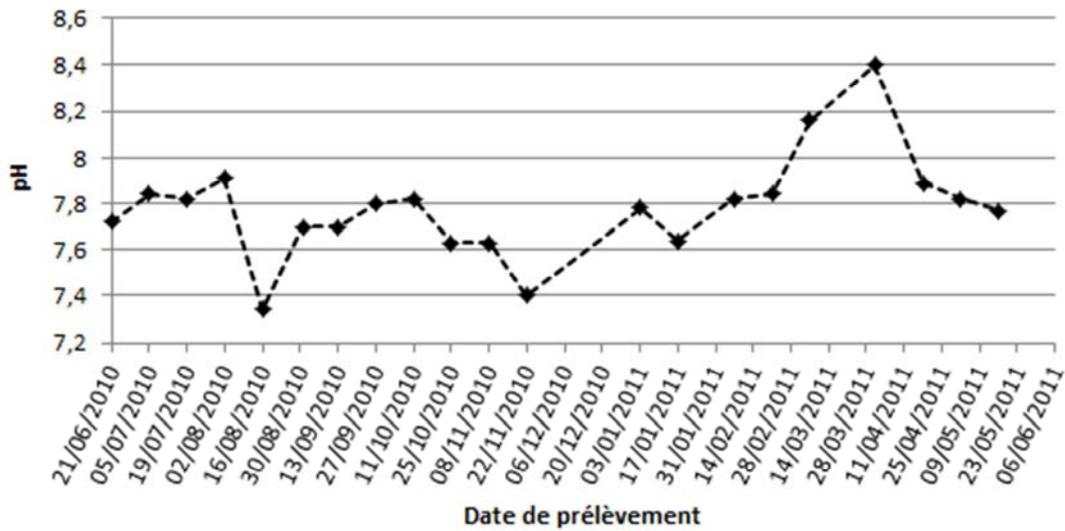


Figure 48: pH de l'eau mesuré dans la Moselle au niveau du site E entre juin 2010 et mai 2011

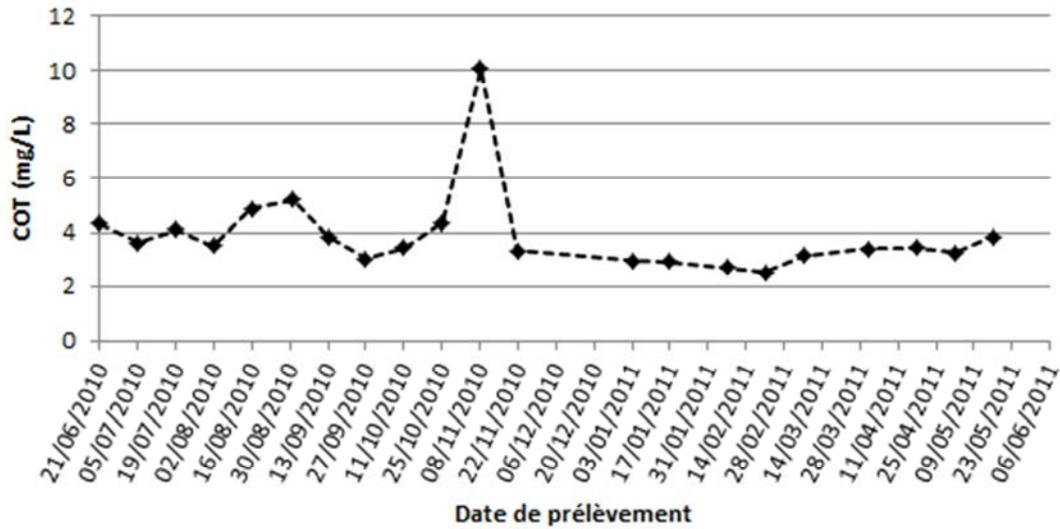


Figure 49: Carbone Organique Total de l'eau (mg/L) mesuré dans la Moselle au niveau du site E entre juin 2010 et mai 2011.

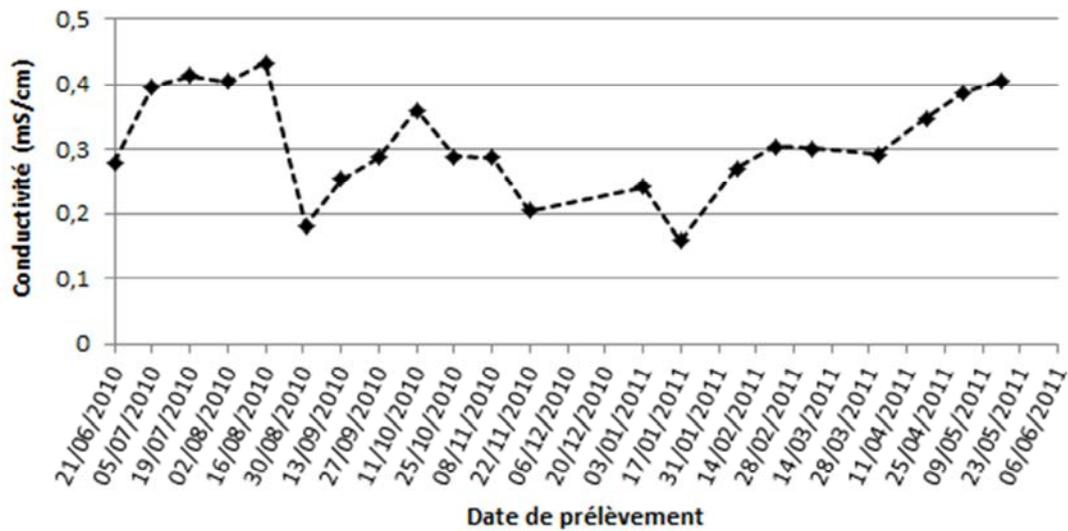


Figure 50: Conductivité de l'eau (mS/cm) mesurée dans la Moselle au niveau du site E entre juin 2010 et mai 2011

**Tableau 68: Synthèse des mesures de température, turbidité, pH, COT et conductivité obtenues dans la Moselle au niveau du site E durant la période d'étude de juin 2010 à mai 2011**

	Température (°C)	Turbidité (NTU)	pH	COT (mg/L)	Conductivité (mS/cm)
<b>Moyenne</b>	13,7	40,37	7,77	3,89	0,31
<b>Ecart type</b>	5,3	116,44	0,22	1,58	0,08
<b>Minimum</b>	5,2	1,13	7,34	2,52	0,16
<b>Maximum</b>	23,0	471,00	8,40	10,09	0,43
<b>Médiane</b>	14,2	3,36	7,78	3,44	0,29

Sur la période d'étude de juin 2010 à mai 2011, la température de l'eau a oscillé entre 5,2°C et 23°C. La turbidité a été extrêmement variable puisque des variations comprises entre 1,13 NTU et 471 NTU ont été observées. Les deux valeurs de turbidité supérieures à 250 NTU ont été mesurées le 16/08/2010 (288 NTU) et le 08/11/2010 (471 NTU) lors d'épisodes pluvieux importants. Les autres valeurs sont restées inférieures à 15 NTU. Concernant le pH moyen de la Moselle, il est de 7,77 (ET=0,22) et la conductivité se situe à 0,31 mS/cm (ET=0,08 mS/cm). Pour le COT, des variations très importantes ont été observées au cours de l'étude avec des valeurs comprises entre 2,52 mg/L et 10,09 mg/L.

### 2.1.2. Les indicateurs bactériens de contamination fécale et ASR

Sur les 21 prélèvements, tous les échantillons prélevés contenaient des bactéries coliformes, des entérocoques et des spores de bactéries ASR à différentes concentrations. Les bactéries *E. coli* ont été retrouvées en plus grande quantité avec une concentration moyenne de  $2,3 \times 10^3$  NPP/100 mL (ET=  $3,9 \times 10^3$  NPP/100 mL), suivie par les Entérocoques à une concentration moyenne de  $7,5 \times 10^2$  NPP/100 mL (ET= $2,5 \times 10^3$  NPP/100 mL) et les spores de bactéries ASR à une concentration moyenne de  $5,4 \times 10^2$  UFC/100 mL (ET=  $9,9 \times 10^2$  UFC/100 mL). Quel que soit l'indicateur ou le micro-organisme considéré, les concentrations retrouvées ont été extrêmement variables au cours du temps avec des valeurs qui oscillent entre  $1,3 \times 10^2$  et  $1,9 \times 10^4$  NPP/100 mL pour *E. coli*, entre  $1,5 \times 10^1$  et  $1,2 \times 10^4$  NPP/100 mL pour les Entérocoques et entre  $6,8 \times 10^1$  et  $4,3 \times 10^3$  UFC/100 mL pour les spores de bactéries ASR (Figure 51). Globalement les variations de ces paramètres sont similaires au cours du temps, et des corrélations significatives ont été mises en évidence entre les trois indicateurs ( $p < 0,05$ ).

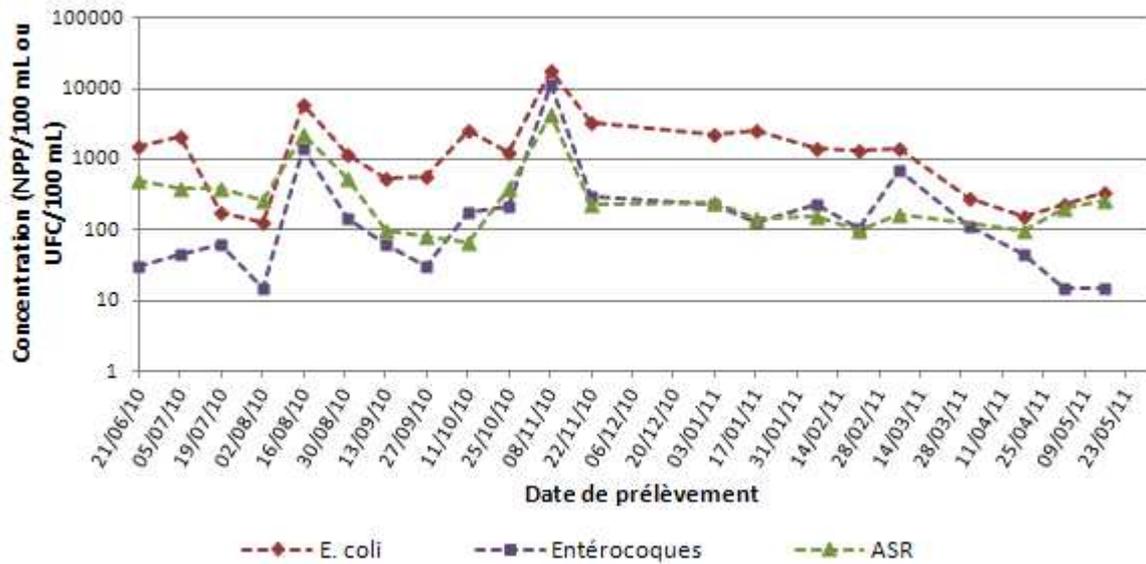


Figure 51: Evolution de la concentration en *E. coli*, Entérocoques et en spores de bactéries ASR dans la Moselle au cours du temps (n=21 pour *E. coli* et Entérocoques, et n=20 pour les spores de bactéries ASR)

### 2.1.3. *Campylobacter*

Les résultats concernant les concentrations en campylobacters mesurées avec les différents outils à disposition, pendant la durée de l'étude sur le site E, sont présentés dans le Tableau 69.

Avec la méthode de détection normative ISO 17995 (2005), il a été mis en évidence la présence de campylobacters thermotolérants viables dans 70% des échantillons analysés (14/20). Parmi ces échantillons, 14,2% présentaient une concentration supérieure ou égale à 100 UFC/L (2/14).

La méthode couplée de culture-PCR a permis de mettre en évidence la présence de l'espèce *C. jejuni* et/ou *C. coli* dans 89,5 % des échantillons analysés (17/19). L'emploi de cette méthodologie couplée a l'avantage d'une part de révéler la présence de résultats faussement négatifs obtenus par la méthode normative (3 échantillons), et d'autre part de rehausser les concentrations déterminées dans 36,8% (7/19) des échantillons contaminés en campylobacters viables. Ainsi avec cette méthode, le nombre d'échantillons dont la concentration est supérieure à 100 UFC/L est de 35,7% (5/14).

Niveau de contamination fécale des milieux hydriques par les micro-organismes d'intérêt

Le typage réalisé à partir des colonies obtenues par culture (culture-PCR) a permis de mettre en évidence la présence de l'espèce *C. coli* dans 73,7 % (14/19) des échantillons et celle de l'espèce *C. jejuni* dans 52,6% (10/19) des échantillons. Il apparaît une distribution différente des deux espèces au cours du temps. Ainsi, contrairement à l'espèce *C. coli* qui a été détectée tout au long de l'année, l'espèce *C. jejuni* a été retrouvée principalement dans les échantillons prélevés au printemps et en été puis dans quelques échantillons en automne, mais pas dans les échantillons collectés pendant la saison hivernale. L'analyse statistique montre qu'il existe une corrélation significative entre la température de l'eau et la présence de *C. jejuni* ( $r=0,620$ ;  $p=0,006$ ), mais pas avec les autres paramètres physico-chimiques ni même avec les indicateurs bactériens.

**Tableau 69: Concentration en campylobacters thermotolérants et distribution des espèces *C. coli* et *C. jejuni* dans la Moselle au niveau du site E sur la période de juin 2010 à mai 2011**

Date de prélèvement	Concentration en campylobacters thermotolérants (UFC/L)	Méthode de culture-qPCR	
		Concentration (UFC/L)	Espèces détectées ( <i>C. jejuni</i> / <i>C. coli</i> )
Juin 2010	C <1	NA	NA
Juillet 2010	C <1	10 ≤ C < 100	<i>C. jejuni</i>
Juillet 2010	1 ≤ C < 10	1 ≤ C < 10	<i>C. jejuni</i>
Août 2010	10 ≤ C < 100	C ≥ 100	<i>C. jejuni</i> / <i>C. coli</i>
Août 2010	10 ≤ C < 100	C ≥ 100	<i>C. jejuni</i> / <i>C. coli</i>
Septembre 2010	10 ≤ C < 100	10 ≤ C < 100	<i>C. jejuni</i> / <i>C. coli</i>
Septembre 2010	10 ≤ C < 100	10 ≤ C < 100	<i>C. jejuni</i> / <i>C. coli</i>
Octobre 2010	1 ≤ C < 10	1 ≤ C < 10	<i>C. coli</i>
Octobre 2010	1 ≤ C < 10	1 ≤ C < 10	<i>C. jejuni</i> / <i>C. coli</i>
Novembre 2010	10 ≤ C < 100	C ≥ 100	<i>C. coli</i>
Novembre 2010	1 ≤ C < 10	10 ≤ C < 100	<i>C. jejuni</i> / <i>C. coli</i>
Janvier 2011	C ≥ 100	C ≥ 100	<i>C. coli</i>
Janvier 2011	C <1	1 ≤ C < 10	<i>C. coli</i>
Février 2011	C ≥ 100	C ≥ 100	<i>C. coli</i>
Février 2011	C <1	1 ≤ C < 10	<i>C. coli</i>
Mars 2011	C <1	C <1	-
Mars 2011	10 ≤ C < 100	1 ≤ C < 10	<i>C. coli</i>
Avril 2011	C <1	C <1	-
Mai 2011	1 ≤ C < 10	1 ≤ C < 10	<i>C. jejuni</i> / <i>C. coli</i>
Mai 2011	1 ≤ C < 10	1 ≤ C < 10	<i>C. jejuni</i>

C = Concentration (UFC/L); NA = Non analysé

La recherche directe des espèces *C. jejuni* et *C. coli* par PCR en temps réel, sans passer par une étape préliminaire d'enrichissement, sur des volumes d'1 L d'eau de Moselle ou jusqu'à colmatage de la membrane, a permis de révéler la présence de l'espèce *C. jejuni* dans seulement un échantillon sur les 35 analysés et l'espèce *C. coli* dans deux échantillons seulement. Ces derniers résultats ne remettent pas en cause le nombre total d'échantillons positifs déterminés ci-dessus. En effet, l'impact des molécules environnementales co-concentrées avec les campylobacters sur l'efficacité de la méthode de détection sur chaque échantillon analysé est en moyenne de 49,6% (ET=34,3%) lorsque la PCR *C. jejuni* est employée et de 45,5% (ET=35,2%) pour la PCR *C. coli* avec des valeurs qui oscillent respectivement entre 1,4% et 99,99% et entre 5,4% et 99,99% (Figure 52).

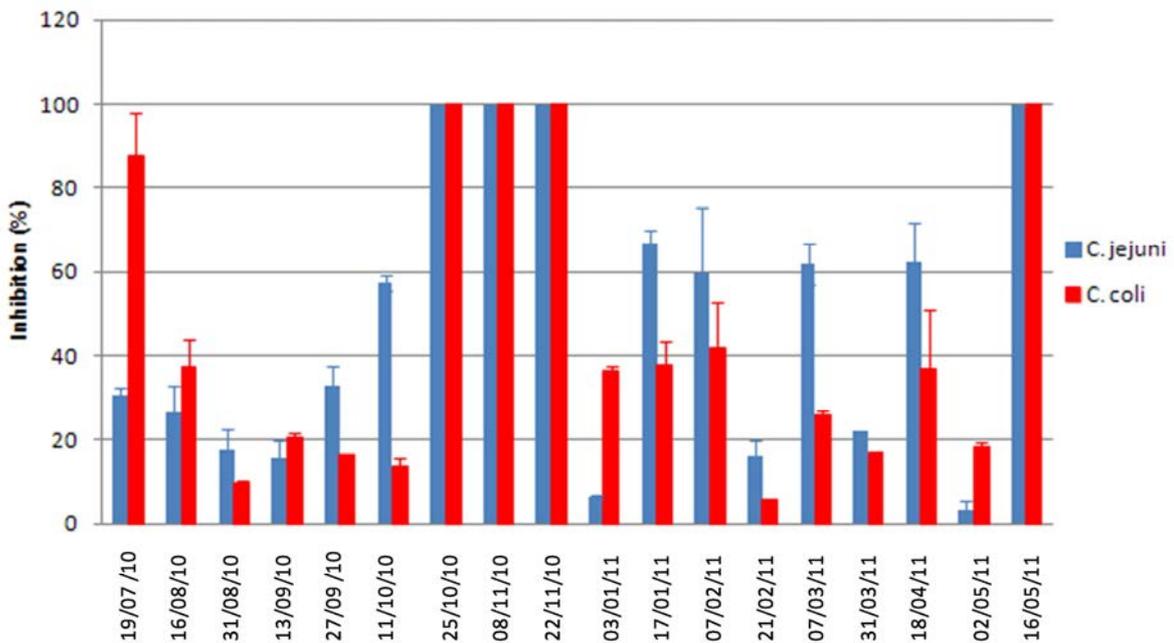


Figure 52: Inhibition des méthodes de détection (%) mesurée pour chaque échantillon d'eau de Moselle au cours de l'année d'étude

#### 2.1.4. Les adénovirus humains

Sur la période de juin 2010 à mai 2011, la recherche des adénovirus humains (sérotypes A à F) a été opérée sur des échantillons de 10 L d'eau de Moselle, analysés en duplicat pour chaque prélèvement. Sur l'ensemble de la période d'étude, 39 échantillons ont été analysés. Les virus ont été concentrés selon la méthode d'adsorption-élution sur laine de verre de manière à obtenir un volume final de 10 mL de concentrat. Les acides nucléiques des adénovirus ont été extraits à partir d'un aliquot de 5 mL et une analyse en PCR quantitative ciblant les adénovirus A à F a été réalisée pour effectuer un premier screening. Les quantités retrouvées ont été corrigées et ramenées au volume total traité (10 L) en tenant compte du rendement global de la méthode mais également de l'interférence des molécules environnementales, co-concentrées avec les virus, sur l'efficacité de la méthode de PCR en temps réel. Les analyses réalisées par PCR ont permis de mettre en évidence une contamination virale dans tous les échantillons collectés et analysés, avec des concentrations variables qui oscillent entre  $2,88 \times 10^3$  et  $1,3 \times 10^9$  copies de génomes/10 L. L'ensemble des résultats présentés sur la Figure 53, fait apparaître une courbe en cloche, avec des concentrations plus faibles retrouvées pendant la période estivale et des concentrations plus fortes retrouvées en période hivernale. L'analyse statistique confirme que la concentration en génome d'adénovirus humains est inversement corrélée à la température ( $r = -0,541$ ;  $p = 0,014$ ). Aucune autre corrélation n'a pu être mise en évidence entre la concentration en génome d'adénovirus humains et la concentration en indicateurs bactériens ou avec les autres paramètres physico-chimiques.

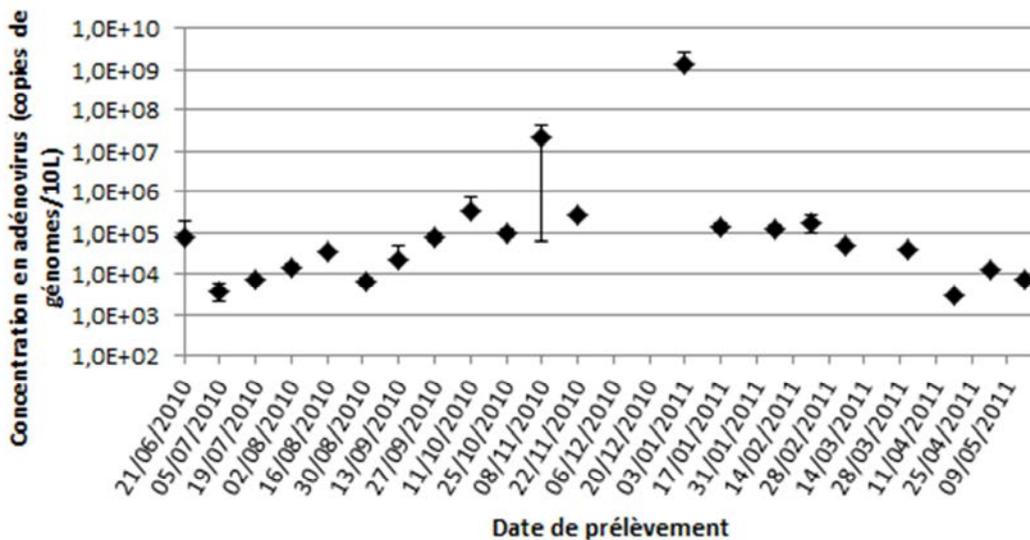
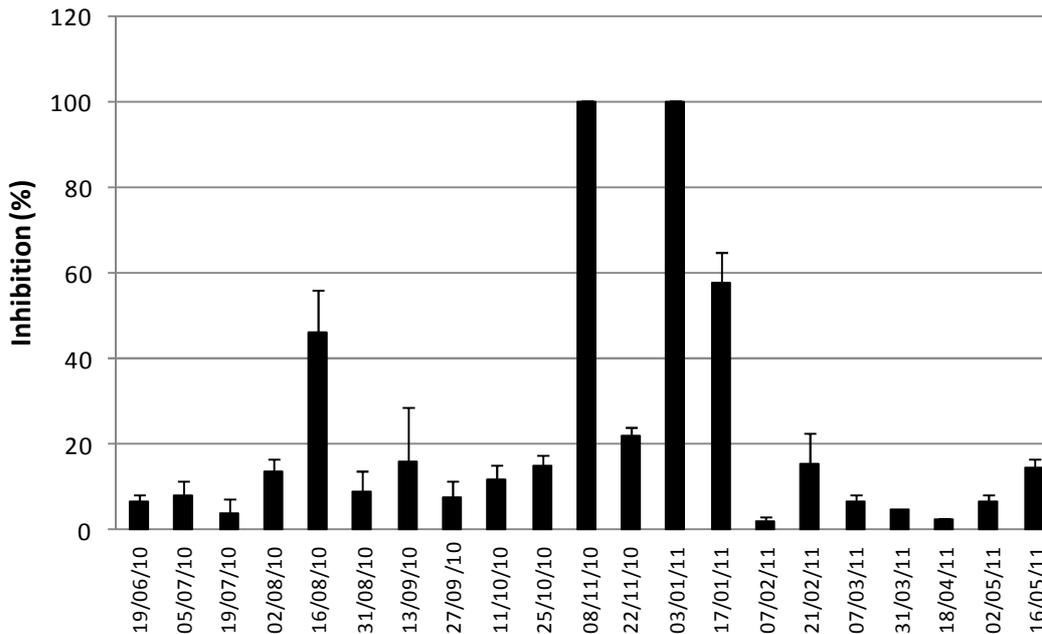


Figure 53: Evolution de la concentration moyenne en génome d'adénovirus humains dans la Moselle au niveau du site E entre juin 2010 et mai 2011

L'interférence des molécules environnementales sur la méthode de détection a été mesurée et s'élève en moyenne à 22,8% (ET=22,3%) avec des valeurs variant de 2,1% à 99,99% (Figure 54). Il est important de noter que les valeurs d'inhibition les plus fortes ont été observées dans les échantillons où la turbidité était la plus forte. En outre, il faut signaler que la prise en compte de ces données d'interférence sur le mode de calcul de la quantité de génome présente dans l'échantillon d'eau analysé induit automatiquement une incertitude plus importante sur la détermination de ces quantités.



**Figure 54: Inhibition de la méthode de détection par PCR en temps réel (%) mesurée pour chaque échantillon d'eau de Moselle entre juin 2010 et mai 2011**

A partir des extraits d'ADN obtenus à l'issue de la première série analytique ciblant les adénovirus A à F, il a été opéré une recherche systématique des adénovirus 40 et 41 à l'aide de la méthode de PCR HRM spécifiquement mise en place au laboratoire. Sur l'ensemble des échantillons analysés, la présence d'adénovirus F a été mise en évidence dans 92,7% des échantillons, tous les échantillons étant positifs en adénovirus 41 mais aucun en adénovirus 40.

Parallèlement, nous avons recherché à mettre en évidence le caractère infectieux des virus détectés dans les échantillons d'eaux contaminés. Pour cela nous avons employé la méthode d'ICC-PCR mise en place au laboratoire, et nous avons analysé tous les concentrats contaminés. Les résultats obtenus indiquent la présence d'adénovirus humains infectieux dans 10,3% des échantillons.

### 2.1.5. Les parasites *Cryptosporidium*

La présence des parasites *Cryptosporidium* a été déterminée à partir d'échantillons de 20 L d'eau de Moselle collectés entre juin 2010 et mai 2011 au niveau du point de captage. Pour chaque prélèvement, les parasites ont été concentrés selon la méthode normative NF T90-455 (AFNOR, 2001). Le concentrat final obtenu a été divisé en deux volumes égaux. Nous avons recherché, dans la première moitié du concentrat, la présence d'oocystes de *Cryptosporidium* spp. par immunofluorescence tel qu'il est mentionné dans la méthode normative. Dans la seconde fraction restante, la recherche de la présence de génome des espèces de *Cryptosporidium* pathogènes pour l'Homme à savoir *C. hominis*, *C. parvum* et *C. meleagridis*, a été systématiquement opérée à l'aide de la PCR en temps réel développée précédemment.

Sur les 21 échantillons analysés, la méthode de détection par immunofluorescence a permis de mettre en évidence la présence d'oocystes de *Cryptosporidium* spp. dans 9,5% des échantillons (soit 2/21) à des concentrations de 10,1 et 3,4 oocystes/20 L. Ces échantillons ont été retrouvés contaminés le 16/08/10 et le 07/02/11. Par PCR en temps réel, le génome des espèces de *Cryptosporidium* pathogènes pour l'Homme a été détecté dans 19,5% des échantillons (soit 4/21). Les échantillons positifs ont été prélevés le 16/08/10, le 27/09/10, le 11/10/10 et le 07/02/11. Parmi les quatre échantillons retrouvés positifs par PCR en temps réel, deux concernent les échantillons où la présence d'oocystes a été mise en évidence par immunofluorescence. L'altération de l'efficacité de la méthode a été mesurée pour chaque échantillon et s'élève en moyenne à 20,4% (ET=13%) (Figure 55).

Concernant la mise en évidence de la viabilité des parasites, compte tenu de la faible quantité d'oocystes retrouvée, il n'a pu être réalisé de recherche de la viabilité par la méthode développée d'EMA-PCR ou par immunofluorescence à l'aide de marqueur de viabilité.

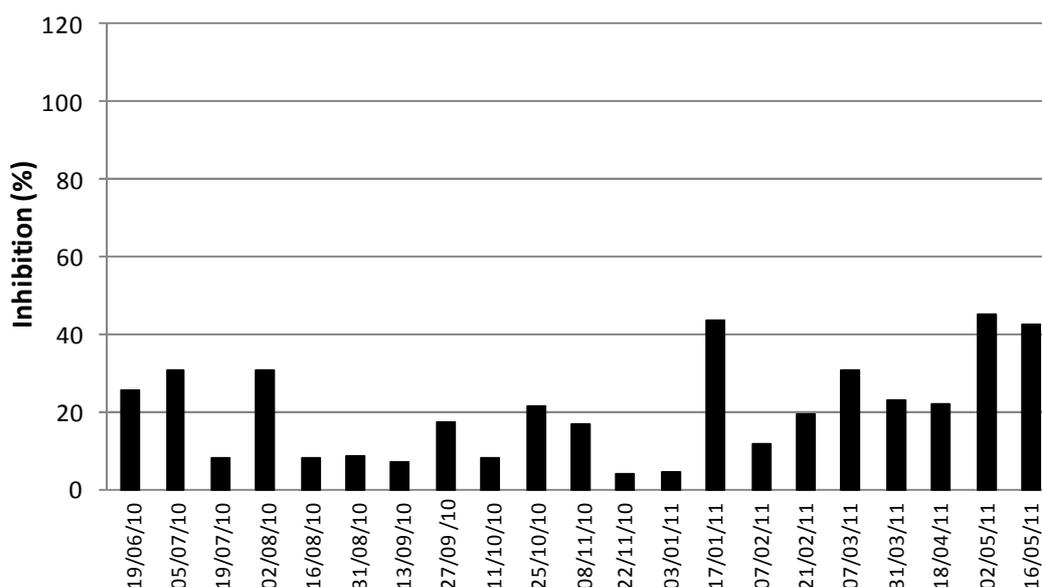


Figure 55: Inhibition de la méthode de détection par PCR en temps réel (%) mesurée pour chaque échantillon d'eau de Moselle entre juin 2010 et mai 2011

## 2.2. Pollution fécale de la Moselle au niveau des sites A, B, C, D, E, F, G et H

Cette étude a été réalisée en mars 2011. La collecte des échantillons a été opérée sur deux jours selon une approche amont-aval, du site A vers le site H.

### 2.2.1. Les paramètres physico-chimiques

Pour chaque site étudié, les paramètres physico-chimiques tels que la température, le pH, la turbidité, le COT ainsi que la conductivité de la Moselle ont été mesurés et les résultats sont présentés dans le Tableau 70. Pour l'ensemble des huit sites analysés, la température de l'eau varie de 11°C à 13,9°C. Pour la turbidité, les valeurs obtenues oscillent entre 2,06 NTU (site E) et 9,84 NTU (site F), sans qu'il soit constaté d'augmentation au cours de l'écoulement. En revanche pour le pH, le COT ainsi que de la conductivité, il est observé une augmentation au fur et à mesure de l'écoulement de la Moselle. Ainsi, au niveau du site A (le plus proche de la source), les valeurs de chaque paramètre sont respectivement de 6,9; 3,06 mg/L et 0,069 mS/cm alors qu'au niveau du site H (le plus éloigné de la source), les valeurs sont de 8,8; 4,02 mg/L et 0,467 mS/cm respectivement.

Tableau 70: Température, pH, turbidité, COT et conductivité mesurés dans la Moselle au niveau des huit sites

Sites	Température (°C)	Turbidité (NTU)	pH	COT (mg/L)	Conductivité (mS/cm)
A	13,9	6,09	6,89	3,06	0,069
B	11	5,65	7,2	3,12	0,145
C	11	5,25	7,85	3,38	0,295
D	12,9	2,31	8,89	3,32	0,321
E	12	2,06	8,4	3,4	0,292
F	11,5	9,84	8,45	3,61	0,481
G	13,5	6,17	8,37	3,63	0,481
H	13,9	8,56	8,77	4,02	0,467

### 2.2.2. Les indicateurs bactériens de contamination fécale

Sur les 8 sites analysés, il a été retrouvé des bactéries *E. coli* et des entérocoques au niveau de 7 sites sur les 8 étudiés. Les concentrations mesurées sont présentées sur la Figure 56. Les plus fortes concentrations ont été observées au niveau du site A, avec des concentrations respectives en *E. coli* et en Entérocoques de  $2,1 \times 10^4$  NPP/100 mL et  $3,7 \times 10^3$  NPP/100 mL.

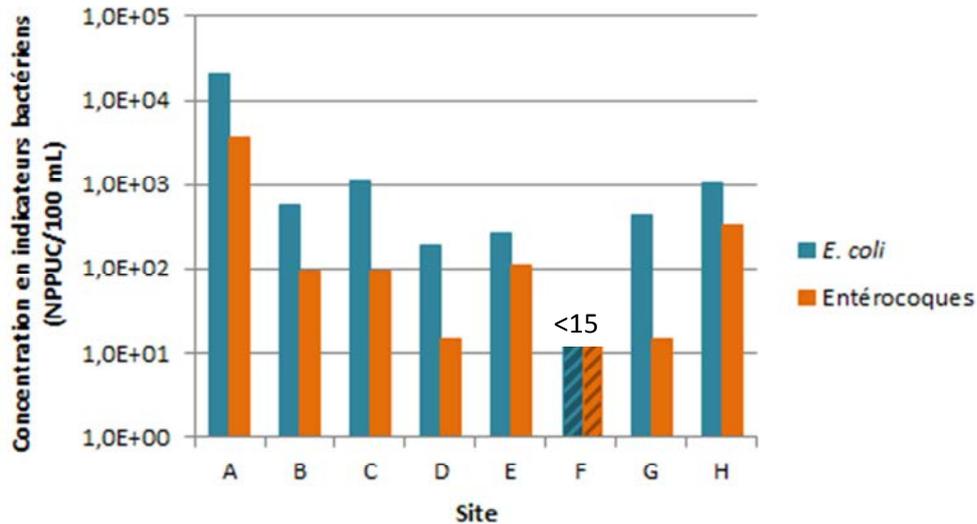


Figure 56: Concentration en *E. coli* et en Entérocoques (NPP/100 mL) mesurée dans la Moselle au niveau des huit sites en mars 2011

### 2.2.3. *Campylobacter*

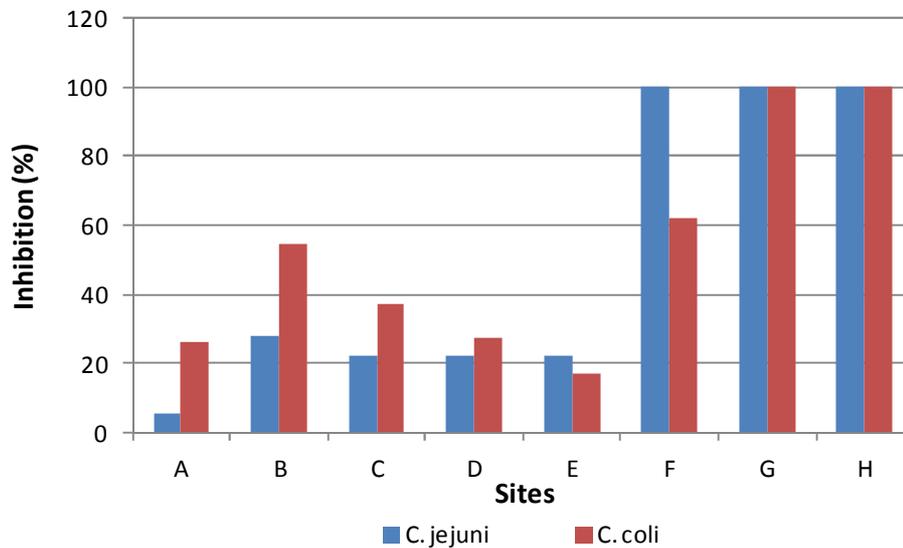
L'utilisation de la méthode de culture normative ISO 17995 (2005) a permis de mettre en évidence la présence de campylobacters thermotolérants au niveau de tous les sites étudiés à des concentrations différentes (Tableau 71). La concentration la plus élevée a été mesurée sur le site G ( $C \geq 100$  UFC/L).

Avec la méthode de culture-PCR, l'espèce *C. jejuni* a été détectée au niveau de deux sites (sites A et G) et l'espèce *C. coli* au niveau de 5 sites (sites B, E, F, G et H), sur les 8 sites étudiés. Il est intéressant de noter que pour deux échantillons collectés, respectivement au niveau du site C et du site D, des campylobacters thermotolérants autres que *C. jejuni* et *C. coli* ont été détectés. Ces campylobacters thermotolérants détectés au niveau de ces deux sites n'appartenant ni à l'espèce *C. jejuni*, ni à l'espèce *C. coli* (résultats négatifs en PCR), ne peuvent qu'appartenir à l'espèce *C. lari* (ou éventuellement *C. upsaliensis*).

**Tableau 71: Concentrations en campylobacters mesurées par la norme ISO 17995 (2005) et la méthode couplée de culture-PCR dans la Moselle au niveau des huit sites d'étude en mars 2011**

Sites	Concentration en campylobacter thermotolérants (UFC/L)	culture -PCR	
		UFC/L	<i>C.jejuni</i> / <i>C. Coli</i>
A	10 ≤ C < 100	10 ≤ C < 100	<i>C. jejuni</i>
B	10 ≤ C < 100	10 ≤ C < 100	<i>C. coli</i>
C	10 ≤ C < 100	C < 1	Campylobacters autres
D	1 ≤ C < 10	C < 1	Campylobacters autres
E	10 ≤ C < 100	1 ≤ C < 10	<i>C. coli</i>
F	10 ≤ C < 100	10 ≤ C < 100	<i>C. coli</i>
G	C ≥ 100	C ≥ 100	<i>C. jejuni</i> / <i>C. coli</i>
H	10 ≤ C < 100	10 ≤ C < 100	<i>C. coli</i>

Sur les huit sites analysés, les analyses effectuées par PCR en temps réel, sans étape de culture, n'ont pas permis de mettre en évidence la présence de génome de *C. jejuni* et/ou *C. coli*. Parallèlement à ces analyses, l'altération de l'efficacité de la méthode de PCR *C. jejuni* a été mesurée entre 5,8% et 99,9% et celle de la méthode de PCR *C. coli* a été mesurée entre 17,1% et 99,99% (Figure 57).



**Figure 57: Inhibition des méthodes de détection par PCR en temps réel (%) mesurée dans la Moselle au niveau des huit sites d'étude en mars 2011**

#### 2.2.4. Les adénovirus humains

Les résultats concernant la détection des adénovirus humains sur les huit sites d'étude sont résumés dans le Tableau 72. Il s'avère que tous les sites sont contaminés en adénovirus humains avec des concentrations qui oscillent entre  $8,9 \times 10^3$  et  $3,9 \times 10^4$  copies de génome/10 L. L'altération de l'efficacité de la méthode de PCR en temps réel mesurée pour chaque échantillon est faible puisqu'elle est en moyenne de 2,6% (ET=1,2%).

La présence d'adénovirus entériques (adénovirus F) a été mise en évidence dans tous les échantillons, mais aucun des adénovirus isolés ne s'est révélé infectieux par la méthode d'ICC-PCR avec le système cellulaire A549.

**Tableau 72: Synthèse des résultats obtenus pour les adénovirus humains, dans les échantillons d'eau Moselle au niveau des huit sites en mars 2011**

Sites	Détection par PCR en temps réel			Infectiosité mesurée par ICC-PCR (cellules A549)
	Adénovirus A à F	Adénovirus F (sérotypes 40-41)	Concentration en adénovirus humains (copies de génome/10L)	
A	+	+	$8,9 \times 10^3$	-
B	+	+	$1,5 \times 10^4$	-
C	+	+	$1,6 \times 10^4$	-
D	+	+	$1,9 \times 10^4$	-
E	+	+	$3,9 \times 10^4$	-
F	+	+	$1,6 \times 10^4$	-
G	+	+	$1,1 \times 10^4$	-
H	+	+	$3,2 \times 10^4$	-

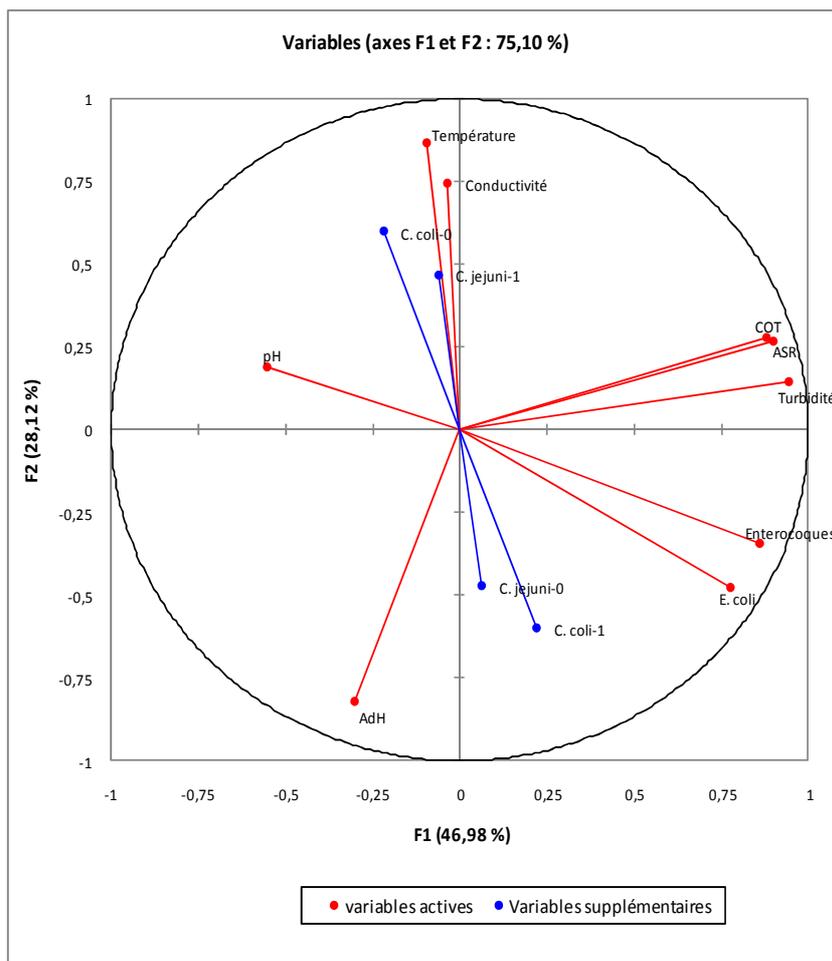
+: positif; -: négatif

#### 2.2.5. *Cryptosporidium*

Sur l'ensemble des huit sites analysés au cours de cette étude, aucun échantillon ne s'est révélé positif en parasite *Cryptosporidium*, aussi bien par immunofluorescence que par PCR en temps réel. La méthode de PCR n'a été que très peu altérée puisque l'inhibition moyenne mesurée est de 8,5% (ET=4%), avec des valeurs qui oscillent entre 4,1% et 15,3%.

### 2.2.6. Corrélations entre les paramètres physico-chimiques, les indicateurs bactériens et les micro-organismes d'intérêt dans la Moselle

Une analyse en composante principale (ACP) a été réalisée pour analyser des corrélations entre l'ensemble des résultats concernant les paramètres microbiologiques et les paramètres physico-chimiques (Figure 58). En raison d'une faible proportion d'échantillons positifs, les résultats concernant la détection des *Cryptosporidium* par immunofluorescence ou par PCR en temps réel n'ont pas été pris en compte dans l'analyse statistique.



**Figure 58: Analyse en composante principale des paramètres microbiologiques et physico-chimiques; projection des variables sur un plan factoriel à deux dimensions**

Dans une ACP, chaque paramètre est représenté par une variable. Les variables ont été représentées dans un système d'axes factoriels à deux dimensions appelé cercle de corrélation, défini par deux facteurs (Figure 58). Les deux facteurs retenus ont permis de traiter 74,1% de l'information initiale sachant que la variabilité expliquée par le premier et le deuxième sont respectivement de 46,98% et 28,21%.

Parmi l'ensemble des variables projetées sur le cercle, celles qui sont situées proche de l'origine, comme le pH et la présence de *C. coli* ou de *C. jejuni*, sont mal représentées sur le plan factoriel ce qui rend toute conclusion hasardeuse si ces dernières sont basées exclusivement sur le cercle de corrélation.

Pour les autres variables, il semblerait que le premier axe factoriel (F1) soit positivement corrélé aux indicateurs bactériens, au COT et à la turbidité, alors que le second axe factoriel (F2) semble positivement corrélé à la température, à la conductivité et aux adénovirus humains. L'angle formé entre les indicateurs bactériens et les adénovirus humains étant perpendiculaire, il semblerait que ces variables soient indépendantes.

La matrice de corrélation (Tableau 73) a permis de confirmer les tendances illustrées sur le cercle de corrélation. Tout d'abord, les variables représentées par l'axe F1 montrent qu'elles sont toutes corrélées entre elles ( $p < 0,05$ ). Les plus fortes corrélations sont obtenues entre le COT et la turbidité ( $r=0,872$ ,  $p < 0,0001$ ), la concentration en *E. coli* et celle en Entérocoques ( $r=0,838$ ;  $p < 0,0001$ ), suivie par la turbidité et la concentration en spores de bactéries ASR ( $r=0,838$ ;  $p < 0,0001$ ), la turbidité et la concentration en Entérocoques ( $r=0,777$ ;  $p=0,0001$ ). La concentration en génome d'adénovirus humains est négativement corrélée à la température ( $r=-0,576$ ;  $p=0,012$ ) et au COT ( $r=-0,569$ ;  $p=0,018$ ) mais positivement corrélée à la présence de *Campylobacter coli* ( $r=0,611$ ). D'ailleurs concernant la présence de l'espèce *C. coli* et l'espèce *C. jejuni*, elles sont toutes les deux corrélées à la température, toutefois la présence de *C. coli* est négativement corrélée à la température ( $r=-0,481$ ;  $p=0,043$ ) alors qu'au contraire, celle de *C. jejuni* est positivement corrélée ( $r=0,620$ ;  $p=0,006$ ).

Tableau 73: Matrice de corrélation (coefficient de corrélation de Pearson)

Variables	Température	Turbidité	pH	COT	Conductivité	<i>E. coli</i>	Entérocoques	ASR	adénovirus humains	Présence de <i>C. coli</i>	Présence de <i>C. jejuni</i>
Température	<b>1</b>										
Turbidité	-0,008	<b>1</b>									
pH	0,084	-0,439	<b>1</b>								
COT	0,153	<b>0,872</b>	-0,320	<b>1</b>							
Conductivité	<b>0,604</b>	0,147	0,149	0,030	<b>1</b>						
<i>E. coli</i>	-0,388	<b>0,658</b>	-0,465	<b>0,498</b>	-0,293	<b>1</b>					
Entérocoques	-0,392	<b>0,777</b>	-0,324	<b>0,663</b>	-0,210	<b>0,838</b>	<b>1</b>				
ASR	0,107	<b>0,838</b>	<b>-0,498</b>	<b>0,818</b>	0,181	<b>0,548</b>	<b>0,657</b>	<b>1</b>			
adénovirus humains	<b>-0,576</b>	-0,380	-0,073	<b>-0,549</b>	-0,366	0,225	0,051	<b>-0,500</b>	<b>1</b>		
Présence de <i>C. coli</i>	<b>-0,481</b>	0,238	<b>-0,475</b>	0,011	-0,303	0,444	0,287	-0,036	<b>0,611</b>	<b>1</b>	
Présence de <i>C. jejuni</i>	<b>0,620</b>	-0,117	-0,395	0,014	0,260	-0,298	-0,394	0,193	-0,265	-0,158	<b>1</b>

Les coefficients de corrélation en gras sont significatifs à 5%.

### 3. CONCENTRATION DES PATHOGENES CIBLES DANS LES NAPPES ALLUVIALES

#### 3.1. Pollution fécale de la nappe alluviale au niveau du site E

Au niveau du site E, 20 campagnes de prélèvements d'eau de nappe ont été réalisées au niveau du point de captage sur la période d'étude de juin 2010 à mai 2011. Les résultats concernant les paramètres physico-chimiques et microbiologiques tels que les indicateurs bactériens, les campylobacters, les adénovirus humains ainsi que les parasites *Cryptosporidium*, sont présentés ci-dessous.

##### 3.1.1. Les paramètres physico-chimiques

Sur la période de juin 2010 à mai 2011, la température de la nappe alluviale a varié de 7,9°C à 16,1°C avec des valeurs qui restent constantes du printemps à l'automne (entre 11°C et 16,1°C) mais qui diminuent en hiver jusqu'à 7,9°C.

La turbidité de l'eau est faible et stable au cours du temps, avec une moyenne de 0,1 NTU (ET=0,1 NTU). Le pH, le COT et la conductivité varient peu sur la période d'étude. Les valeurs moyennes mesurées pour chacun des paramètres sont respectivement 7,1 (ET=0,21); 2 mg/L (ET=0,27 mg/L) et 0,6 mS/cm (ET=0,05 mS/cm) (Tableau 74).

**Tableau 74: Synthèse des mesures de température, turbidité, pH, COT et conductivité obtenues dans la nappe alluviale au niveau du site E durant l'année d'étude**

	Moyenne	Ecart type	Minimum	Maximum
Température (°C)	12,7	2,5	7,9	16,1
Turbidité (NTU)	0,1	0,1	0,001	0,36
pH	7,1	0,21	6,84	7,66
COT (mg/L)	2	0,27	1,61	2,55
Conductivité (mS/cm)	0,6	0,05	0,47	0,66

### 3.1.2. Les indicateurs de contamination fécale et ASR

Sur les 20 prélèvements effectués dans la nappe alluviale au niveau du site de E entre juin 2010 et mai 2011, les analyses microbiologiques n'ont pu mettre en évidence la présence d'*E. coli* ou d'Entérocoques. Toutefois, trois échantillons se sont avérés contaminés par les spores de bactéries ASR à une concentration d'1 UFC/100 mL (échantillons du 03/01/11, 17/01/11, 18/04/11).

### 3.1.3. *Campylobacter*

Sur les 20 prélèvements effectués sur la période de juin 2010 à mai 2011 au niveau du site E, il n'a pas été détecté de campylobacter thermotolérant dans les échantillons analysés lorsque la norme ISO 17995 (2005) est employée (Tableau 75). En revanche l'utilisation de la méthode couplée de culture-PCR a révélé la présence de *C. jejuni* dans 10,5% des échantillons (2/19) à une concentration de  $1 \leq C < 10$  UFC/L. Ces échantillons ont été collectés le 19/07/10 et le 16/08/10. Il apparaît donc que des résultats faussement négatifs ont été rendus par la méthode normative ISO 17995 pour deux échantillons. Parallèlement à ces analyses, étant donné la qualité physico-chimique de l'eau de nappe, la turbidité faible et stable au cours du temps, nous avons décidé d'augmenter en cours de campagne le volume analytique afin d'améliorer la probabilité de détection des campylobacters. Des analyses complémentaires sur des échantillons de 20 L d'eau de nappe ont ainsi été réalisées par culture selon la norme ISO 17995 (2005) et par culture-PCR. Sur les 17 échantillons analysés, aucun échantillon analysé ne s'est révélé contaminé en campylobacter thermotolérant lorsque ces deux méthodes ont été employées sur de tels volumes (20 L).

Une recherche directe de campylobacters dans l'eau de nappe, sans passer par une étape de culture, a été systématiquement opérée conjointement par PCR temps réel sur des échantillons de 20 L prélevés lors des campagnes. Pour chaque prélèvement dédié à ces analyses, les analyses ont été réalisées en duplicat. Sur l'ensemble des 37 échantillons, 21,6% (8/36) se sont révélés positifs pour au moins une des deux espèces recherchées. L'espèce *C. coli* a été détectée dans 13,5% (5/37) des échantillons à des concentrations qui oscillent entre  $1,8 \times 10^2$  et  $3,4 \times 10^4$  copies de génome/20 L alors que l'espèce *C. jejuni* a été détectée dans 10,8% (4/37) des échantillons à des concentrations comprises entre  $1,6 \times 10^4$  et  $9 \times 10^4$  copies de génome/20 L. Une contamination simultanée par les deux espèces a été mise en évidence dans un seul échantillon. Aucun indicateur de contamination fécale n'a été retrouvé dans les échantillons positifs en campylobacters.

Niveau de contamination fécale des milieux hydriques par les micro-organismes d'intérêt

Tableau 75: Synthèse des résultats de détection des campylobacters par la méthode normalisée ISO 17995, la méthode de culture-PCR et la méthode de PCR en temps réel, dans les échantillons de la nappe alluviale prélevée au niveau du site E durant l'année d'étude

Date de prélèvement	Culture (norme ISO 17995) UFC/L	Culture-qPCR	PCR (copies de génome/20L)	
		<i>C. jejuni</i> / <i>C. coli</i>	<i>C. jejuni</i>	<i>C. coli</i>
Juin-10	C < 1	NA	NA	NA
Juil-10	C < 1	-	-	1,4x10 <sup>3</sup>
Juil-10	C < 1	<i>C. jejuni</i> (1 ≤ C < 10)	- 9x10 <sup>4</sup>	3,4x10 <sup>3</sup> 2,1x10 <sup>3</sup>
Août-10	C < 1	<i>C. jejuni</i> (1 ≤ C < 10)	1,6x10 <sup>4</sup> -	- -
Août-10	C < 1	-	- -	- -
Sept-10	C < 1	-	1,6x10 <sup>4</sup> -	- -
Sept-10	C < 1	-	- -	- -
Oct-10	C < 1	-	- -	1,8x10 <sup>2</sup> 2,3x10 <sup>2</sup>
Oct-10	C < 1	-	- -	- -
Nov-10	C < 1	-	- -	- -
Nov-10	C < 1	-	- -	- -
Janv-11	C < 1	-	- -	- -
Janv-11	C < 1	-	- -	- -
Févr-11	C < 1	-	- -	- -
Févr-11	C < 1	-	- -	- -
Mars-11	C < 1	-	- 4,4x10 <sup>4</sup>	- -
Mars-11	C < 1	-	- -	- -
Avr-11	C < 1	-	- -	- -
Mai-11	C < 1	-	- -	- -
Mai-11	C < 1	-	- -	- -

Pour chaque échantillon analysé, l'impact des molécules co-concentrées en même temps que les bactéries sur les méthodes de PCR en temps réel a été estimé. Une altération moyenne de l'efficacité de la PCR *C. jejuni* de 18,1% (ET=14,4%) avec des valeurs qui oscillent entre 0,5% et 80,2% a été relevée. Pour la PCR *C. coli*, l'interférence oscille entre 3,1% et 99,9%, avec une moyenne située à 22,7% (ET=23,3%) (Figure 59).

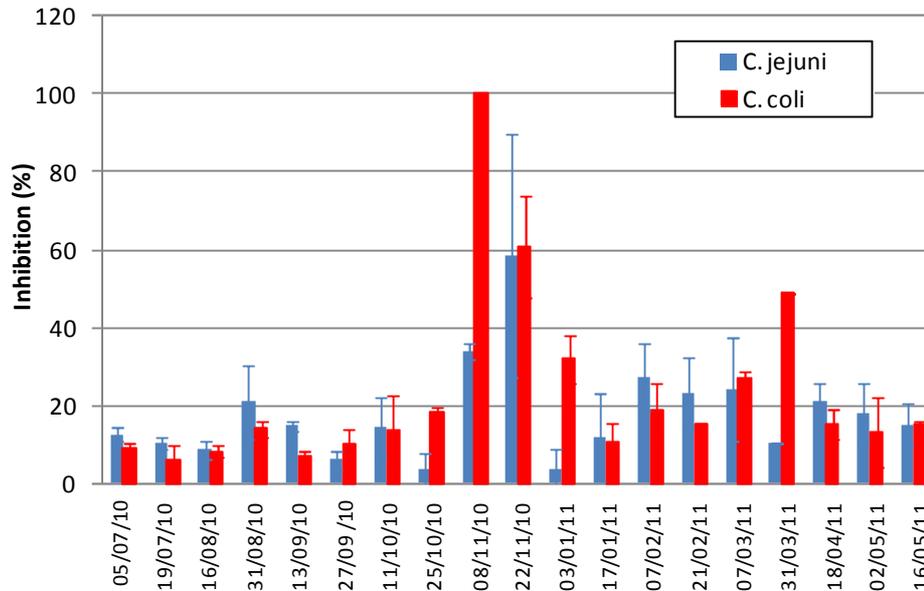


Figure 59: Inhibition des méthodes de détection par PCR en temps réel (%) mesurée pour chaque prélèvement d'eau de nappe du site E entre juin 2010 et mai 2011 (n=2)

### 3.1.4. Les adénovirus humains

La recherche des adénovirus humains a été opérée en duplicat lors des 20 campagnes de prélèvements d'eau de nappe (n= 37). Les résultats sont présentés dans le Tableau 76.

Au début de l'étude, la recherche de virus a été réalisée sur des échantillons de 10 L d'eau de nappe. Sur les huit échantillons collectés lors de la période de juin 2010 à août 2010, les résultats de la PCR en temps réel ont révélé la présence d'adénovirus A à F dans 37,5% (3/8). L'utilisation de la méthode de PCR HRM a permis de mettre en évidence la présence d'adénovirus de type 41 dans un des trois échantillons contaminés. Les analyses d'ICC-PCR n'ont pas révélées la présence de virus infectieux.

Étant donné la qualité physico-chimique de la nappe alluviale, nous avons décidé d'augmenter le volume analytique à 50 L afin d'améliorer la probabilité de déceler ces virus dans cette nappe. Sur la période d'août 2010 à mai 2011, 29 échantillons ont été analysés par PCR temps réel et seulement 13,8% (4/29) d'entre eux se sont avérés contaminés en adénovirus humains. L'utilisation de la PCR HRM a montré la présence d'adénovirus entériques dans la moitié des échantillons positifs en adénovirus humains (A à F) (2/4). Aucun virus infectieux n'a été mis en évidence lors de l'utilisation de la méthode d'ICC-PCR.

Par conséquent, sur la période étudiée, quel que soit le volume analysé, il apparaît que 18,9% des échantillons analysés (7/37) contenaient des adénovirus humains, et seulement 3 échantillons (8,1%) étaient contaminés par des adénovirus entériques. Aucun indicateur de contamination fécale n'a été détecté dans les échantillons retrouvés positifs en adénovirus humains. L'altération de l'efficacité de la méthode de détection s'est révélée faible puisqu'elle oscille entre 0,1% et 10,8% avec une moyenne de 3,4% (ET=2,9%) dans les échantillons d'10 L et entre 0% et 16,4% avec une moyenne de 5,2% (ET=4,5%) dans les échantillons de 50 L d'eau de nappe. Tenant compte du rendement de concentration de la méthode et de l'interférence de la méthode, les quantités estimées dans chaque échantillon contaminé ont varié entre  $7 \times 10^2$  copies de génome/ 50 L et  $1,8 \times 10^4$  copies de génome/10 L.

Niveau de contamination fécale des milieux hydriques par les micro-organismes d'intérêt

Tableau 76: Synthèse des résultats obtenus pour les adénovirus humains dans les échantillons d'eau de nappe alluviale au niveau du site E durant l'année d'étude

Date de prélèvement	Détection par PCR en temps réel		Infectiosité par ICC-PCR (cellules A549)
	Adénovirus A-F (copies de génomes/10L ou 50L)	Adénovirus entériques (séro groupe F)	
Juin-10	1,7 x 10 <sup>4</sup> /10 L	-	-
	1,8 x 10 <sup>4</sup> /10 L	-	-
Juil-10	-	-	-
	-	-	-
Juil-10	2,4 x 10 <sup>3</sup> /10 L	+ (Ad 41)	-
	-	-	-
Août-10	-	-	-
	-	-	-
Août-10	-	-	-
Sept-10	-	-	-
	-	-	-
Sept-10	-	-	-
Oct-10	-	-	-
	-	-	-
Oct-10	7 x 10 <sup>2</sup> /50 L	-	-
	-	-	-
Nov-10	-	-	-
	9,1 x 10 <sup>2</sup> /50 L	+ (Ad 41)	-
Nov-10	4,2 x 10 <sup>3</sup> /50 L	+ (Ad 41)	-
	1,2 x 10 <sup>3</sup> /50 L	-	-
	-	-	-
Janv-11	-	-	-
	-	-	-
Janv-11	-	-	-
	-	-	-
Févr-11	-	-	-
	-	-	-
Févr-11	-	-	-
	-	-	-
Mars-11	-	-	-
	-	-	-
Mars-11	-	-	-
	-	-	-
Avr-11	-	-	-
	-	-	-
Mai-11	-	-	-
	-	-	-
Mai-11	-	-	-
	-	-	-

### 3.1.5. *Cryptosporidium*

Sur les 20 prélèvements effectués dans la nappe alluviale au niveau du site E, aucun échantillon ne s'est avéré positif en oocystes de *Cryptosporidium* spp. par immunofluorescence. De même, aucun génome de *Cryptosporidium* pathogènes pour l'Homme n'a été détecté par PCR en temps réel. L'efficacité de la PCR a été peu altérée lors de ces dernières analyses puisque des valeurs d'inhibition comprises entre 1,3% et 36,6% ont été mesurées, avec une moyenne située à 15,4% (ET=9,7%).

## 3.2. Pollution fécale de la nappe alluviale au niveau des sites A, B, C, E, G et H.

Cette étude a été réalisée en mars 2011. La collecte des échantillons a été opérée sur deux jours selon une approche amont-aval, du site A vers le site H. Rappelons que les sites D et F ne captent pas l'eau brute dans une nappe alluviale et par conséquent ne sont pas inclus dans cette étude. Les résultats des analyses physico-chimiques et microbiologiques réalisées lors de cette campagne sont présentés ci-dessous.

### 3.2.1. Paramètres physico-chimiques

Les valeurs des paramètres physico-chimiques mesurés au cours de cette étude sont résumées dans le Tableau 77. Au niveau des six sites étudiés, la température moyenne de l'eau était de 11,5°C (ET=2,1°C). La turbidité a très peu varié d'un site à l'autre puisque les valeurs ont oscillé entre 0,02 NTU et 0,15 NTU. Comme pour la Moselle, il est observé que le pH et la conductivité augmentent au fur et à mesure que l'on s'éloigne de la source de la Moselle avec des valeurs de pH et de conductivité mesurées au niveau du site A (site le plus proche de la source) respectivement de 6,08 et 0,114 mS/cm, et au niveau du site H (site le plus éloigné de la source), des valeurs de 7,41 et 0,621 mS/cm, respectivement. Concernant le COT, les mesures ont varié de 0,67 mg/L à 2,17mg/L avec la valeur la plus forte observée au niveau du site E.

**Tableau 77: Synthèse des valeurs de température, turbidité, pH, COT, et conductivité mesurées dans les nappes alluviales des différents sites en mars 2011**

Sites	Température (°C)	Turbidité (NTU)	pH	COT (mg/L)	Conductivité (mS/cm)
A	13,9	0,04	6,08	0,67	0,114
B	10	0,12	6,4	1,19	0,209
C	9	0,02	6,98	1,4	0,4
E	10	0,15	6,95	2,17	0,546
G	12,3	0,02	7,57	1,95	0,553
H	13,8	0,05	7,41	1,75	0,621

### 3.2.2. Les indicateurs de contamination fécale

Les analyses microbiologiques réalisées sur les six sites d'étude n'ont pas révélé la présence d'indicateurs de contamination fécale (*E. coli*, Entérocoques).

### 3.2.3. *Campylobacter*

Les analyses réalisées par culture selon la méthode normative ISO 17995 (2005), sur des échantillons d'1 L d'eau de nappe n'ont pas permis de mettre en évidence la présence de campylobacter, même lorsque la méthode a été couplée à la technique de PCR en temps réel.

Dans les échantillons de 20 L d'eau de nappe analysés directement par PCR temps réel sans passer par une étape de culture, le génome de *C. jejuni* ou *C. coli* n'a pas été détecté. Cette absence de détection ne peut être attribuée à une éventuelle inhibition de la méthode de détection puisque celle-ci ne s'élève qu'à 16,2% (ET=7,7 %) pour la PCR *C. jejuni* et 13,7% (ET=6,5%) pour la PCR *C. coli* (Figure 60).

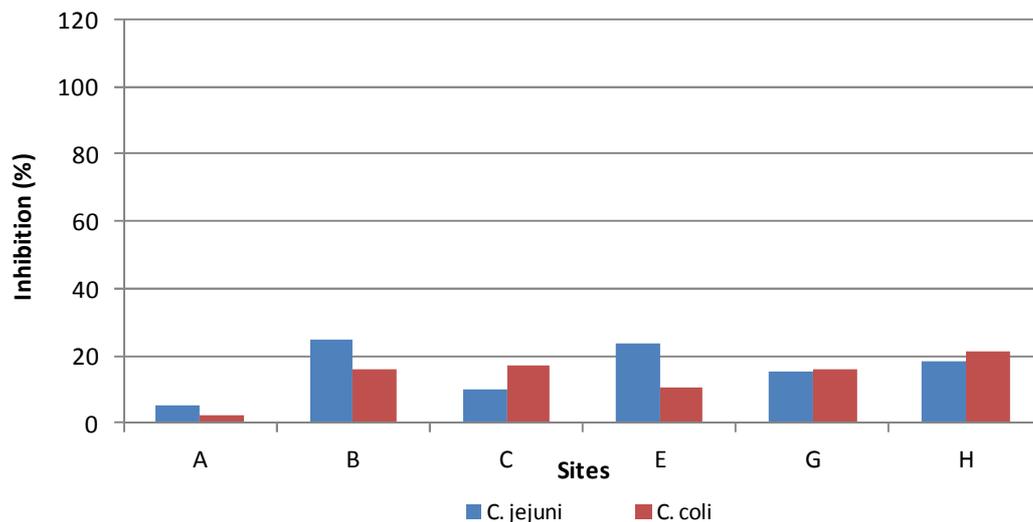


Figure 60: Inhibition de la méthode de détection par PCR en temps réel (%) mesurée pour chaque prélèvement sur les différents sites d'étude en mars 2011

### 3.2.4. Les adénovirus humains

La présence d'adénovirus humains a été détectée dans la nappe alluviale qu'au niveau du site H, qui, pour rappel, est le site le plus éloigné de la source, avec une concentration estimée à  $9,5 \times 10^3$  copies de génome/50 L. Aucun adénovirus de type 40 ou 41 n'a été détecté dans cet échantillon. De même, il n'a pas été décelé de virus infectieux à l'aide de la méthode d'ICC-PCR sur les cellules A549. L'altération de l'efficacité de la méthode de détection par PCR en temps réel a été mesurée pour chaque échantillon et s'élève seulement à 3,5% en moyenne (ET=1,4%).

### 3.2.5. *Cryptosporidium*

Les analyses réalisées sur les six échantillons de 20 L d'eau de nappe n'ont pas permis de mettre en évidence la présence de *Cryptosporidium*, aussi bien par immunofluorescence que par PCR en temps réel. L'absence de résultats positifs ne peut être attribuée à une éventuelle altération de la méthode de détection par PCR en temps réel puisque celle-ci ne s'élève qu'à 2,6% (ET=1,2%) en moyenne sur l'ensemble des six échantillons analysés.

Dans la nappe alluviale, au niveau du site E ou sur les différents sites, le faible nombre d'échantillons présentant une contamination microbiologique ne nous a permis de mettre en évidence de corrélation.

## 4. CONCENTRATION DES PATHOGENES CIBLES DANS L'EAU TRAITEE

### 4.1. Pollution fécale dans l'eau traitée au niveau du site E

La recherche des différents micro-organismes ainsi que les analyses physico-chimiques réalisées ont été opérées dans l'eau traitée en sortie de station de potabilisation du site E.

Au total 19 prélèvements ont été réalisés sur la période de juin 2010 à mai 2011. La production d'eau potable est réalisée à partir d'un mélange d'eau de la Moselle traitée et de nappe alluviale. La proportion de ces deux ressources est variable en fonction de différents paramètres tels que la qualité physico-chimiques de la Moselle et le volume d'eau de nappe disponible dans les puits (Figure 61). Ainsi, sur la période d'étude, la proportion moyenne d'eau de Moselle était de 70% et celle de la nappe de 30%, mais les proportions ont varié de 0% à 100% (100% d'eau de Moselle le 08/11/10 et le 21/02/11, et 100% d'eau de nappe le 03/01/11).

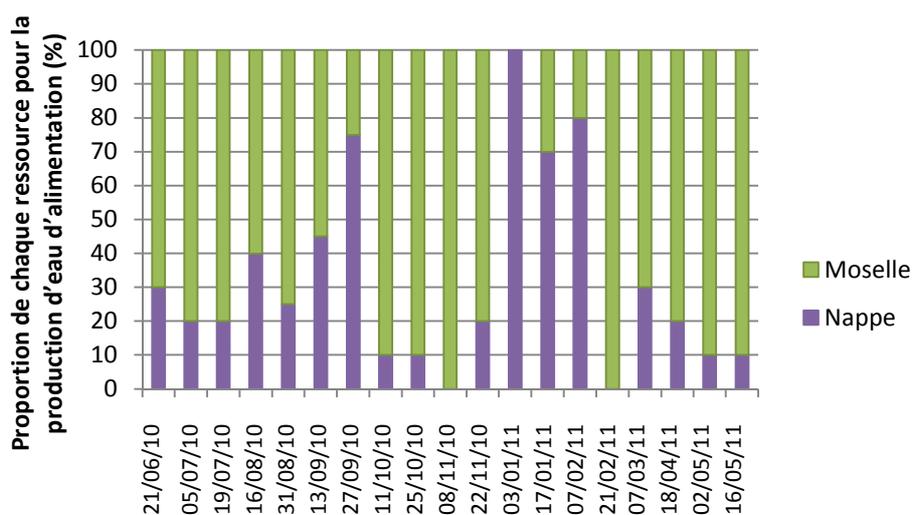


Figure 61: Proportion d'eau de rivière (Moselle) et d'eau de nappe employées par la station du site E pour la production d'eau potable

4.1.1. Les paramètres physico-chimiques

Les résultats concernant le suivi de la température de l'eau, la turbidité, le pH, le COT, la conductivité ainsi que la teneur en chlore libre et total sont présentés paramètre par paramètre sur les Figures 62, 63, 64, 65 et 66; et une synthèse des résultats pour l'ensemble des paramètres est présentée dans le Tableau 78.

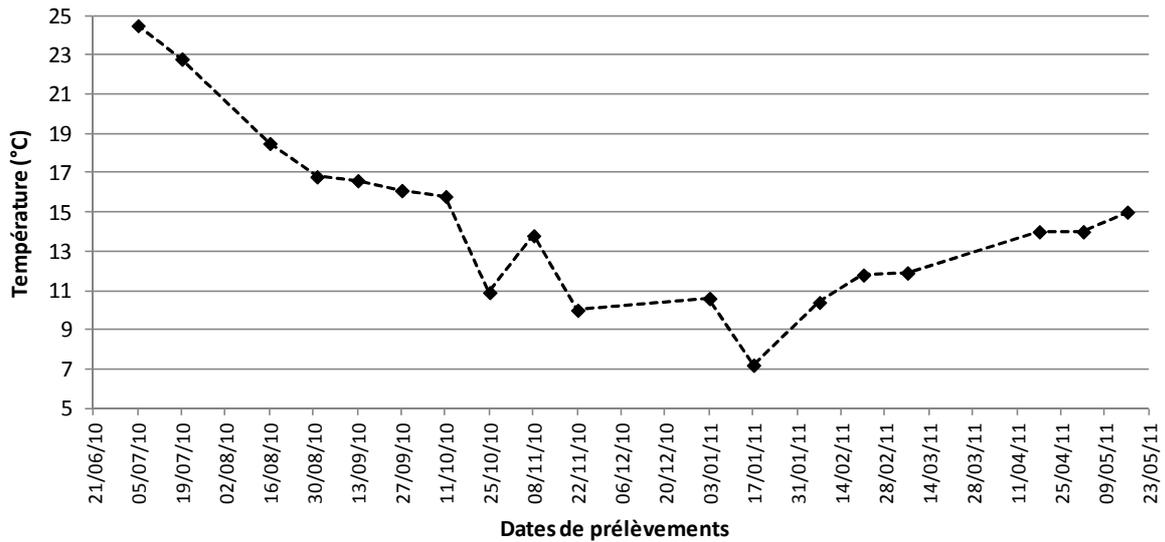


Figure 62: Température (°C) mesurée dans l'eau après traitement au niveau du site E entre juin 2010 et mai 2011

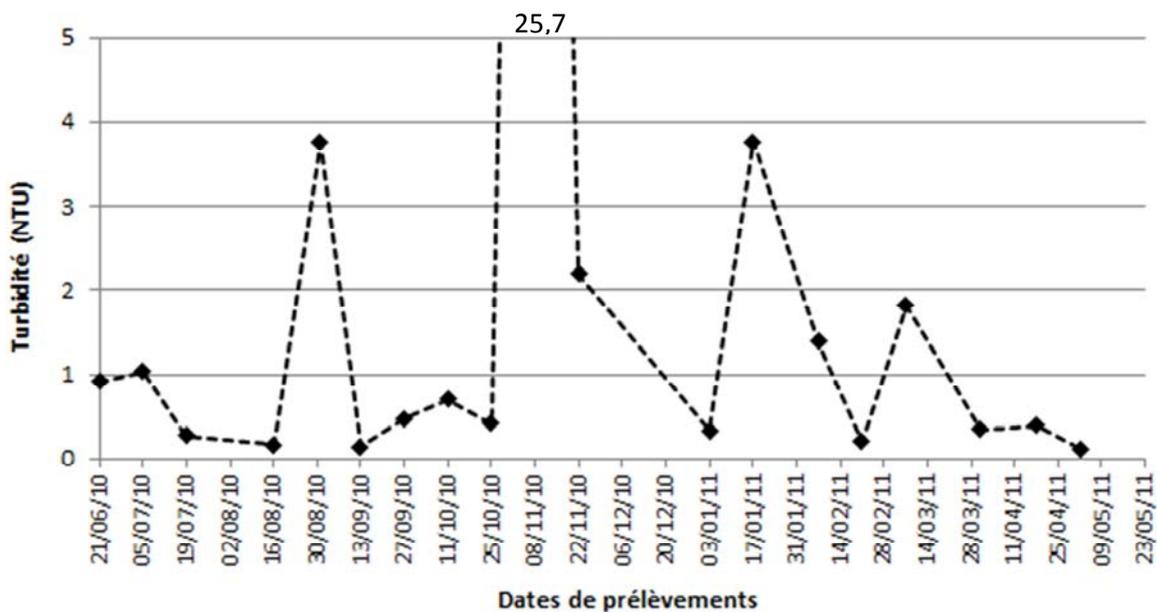


Figure 63: Turbidité (NFU) mesurée dans l'eau après traitement au niveau du site E entre juin 2010 et mai 2011

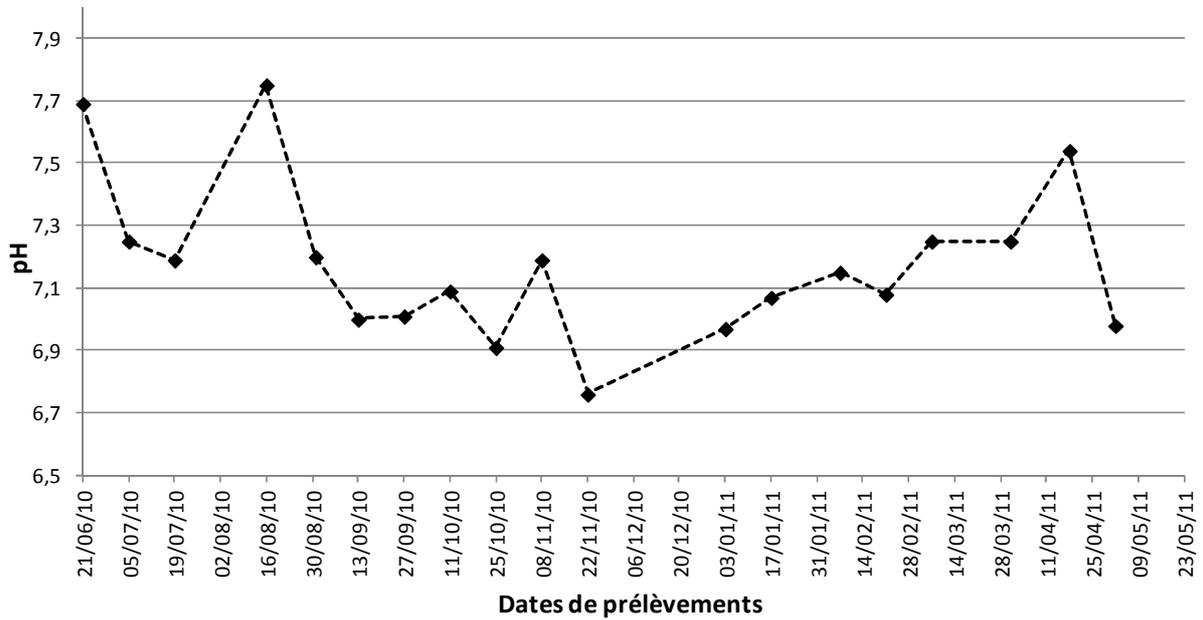


Figure 64: pH mesuré dans l'eau après traitement au niveau du site E entre juin 2010 et mai 2011

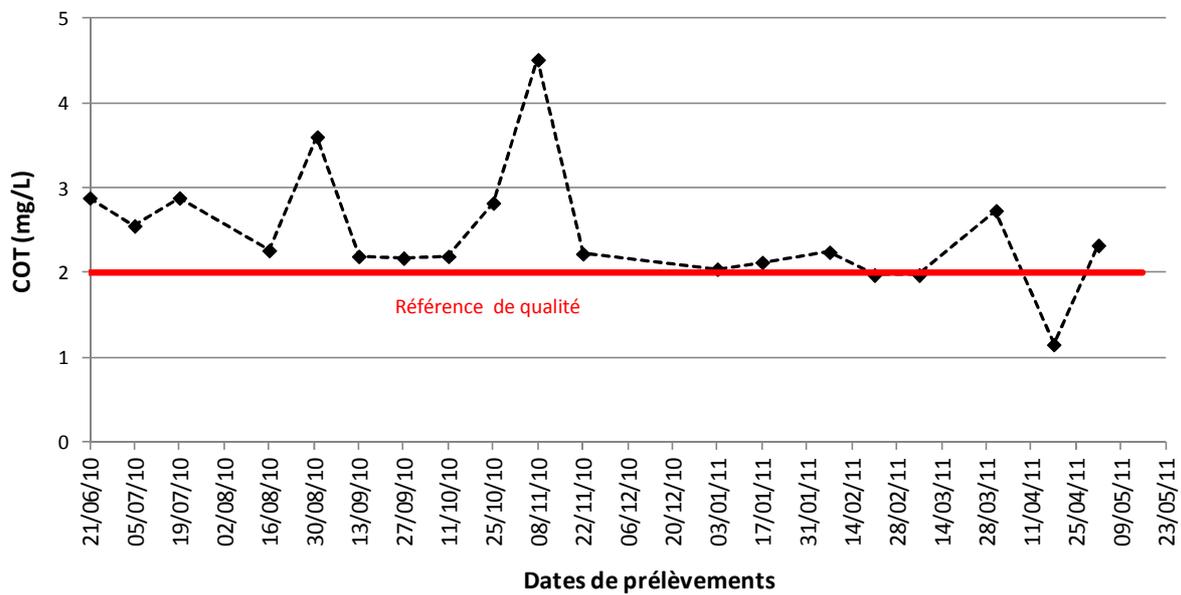


Figure 65: Carbone organique total (mg/L) mesuré dans l'eau après traitement au niveau du site E entre juin 2010 et mai 2011

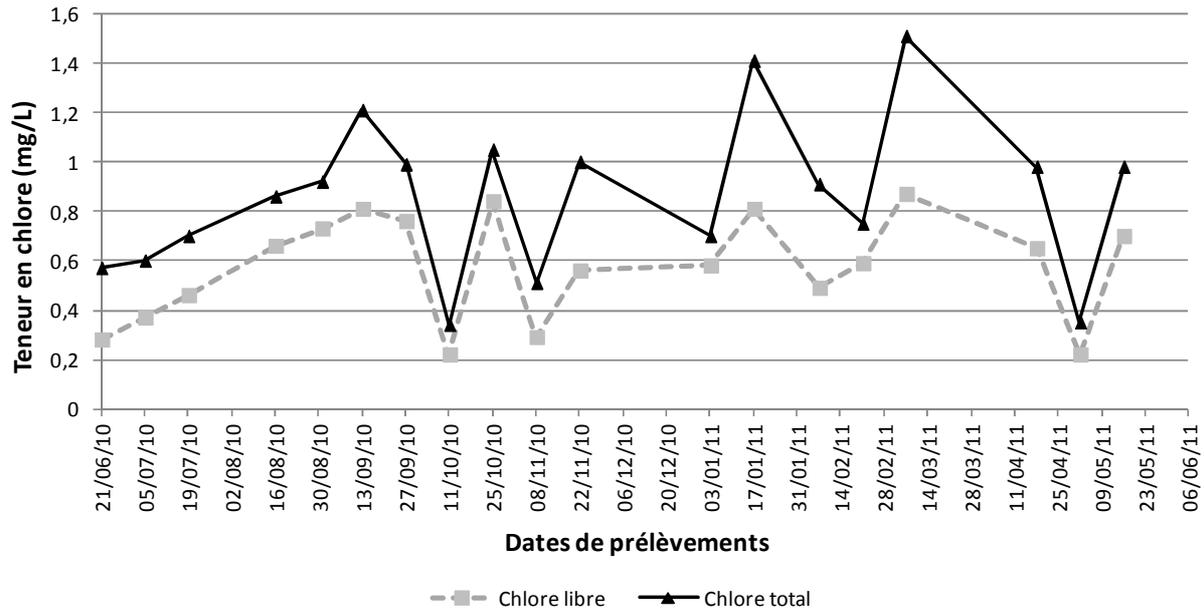


Figure 66: Chlore libre et chlore total (mg/L) mesuré dans l'eau après traitement au niveau du site E entre juin 2010 et mai 2011

Tableau 78: Synthèse des mesures de température, turbidité, pH, COT, conductivité, chlore libre et chlore total obtenues dans l'eau après traitement sur le site E durant la période d'étude de juin 2010 à mai 2011

	Moyenne	Ecart type	Minimum	Maximum
Température (°C)	14,5	4,4	7,2	24,5
Turbidité (NTU)	2,32	5,77	0,12	25,7
pH	7,18	0,25	6,76	7,75
COT (mg/L)	2,46	0,71	1,15	4,51
Conductivité (mS/cm)	0,38	0,08	0,21	0,50
Chlore libre (mg/L)	0,57	0,22	0,22	0,87
Chlore total (mg/L)	0,86	0,32	0,34	1,51

Durant la période d'étude, la température de l'eau traitée a oscillé entre 7,2°C et 24,5°C. Les valeurs de pH et de conductivité ont variées respectivement entre 6,76 et 7,75 et entre 0,21 mS/cm et 0,5 mS/cm. Les teneurs moyennes en chlore libre et en chlore total étaient respectivement de 0,57 mg/L et 0,86 mg/L avec des variations comprises entre 0,22 et 0,87 mg/L en ce qui concerne le chlore libre, et entre 0,34 et 1,51 mg/L pour le chlore total. Sur l'ensemble des échantillons analysés, la valeur moyenne du COT se situe à 2,56 mg/L avec des valeurs extrêmes mesurées à 1,15 mg/L et 4,51 mg/L.

#### 4.1.2. Les indicateurs de contamination fécale et les spores de bactéries ASR

Au total, sur les 19 prélèvements d'eau traitée de la station de potabilisation du site E, trois non-conformités, liées à la présence d'indicateurs bactériens de contamination fécale, ont été constatées: deux concernant la présence de coliformes et une concernant la présence de spores de bactéries ASR. En ce qui concerne la présence de coliformes, ceux-ci ont été détectés dans les échantillons du 07/02/2011 à une concentration de 8 UFC/100 mL et dans l'échantillon du 18/04/2011 à une concentration de 2 UFC/100 mL, mais aucun n'était contaminé en *E. coli*. Ces deux échantillons présentaient une concentration respective en chlore libre de 0,49 et 0,65 mg/L et en chlore total de 0,91 et 0,98 mg/L. Les spores de bactéries ASR ont été détectées dans l'échantillon du 21/06/2010 à une concentration de 8 UFC/100 mL, dont la teneur en chlore libre était de 0,28 mg/L et en chlore total de 0,57 mg/L.

#### 4.1.3. *Campylobacter*

Sur les 19 prélèvements collectés, les analyses opérées avec la méthode de culture normalisée ISO 17995 (2005) ainsi qu'avec la méthode couplée de culture-PCR n'ont pas pu mettre en évidence la présence de campylobacter viable dans l'eau traitée. L'augmentation du volume analytique à 20 L n'a pas permis d'augmenter le nombre d'échantillon positif en campylobacters.

En revanche, avec la méthode de PCR directe, sans étape de culture, il a été possible de détecter du génome de *C. jejuni* dans deux échantillons sur les 37 analysés, le 19/07/2010 et le 13/09/2010, à des concentrations respectives de  $5,7 \times 10^3$  et  $1,3 \times 10^4$  copies de génome/L. La teneur en chlore mesurée pour ces deux échantillons était respectivement de 0,46 mg/L de chlore libre et 0,57 mg/L de chlore total, et de 0,81 mg/L de chlore libre et de 1,21 mg/L de chlore total. Aucun génome de *C. coli* n'a été mis en évidence au cours de cette étude, et aucun indicateur de contamination fécale n'a été détecté dans les deux échantillons positifs en génome de *C. jejuni*.

Il est important de signaler que, du fait de la qualité physico-chimique de l'eau d'alimentation du site E directement prélevée en sortie de station, le volume moyen analysé sur l'ensemble des 37 échantillons n'a été que de 3,1 L (volume minimum: 0,2 L et volume maximum: 20 L). Le faible volume analysé est clairement en lien avec la turbidité de l'eau relevée sur le site qui est-elle même en lien avec le type de traitement employé.

L'efficacité des deux méthodes de détection par PCR en temps réel a été fortement altérée. Pour la PCR *C. jejuni*, les pourcentages d'inhibition mesurés ont oscillé entre 3,2% et 99,99%, avec une valeur moyenne située à 35,3% (ET=27%). Pour la PCR *C. coli*, les pourcentages étaient du même ordre de grandeur avec des variations comprises entre 4,4% et 99,99% et une valeur moyenne qui se situait à 33,9% (ET=27,4%). Il faut également noter que les plus fortes interférences ont été mesurées dans des échantillons pour lesquels la turbidité était la plus élevée.

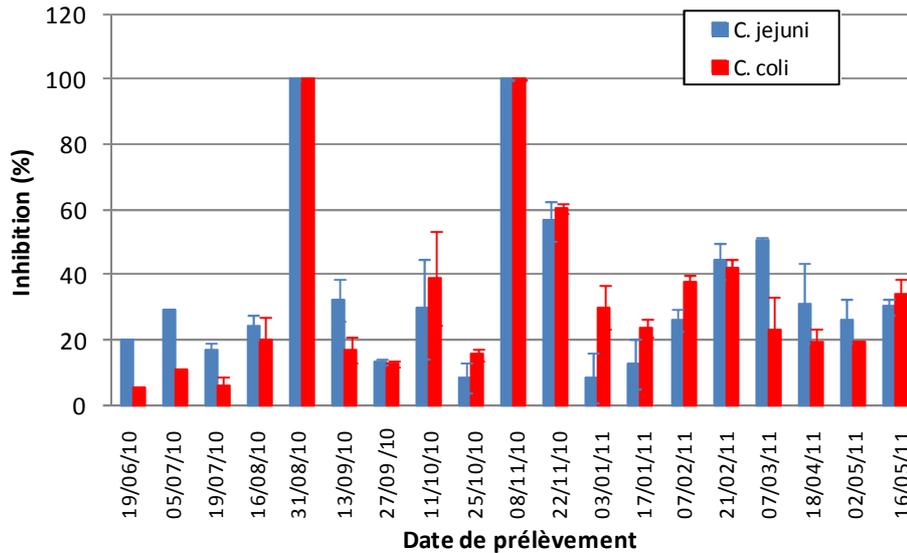


Figure 67: Inhibition de la méthode de détection par PCR en temps réel (%) mesurée pour chaque prélèvement d'eau traitée du site E de juin 2010 à mai 2011 (n=2)

#### 4.1.4. Les adénovirus humains

Une pollution virale due à la présence d'adénovirus humains a été mise en évidence dans les échantillons du 21/06/2010, 18/04/2011 et du 02/05/2011 à des concentrations respectives de  $7,9 \times 10^3$ ;  $2,4 \times 10^2$  et  $7,4 \times 10^2$  copies de génome/50 L. Dans ces échantillons, la teneur en chlore libre et en chlore total était respectivement de 0,28 mg/L et 0,57 mg/L pour l'échantillon du 21/06/10; de 0,65 mg/L et de 0,98 mg/L pour l'échantillon du 18/04/11 et de 0,22 mg/L et de 0,35 mg/L pour l'échantillon du 02/05/11. Parmi ces trois échantillons, un seul s'est révélé contaminé en adénovirus entériques (échantillon du 21/06/2010), mais aucun adénovirus isolé ne présentait un caractère infectieux par la méthode d'ICC-PCR. Concernant la présence des indicateurs fécaux, ceux-ci ont été détectés dans deux des trois échantillons positifs en adénovirus, avec la présence de spores de bactéries ASR (8 UFC/100 mL) dans l'échantillon du 21/06/2010 et de coliformes (2 UFC/100 mL) dans l'échantillon du 18/04/2011.

Pour l'ensemble des 37 échantillons analysés, l'altération de l'efficacité de la méthode de détection par PCR en temps réel a été évaluée à 8,6% (ET=8,9%) avec des variations comprises entre 0% et 33,9%.

#### 4.1.5. *Cryptosporidium*

Concernant la détection des parasites *Cryptosporidium*, compte tenu des concentrations retrouvées dans l'eau de la rivière et l'absence de contamination de la nappe, il n'a pas été réalisé d'analyse sur l'eau traitée du site E sur l'ensemble de la période d'étude.

#### 4.2. Pollution fécale de l'eau traitée au niveau des sites A, B, C, D, F, G et H.

Les paramètres physico-chimiques et microbiologiques ont été mesurés dans les stations de traitement d'eau potable des sites A, B, C, D, F, G et H en mars 2011. Les analyses n'ont pas été effectuées sur le site E car lors de l'organisation de cette étude, la station de traitement a dû être momentanément arrêtée pour réparation.

##### 4.2.1. Les paramètres physico-chimiques

Les paramètres physico-chimiques des différentes eaux traitées produites dans les stations de potabilisation tels que la température, la turbidité, le pH, le COT, le chlore libre et le chlore total, ont été mesurés et les résultats obtenus sont résumés dans le Tableau 79.

**Tableau 79: Synthèse des mesures de température, turbidité, pH, COT, conductivité et chlore libre et total obtenues en mars 2011 dans l'eau traitée en fonction du site d'étude**

Site	Température (°C)	Turbidité (NTU)	pH	COT (mg/l)	Conductivité (mS/cm)	Chlore libre (mg/l)	Chlore total (mg/l)
A	13,6	0,01	8	0,74	0,258	0	0
B	11	0,09	7,93	1,41	0,386	0,01	0,08
C	8	0,01	8,03	1,39	0,376	0,15	0,23
D	12,4	0,04	8,16	1,26	0,418	0,11	0,19
F	11	0,06	8,02	1,93	0,505	0,27	0,45
G	11,9	0,05	7,57	1,88	0,553	0,08	0,1
H	14,3	0,01	7,43	1,68	0,621	0,39	0,49

Les valeurs obtenues concernant la température, la turbidité et le pH varient respectivement entre 8°C (site C) et 14,3°C (site H); entre 0,01 NTU (sites A et H) et 0,09 NTU (site B); et entre 7,43 (site H) et 8,16 (site D). Concernant les valeurs du COT et de la conductivité, elles augmentent progressivement de l'amont de la Moselle vers l'aval. Ainsi au niveau du site A, il a été mesuré un COT de 0,74 mg/L et une conductivité de 0,258 mS/cm, alors que dans l'eau d'alimentation en sortie de la station du site H, la valeur du COT est de 1,68 mg/L et celle de la conductivité de 0,621 mS/cm. Concernant le chlore libre et le chlore total, il apparaît que les valeurs oscillent respectivement entre 0 (site A) et 0,39 mg/L (site H) et entre 0 mg/L (site A) et 0,49 mg/L (site H).

#### 4.2.2. Indicateurs de contamination fécale

Sur les sept prélèvements effectués, aucune non conformité n'a été obtenue concernant la présence de coliformes ou d'entérocoques.

#### 4.2.3. *Campylobacter*

Sur les sept échantillons d'1L d'eau d'alimentation prélevés sur les différents sites, la méthode de culture normative ISO 17995 (2005) ainsi que la méthode de couplage culture-PCR, n'ont pas révélé la présence de campylobacter viable dans les échantillons analysés. L'augmentation du volume analytique à 20 L n'a pas permis d'augmenter le nombre d'échantillons positifs.

La recherche de génome de *C. jejuni* ou *C. coli* par PCR directe sans étape de culture, opérée sur des échantillons de 20 L d'eau d'alimentation collectés au niveau des sept sites d'étude, n'a pas conduit à retrouver ces bactéries dans ces échantillons. L'altération de l'efficacité des deux méthodes de PCR en temps réel a été estimée en moyenne à 16,6% (ET=6,9%) pour la PCR *C. jejuni* et à 8,5% (ET=6,8%) pour la PCR *C. coli*.

#### 4.2.4. Les adénovirus humains

Les analyses virologiques effectuées sur les différents sites n'ont pas permis de mettre en évidence la présence d'adénovirus humains dans les échantillons de 50 L d'eaux d'alimentation produites par les stations de traitement retenues. La méthode de PCR n'a pratiquement pas été altérée ( $5 \pm 2,6\%$ ) sur l'ensemble des sites étudiés.

#### 4.2.5. *Cryptosporidium*

Compte tenu de l'absence d'oocystes de *Cryptosporidium* dans les échantillons d'eaux brutes (eau de rivière ou eau de nappe selon les stations de traitement), il n'a pas été effectué d'analyse sur les eaux traitées.

Le faible nombre d'échantillons d'eau d'alimentation (après traitement) présentant une contamination microbiologique ne nous a permis de mettre en évidence de corrélation.

## 5. DISCUSSION

Les résultats apportés dans cette étude avaient pour objectif de fournir des informations sur la circulation des trois micro-organismes d'intérêt dans la rivière Moselle, entre sa source et sa confluence avec la Meurthe, ainsi que dans des nappes alluviales. Ces deux ressources étant employées pour la production d'eau potable, nous avons également recherché ces pathogènes dans les eaux produites par chaque usine.

Il faut préciser en préambule qu'en nous plaçant en sortie de station de traitement nous étions conscients de ne pas être forcément représentatif de l'eau distribuée au consommateur, et donc par voie de conséquence, de ne pas mesurer l'exposition au plus près du consommateur. Ce choix était volontaire car les collectivités retenues dans cette étude peuvent réaliser des mélanges d'eaux traitées de provenances distinctes. Il n'était pas possible dans le cadre de cette étude d'incorporer des points supplémentaires eu égard à la complexité des analyses, des volumes à prélever et à analyser, de l'organisation des manipulations dans un planning restreint et enfin du coût analytique. Il est clair que le mélange de deux eaux traitées conduit automatiquement à une dilution de la contamination ou des molécules chimiques si elles s'avéraient être présentes dans une des deux ressources. Ainsi, par exemple, au niveau de la sortie de l'usine E, l'obtention d'une eau présentant un COT supérieur à 2mg/L, non conforme au regard des références de qualité fixées à 2 mg/L (arrêté du 11/01/2007 relatif aux limites et référence de qualité des eaux brutes et eaux destinées à la consommation humaine du code de la santé publique), pourra être conforme au niveau du réservoir de distribution dans lequel un mélange de l'eau traitée provenant de l'usine est opérée avec une eau d'une autre ressource conforme vis-à-vis de ce paramètre. Bien évidemment, en cas de dépassement important, il sera difficile de retrouver des valeurs conformes même en présence de mélanges déséquilibrés. Ce dernier cas peut éventuellement s'être produit au niveau de la collectivité du site E, lors des analyses réalisées dans la période du 30/08/2010 et 08/11/2010. Des valeurs importantes de COT (>3,5 mg/L) mais aussi de turbidité ont été relevées en sortie de station de traitement dues aux très fortes précipitations localisées dans la région lors de ces deux périodes. Ces précipitations ont fortement influencé le débit de la Moselle et donc, par voie de conséquence, dégradé la qualité de l'eau brute (valeurs de turbidité, de COT et des indicateurs microbiologiques importantes lors de ces deux périodes au niveau de la Moselle), ce qui a très certainement impacté l'efficacité du processus de traitement de potabilisation de l'usine. Cependant, en dépit de résultats physico-chimiques non conformes obtenus dans les eaux traitées, il n'a pas été décelé d'indicateurs de contamination fécales ou de spores de bactéries ASR, ni de pathogènes (bactérie et virus) dans les eaux produites. Signalons que la présence de chlore libre et total à des concentrations supérieures à 0,2 mg/L a été relevée lors de chaque prélèvement.

### 5.1. Présence des campylobacters dans les différents milieux hydriques

Concernant la présence des campylobacters dans la Moselle, nous avons clairement montré, au niveau du site E, que cette ressource était fréquemment contaminée (70% des échantillons) par des campylobacters thermotolérants viables. Les concentrations mesurées ont été variables au cours du temps, avec 37,5% des échantillons positifs présentant une concentration supérieure ou égale à 100 UFC/L. L'obtention de telles données est peu surprenante, étant donné que la Moselle est le réceptacle de nombreuses sources de pollutions diffuses anthropiques ou animales. D'ailleurs les teneurs en indicateurs de contamination fécale (*E. coli*, Entérocoques) l'attestent, puisque qu'ils ont été détectés dans tous les échantillons, y compris dans les échantillons pour lesquels la présence de campylobacters thermotolérants n'a pu être mise en évidence. Dans ce même type de ressource, d'autres études ont montré la présence de ces bactéries. En France, Denis *et al.* (2009) ont détecté la présence de campylobacters viables dans 83,3% (10/12) des échantillons d'eau de rivière. Au niveau international, d'autres études ont également relevé une forte prévalence de ces bactéries dans ces eaux brutes (Sails *et al.*, 2002; Abulreesh *et al.*, 2005; Devane *et al.*, 2005; Walters *et al.*, 2007; Rodriguez et Araujo, 2010).

Parmi les espèces de campylobacters thermotolérants viables détectées dans les échantillons analysés, il a été mis en évidence la présence d'au moins une des deux espèces *C. jejuni* et *C. coli* dans 89,5% des échantillons. Si l'espèce *C. coli* a été révélée tout au long de l'année (73,7% des échantillons), il n'en est pas de même pour l'espèce *C. jejuni* détectée dans 52,6% des échantillons, et pour laquelle nous n'avons pu déceler sa présence pendant la période hivernale au niveau du site E. Une corrélation significative entre la fréquence de détection de l'espèce *C. jejuni* et la température de l'eau a d'ailleurs été mise en évidence au cours de cette étude au niveau du site E. La prédominance de l'espèce *C. jejuni* en période estivale pourrait s'expliquer par la thermotolérance de ces bactéries qui leur permettrait ainsi de mieux résister dans des eaux où la température est plus chaude. Cependant différentes études ont montré que l'espèce *C. jejuni* pouvait persister plus longtemps à de basses températures, entre 4°C et 10°C, (Obiri-Danso *et al.*, 2001 ; Cools *et al.*, 2003 ; Guillou *et al.*, 2008), ce qui laisse supposer que l'absence de détection de *C. jejuni* en hiver ne serait pas attribuée à une inactivation des bactéries mais plutôt à l'absence de source de pollution contenant ces bactéries. Cette dernière hypothèse serait confortée par le fait que la plus grande fréquence de détection des campylobacters l'été, et notamment *C. jejuni*, serait plutôt liée à une recrudescence des infections à *Campylobacter* pendant la période estivale (Espíe *et al.*, 2006; King *et al.*, 2007, 2008, 2009). Cette hypothèse est d'autant plus vraisemblable que, d'une part, l'espèce *C. jejuni* représente 80% à 90% des agents identifiés parmi les infections à *Campylobacter*, et d'autre part, que les eaux environnementales sont susceptibles d'être contaminées par les eaux usées, contenant les selles des personnes infectées. De façon surprenante, les données concernant la prévalence de chacune des deux espèces *C. coli* et *C. jejuni*, au cours de la période d'étude, vont à l'encontre de la majorité des études d'occurrence des campylobacters dans les eaux environnementales, où la fréquence de détection de l'espèce *C. jejuni* est plus forte comparée aux autres espèces (Hörman *et al.*, 2004; Devane *et al.*, 2005; Denis *et al.*, 2009). Toutefois, la prédominance de l'espèce *C. coli* a déjà été observée dans l'étude de Moore *et al.*, (2001b) et de Rodriguez et Araujo (2010). Pour ces derniers, cette distribution des espèces dans l'eau de rivière serait liée à une pollution d'origine animale, et plus particulièrement les porcins, qui sont le réservoir principal de l'espèce *C. coli*.

L'étude organisée au niveau des différents sites, nous a permis de démontrer clairement que la pollution de la Moselle s'effectuait très tôt dans l'écoulement, puisque des campylobacters thermotolérants viables ont été détectés au niveau du site A, situé à une trentaine de kilomètres de la source. Dans cette étude réalisée en mars, l'espèce *C. coli* a été majoritairement détectée, notamment au niveau des sites situés le plus loin de la source. Seules les méthodes génotypiques de type PCR-RFLP, PFGE, ou les méthodes de séquençage pourraient fournir les informations concernant l'origine de la contamination fécale. Néanmoins il faut peut-être nuancer ces affirmations car l'espèce *C. jejuni* a été détectée fin mars au niveau des sites A et G alors que cette souche n'a pas été décelée au niveau du site E à ces mêmes périodes ce qui met en évidence une distribution particulière selon le site considéré. Il peut être possible également d'envisager que ces bactéries soient bien présentes à ces dates dans la Moselle au niveau du site E, mais pour des raisons en lien d'une part avec l'échantillonnage (nombre de prélèvements collectés faible), et d'autre part à une plus faible concentration, la probabilité de les détecter est fortement diminuée. Cette hypothèse serait confortée par le fait que du génome de *C. jejuni* ait été retrouvé fin mars dans la nappe alluviale lorsque les techniques moléculaires ont été employées.

Dans ces dernières hypothèses, il est difficile d'indiquer avec certitude l'absence totale de bactérie dans les échantillons négatifs (30%) au niveau du site E. Ceci est d'autant plus vrai qu'il est possible qu'un certain nombre de bactéries soient présentes dans le milieu sous une forme VNC et donc non détectables à l'aide de ces méthodes. L'utilisation d'outils moléculaires, présentant l'avantage de mettre en évidence le génome des bactéries quel que soit l'état physiologique de la bactérie (viable, non viable, VNC), ne nous a pas permis de vérifier la présence de ces formes particulières dans les échantillons négatifs. En effet, une inhibition importante de la méthode de détection a été mesurée sur l'ensemble des échantillons analysés au cours de cette étude (49,6% (ET=34,6%) pour *C. jejuni* et 45,5% (ET=35,2%) pour *C. coli*).

Dans la nappe alluviale, par rapport aux eaux de surface, la fréquence de contamination par des campylobacters thermotolérants viables a été nettement plus faible (10,5%). Il faut d'emblée noter que des bactéries viables ont été détectées par association de la culture avec la PCR. En effet avec la méthode normalisée nous aurions rendu des résultats négatifs et conclu à l'absence de ces germes. Seule la présence de *C. jejuni* a été mise en évidence le 19/07/10 et le 16/08/10 à des concentrations de  $1 \leq C < 10$  UFC/L. L'augmentation du volume analytique, afin d'augmenter la probabilité de détection des campylobacters (Hänninen *et al.*, 2003) ne nous a pas permis d'accroître le nombre d'échantillons positifs lorsque cette méthodologie couplée a été employée. Il ne peut être exclu qu'un effet inactivant, lié à la présence d'une flore autochtone inhibant la croissance des campylobacters dans les bouillons d'enrichissement se soit produit (Abulreesh *et al.* 2006).

L'utilisation des outils moléculaires, directement sans passer par une étape de culture, a permis d'augmenter significativement le nombre d'échantillons contaminés, puisqu'au final, 21,6% des échantillons se sont révélés contenir du génome de *C. jejuni* et/ou *C. coli* à des concentrations variant de  $1,8 \times 10^2$  à  $9 \times 10^4$  copies de génome/20 L. Cependant, il est important de signaler qu'il ne peut être affirmé que ces échantillons contiennent des bactéries viables. L'obtention de données de circulation dans des nappes alluviales est peu disponible à ce jour pour ce pathogène. Le plus souvent ces bactéries ne sont pas retrouvées dans ces eaux avec des méthodes classique de détection (Diergaardt *et al.*, 2004 ; Cavereau *et al.*, 2009).

Comme observé dans la Moselle, les échantillons de nappe alluviale contaminés en génome ont été préférentiellement détectés en été. Un seul échantillon a été détecté en hiver. Le fait de retrouver des échantillons positifs dans la nappe démontre clairement qu'il se produit un transfert de la pollution de l'eau de rivière vers la nappe. De même, le fait d'en retrouver majoritairement pendant la période estivale est tout aussi logique, puisque c'est à cette période que la fréquence de détection des campylobacters est la plus importante dans la Moselle au niveau du site E, avec des concentrations élevées. L'obtention d'un nombre nettement plus faible d'échantillons alluviaux contaminés par rapport à des échantillons d'eau de rivière met en évidence l'impact de la filtration naturelle de la berge lors de la réalimentation de la nappe par la rivière.

Concernant la répartition des espèces décelées dans la nappe, l'espèce *C. coli* a été détectée dans 13,5% des échantillons contaminés, à des concentrations comprises entre  $1,8 \times 10^2$  et  $3,4 \times 10^4$  copies de génome/20 L, et l'espèce *C. jejuni* a été détectée dans 10,8% des échantillons avec des concentrations qui oscillent entre  $1,6 \times 10^4$  et  $9 \times 10^4$  copies de génome/20 L. Signalons que seules les souches de *C. jejuni* ont été décelées par les deux méthodes, culture-PCR et PCR directe, ce qui traduit une pression de pollution plus importante en termes de quantité avec cette espèce.

Les échantillons d'eau de nappe contenant des campylobacters se sont révélés exempts d'indicateurs de contamination fécale (*E. coli* ou Entérocoque), ce qui est d'autant plus gênant que des campylobacters viables, donc potentiellement infectieux, ont été retrouvés. Cependant, il est important de nuancer ces résultats car la recherche des indicateurs, dans ce type de ressource, est réalisée par une méthode NPP sur des échantillons d'1 mL contre 1 L pour la recherche des campylobacters. L'utilisation d'une méthode de filtration sur des volumes de 100 mL aurait peut-être permis de déceler ces dernières bactéries. Au niveau des autres sites étudiés, il n'a pas été retrouvé de campylobacters thermotolérants dans les eaux de nappe quel que soit le volume analysé et la méthode employée, ni la présence d'indicateurs de contamination fécale.

Dans l'eau traitée, il n'a pas été retrouvé de campylobacters thermotolérants viables pendant toute l'étude au niveau du site E, ni au niveau de tous les autres sites étudiés lorsque la norme a été employée en combinaison ou non avec la méthode de PCR mise en place. En revanche du génome de *C. jejuni* a été détecté dans deux échantillons à des concentrations de  $5,7 \times 10^3$  et  $1,3 \times 10^4$  copies de génome/L lors d'un prélèvement effectué le 19/07/10 et d'un prélèvement effectué le 13/09/10. Étant donné que la détection a été opérée directement sans passer par une étape de culture, nous ne pouvons affirmer que ces bactéries étaient viables au moment du prélèvement, la méthode de PCR ne pouvant distinguer l'ADN des formes viables et non viables.

Il est important de souligner que le nombre d'échantillons positifs dans les échantillons d'eau traitée du site E a pu être sous-estimé. Du fait des caractéristiques physico-chimiques de cette eau, et notamment d'un COT et d'une turbidité anormalement élevés en lien soit avec le type de traitement employé soit avec la qualité de la ressource, le volume d'analyse moyen n'a été que de 3,1 L, au lieu des 20 L initialement envisagés, ce qui a pu diminuer la probabilité de détection des campylobacters. Ce problème de colmatage des filtres n'a pas été rencontré au niveau du site E lorsque l'eau traitée a été produite exclusivement à partir d'eau de nappe, ou au niveau des eaux de tous les autres sites étudiés. En présence d'une turbidité élevée, le rendement de la méthode, déterminé à 83,7% (ET=22%) sur des échantillons d'1 L d'eau du robinet du laboratoire, a pu être fortement altéré. A titre d'exemple, des rendements de 8,8% (ET=1,5%) ont été estimés sur des eaux de turbidité comparable. Enfin, dans l'eau prélevée, la présence de molécules co concentrées avec les bactéries peut avoir provoqué une interférence sur la méthode de détection employée (en moyenne de 35,3% (ET=27%) pour la PCR *C. jejuni* et 33,9% (ET=27,4%) pour la PCR *C. coli*). Ces différents paramètres sont indispensables à prendre en compte lors du rendu de résultats afin de nuancer les conclusions émises concernant la présence de campylobacters dans cette eau d'alimentation. A l'inverse, pour tous les autres sites, les analyses réalisées sur les eaux d'alimentation (20 litres) produites par les différentes stations de potabilisation situées le long de la Moselle, n'ont pas révélé la présence de campylobacter, ni même de génome de *C. jejuni* ou *C. coli*. Compte tenu des données d'interférence mesurées, en moyenne de 16,6% (ET=6,9%) pour la PCR *C. jejuni* et de 8,5% (ET=6,8%) pour la PCR *C. coli*, il est possible de déduire à une réelle absence de ces bactéries dans ces échantillons.

L'obtention de résultats positifs en été dans l'eau d'alimentation semble logique avec les résultats obtenus dans l'eau de rivière et l'eau de nappe à ces mêmes périodes (Figure 68). A ces deux dates, un mélange de Moselle et d'eau de nappe en proportion relative de 80%/20% et de 55%/45% a été réalisé. Dans la Moselle, des bactéries *C. jejuni* viables ont été détectées à ces deux périodes. Concernant les indicateurs de contamination fécale ou les spores de bactéries ASR, il n'a pas été décelé d'indicateur dans ces deux échantillons contenant des campylobacters, ce qui permet d'infirmer un défaut de filtration, ou un problème survenu lors du traitement dans la station. Bien sûr, même si ces indicateurs avaient été présents, la présence de chlore (0,46 mg/L et 0,81 mg/L de chlore libre, 0,7 mg/L et 1,21 mg/L de chlore total respectivement le 19/07/10 et le 13/09/10) aurait inactivé ces bactéries et donc pu masquer un problème de fonctionnement du process. Or, il faut préciser qu'à ces deux périodes, aucun virus (adénovirus) n'a été décelé dans les eaux traitées dans les 50 litres analysés alors que des quantités importantes étaient retrouvées dans les eaux de Moselle. Cette absence de virus tendrait à confirmer le bon fonctionnement de l'usine. Dans ce contexte, le génome de *C. jejuni* retrouvé dans l'eau d'alimentation pourrait provenir de la nappe, et le chlore présent dans le milieu ne permettrait pas de détruire le génome des bactéries. Cette supposition serait d'autant plus vraisemblable que le génome de l'espèce *C. coli*, qui est décelé dans l'eau de la Moselle mais pas dans l'eau de la nappe lors de cette campagne d'analyse, n'est pas présent dans l'eau traitée. Il est difficile d'indiquer si le génome décelé dans l'eau traitée provient de structure bactérienne intactes ou non, ou s'il s'agit de génome libre. En effet nous ne disposons pas assez d'informations sur le comportement de ces structures dans ce type d'eau pour pouvoir répondre à cette question.

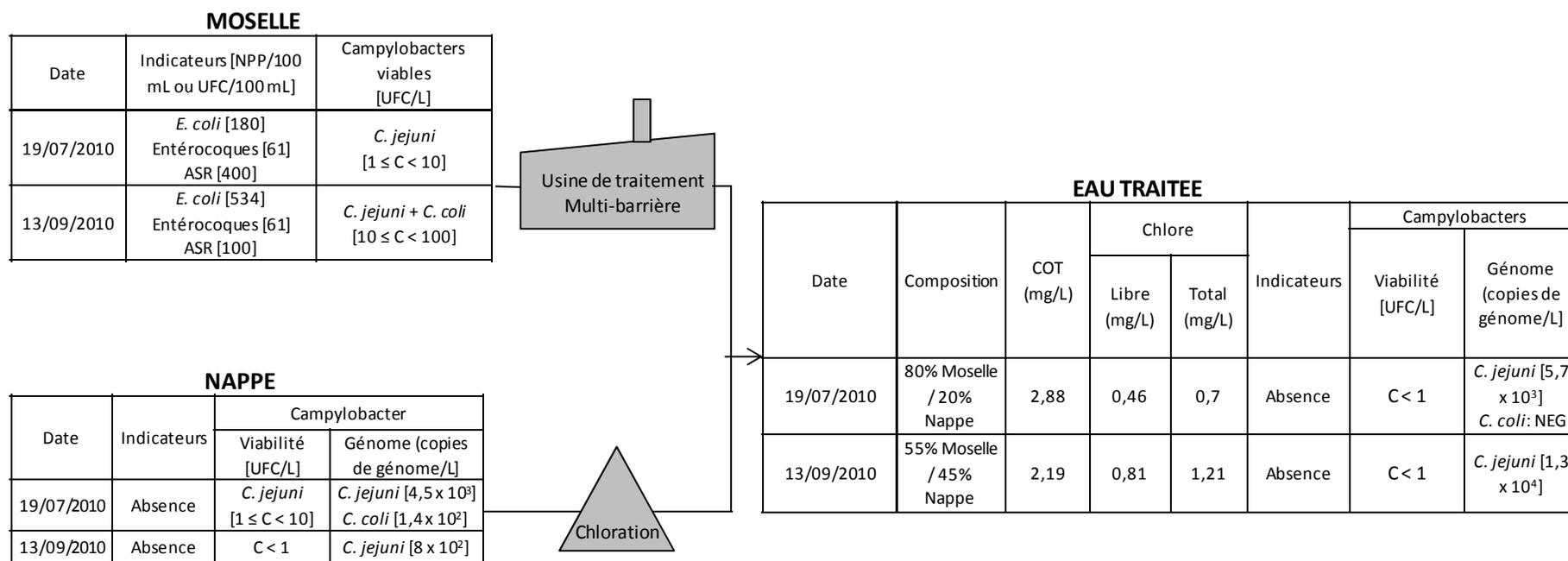


Figure 68: Concentrations en campylobacters dans les échantillons d'eau traitée retrouvés positifs et dans les échantillons d'eau de Moselle et d'eau de nappe correspondant à la même période.

En termes de représentativité, il existe peu de données concernant la présence de ces bactéries dans les eaux d'alimentation à l'exception d'échantillons incriminés dans des toxi-infections alimentaires collectives. Quelques études ont montré que les eaux d'alimentation sont peu ou pas contaminées en campylobacters et les concentrations mesurées dans les échantillons positifs sont faibles (Delom et Munoz, 2000; Moore *et al.*, 2001a; Diergaardt *et al.*, 2004; Denis *et al.*, 2009). Cette observation est parfaitement cohérente avec les résultats obtenus à partir des échantillons d'eau d'alimentation après traitement, sur le site E.

D'un point de vue purement méthodologique, si la méthode de culture a permis de démontrer la présence récurrente de campylobacters thermotolérants viables dans la Moselle (dont les espèces *C. jejuni* et *C. coli*) le couplage avec une technique de PCR en temps réel a permis de rehausser les concentrations mesurées lors de l'utilisation de la méthode normative. En effet, parmi l'ensemble des échantillons analysés au cours de cette étude avec la méthode normative, 10% (2/20) des échantillons se sont révélés contenir les bactéries d'intérêt à des concentrations supérieures ou égales à 100 UFC/L alors qu'il y en avait 26,3% (5/19) avec la méthode couplée (culture-PCR). Dans les échantillons d'eau de nappe alluviale, la méthode normative n'a pas permis de révéler la présence de campylobacters viables alors qu'ils étaient réellement présents dans deux échantillons positifs (*C. jejuni* viables révélés par la méthode de culture-PCR). Cette différence de résultats est essentiellement liée à la révélation plus aisée des bactéries cultivées par PCR en temps réel au sein de tapis de colonies, qui ne peut l'être par les tests normatifs.

Dans la Moselle, l'obtention de résultats négatifs par la méthode de détection par PCR directe, alors que des campylobacters viables sont détectés par culture, est expliquée par la nature physico-chimique de l'eau. Un très grand nombre de molécules peuvent interférer avec la méthode de PCR (Wilson, 1997). Pour diminuer cet effet inhibiteur, il aurait fallu rajouter des étapes de purification. Cependant l'ajout de toute nouvelle étape se fait automatiquement au détriment de la sensibilité. Un travail méthodologique important à ce niveau est encore à réaliser pour améliorer la performance de détection de ces méthodes. A défaut, la mesure systématique de l'interférence lors de chaque analyse permet d'apporter une information supplémentaire au gestionnaire du risque en termes de risque possible de résultats faussements négatifs. Dans des matrices moins chargées en matières en suspension telles que les nappes alluviales, le couplage des outils de PCR à des méthodes de concentration de grands volumes a montré son efficacité sur la révélation d'une possible contamination des nappes alluviales. Les résultats obtenus par PCR permettent d'indiquer que cette ressource est vulnérable et que sa qualité dépend de la rivière. Dans ce travail nous montrons également que l'augmentation du volume analytique, de 1 à 20L, contribue à améliorer la probabilité de détection de ces bactéries.

## 5.2. Présence des adénovirus humains dans les différents milieux hydriques

Concernant la présence des adénovirus humains dans la Moselle sur la période d'étude, la méthode de PCR en temps réel TaqMan a permis de mettre en évidence la présence de génome d'adénovirus humains dans tous les échantillons, parmi lesquels 92,7% d'entre eux présentaient une contamination par les adénovirus entériques. Les concentrations en adénovirus humains oscillaient entre 3,46 log<sub>10</sub> et 8,92 log<sub>10</sub> copies de génome/10 L. Il est important d'indiquer que la concentration a été estimée en tenant compte de données d'interférence très importante ce qui biaise la quantité déterminée (99,9% d'inhibition). L'obtention de résultats systématiquement positifs, d'une part au niveau de chaque prélèvement analysé au niveau du site E, et d'autre part, au niveau de tous les sites de prélèvement (sites A à H), a soulevé un certain nombre d'interrogations notamment sur la méthodologie employée pour révéler ces virus dans l'eau de rivière. En effet, bien que les adénovirus soient les virus entériques les plus fréquemment retrouvés dans l'environnement (Pina *et al.*, 1998; Chapron *et al.*, 2000; Cavereau *et al.*, 2009; Gibson *et al.*, 2011), il existe peu d'études relayant de telles fréquences.

Nous avons écarté une possible aspécificité de la méthode employée, aspécificité qui aurait pu expliquer ces résultats. Différents séquençages réalisés sur différents échantillons, ont mis en évidence la présence d'adénovirus de sérotypes 2, 6 et 41, ce qui permet de rejeter, d'une part l'aspécificité de la PCR TaqMan, et d'autre part, la contamination de laboratoire par l'étalon moléculaire employé pour la quantification du génome. L'utilisation successive de deux PCR pour déclarer la présence des adénovirus F, après un premier screening des adénovirus A à F par la PCR TaqMan, confirme la présence de ces virus par deux analyses distinctes employant des jeux d'amorces différents.

De manière tout aussi surprenante des fréquences de détection élevées (100%) ont été retrouvées au niveau du canal de Nancy à proximité du site E utilisé comme base nautique, et qui est un bras canalisé de la Meurthe se jettant dans la Moselle (Ogorzaly *et al.*, 2009). Ces résultats ont été obtenus dans le cadre d'un projet européen Virobathe par un autre laboratoire employant un procédé de concentration similaire mais une méthode de PCR différente de celles employées dans le cadre de cette thèse. D'autres études décrivent une forte prévalence des adénovirus humains dans les eaux environnementales (Girones *et al.*, 1995; Pina *et al.*, 1998 Haramoto *et al.*, 2007). Haramoto *et al.* (2007) ont eux aussi observés une très forte prévalence des adénovirus entériques (100%) dans d'autres ressources superficielles. Skrabber (2003) a relaté la présence récurrente de génome d'entérovirus et de norovirus dans la Moselle au niveau de sites proches du site E dans des proportions variables, comprises entre 28% et 44%, lorsque seulement 1 litre d'eau était analysé.

Dans cette étude, les fortes concentrations mesurées ont pu être corrélées aux fluctuations de la température de l'eau de rivière, avec un pic observé pendant la période hivernale, laissant pressentir un apport de virus par l'intermédiaire d'eaux usées, en période épidémique de gastro-entérites (Durepaire *et al.*, 1995). Des pics de pollution virale pendant la période hivernale par les norovirus ont déjà été décrits dans l'eau de rivière (Tani *et al.*, 1995 ; Westrell *et al.*, 2006) et dans l'eau souterraine (Abbaszedegan *et al.*, 1993) alors qu'une absence de saisonnalité des adénovirus humains dans les rivières a été mise en évidence dans de nombreuses études (Choi et Jiang, 2005; Van Heerden *et al.*, 2005; Jiang, 2006).

Le caractère infectieux des adénovirus isolés n'a été mis en évidence que dans 10,3% des échantillons positifs grâce à l'emploi de la méthode d'ICC-PCR. Ces derniers résultats sont peu surprenants puisque dans l'étude de Skraber (2003), aucun entérovirus décelé ne s'était révélé infectieux. Toutefois, dans notre cas, il est possible que les résultats concernant le caractère infectieux puissent avoir été sous-estimés du fait de la forte prévalence des adénovirus dits « entériques » (séro-groupe F) dont l'isolement est complexe et peut se révéler infructueux sur les systèmes cellulaires à disposition.

L'étude spécifique réalisée en mars 2011, au niveau des 8 sites situés le long de la Moselle, a permis de mettre en évidence une contamination homogène puisque les concentrations mesurées sur l'ensemble des huit sites oscillaient entre 3,95 log<sub>10</sub> et 4,59 log<sub>10</sub> copies de génome/10 L. Skraber (2003) avait déjà observé une contamination homogène de la Moselle, avec des concentrations respectives en coliphages somatiques et en bactériophages F-spécifiques de 3,25 log<sub>10</sub> UFP/100 mL (ET=0,33 log<sub>10</sub>) et 2,31 log<sub>10</sub> UFP/100 mL (ET= 0,45 log<sub>10</sub>) au niveau de 6 sites de prélèvements.

Dans la nappe alluviale du site E, 18,7% des échantillons se sont avérés positifs en génome d'adénovirus humains à des concentrations comprises entre 7 x 10<sup>2</sup> copies de génome/50 L et 1,7 x 10<sup>4</sup> copies de génome/10 L. Sur les 7 échantillons contaminés en adénovirus humains, la présence spécifique des adénovirus entériques a été mise en évidence dans 3 d'entre eux. Lors de l'étude réalisée en mars 2011 en lien avec les 8 sites situés le long de la Moselle, seule la nappe alluviale du dernier site H (site le plus éloigné de la source) s'est révélée contenir du génome d'adénovirus humains non infectieux. Dans la littérature, les virus entériques sont détectés dans moins de 30% des échantillons d'eaux souterraines par biologie moléculaire (Cavereau *et al.*, 2009; Ogorzaly *et al.*, 2010; Borchartd *et al.*, 2003). Le différentiel d'échantillons retrouvés positifs entre les concentrations mesurées dans la Moselle et celles mesurées dans la nappe nous permet de confirmer qu'il se produit une épuration naturelle lors de la réalimentation de la nappe.

Dans l'eau d'alimentation au niveau du site E, seuls trois échantillons (21/06/10, 18/04/11, 02/05/11) se sont révélés contenir du génome viral à des concentrations de 1,6 x 10<sup>2</sup>; 4,8 x 10<sup>0</sup> et 1,5 x 10<sup>1</sup> copies de génome/L. Ces résultats sont concordants avec ceux de la littérature où il est mentionné une faible prévalence des adénovirus (van Heerden *et al.*, 2005; Gibson *et al.*, 2011). La présence d'adénovirus entériques a pu être mise en évidence dans seulement un échantillon. Signalons que pour les trois échantillons positifs en adénovirus humains, un échantillon s'est révélé contenir des spores de bactéries ASR (le 21/06/2010) et un autre des coliformes (18/04/2011) mais pas de campylobacters thermotolérants.

De la même manière que pour les campylobacters, il était intéressant d'essayer de déterminer l'origine de la pollution virale de l'eau d'alimentation du site E (Figure 69). Concernant le premier prélèvement positif relevé le 21/06/2010, l'eau d'alimentation a été produite à partir d'un mélange d'eau de surface et d'eau de nappe selon le rapport 70%/30%. Des concentrations importantes en adénovirus de l'ordre de  $3,7 \times 10^3$  copies de génome/L ont été retrouvées dans la rivière. La nappe à cette date s'est également révélée contaminée avec des concentrations de  $1,8 \times 10^3$  copies de génome/L. Dans l'eau d'alimentation, la présence de spores de bactéries ASR peut traduire un défaut du traitement de filtration. Il serait donc plus probable que les adénovirus détectés dans cet échantillon proviennent d'un défaut de traitement de la station. Néanmoins, malgré la présence de chlore dans l'eau il n'est pas improbable que l'ADN viral provienne également de la nappe. En l'absence de données de persistance du génome dans ces milieux, il est difficile de conclure avec certitude quant à la provenance du génome viral détecté.

Pour le second prélèvement (le 18/04/2011), seule l'eau de Moselle s'est révélée contenir du virus. Dans ce contexte, et compte tenu de la présence de coliformes dans l'eau d'alimentation lors des analyses, il semblerait que le génome viral retrouvé provienne de la Moselle peut-être en raison d'un défaut de traitement.

Enfin concernant le troisième prélèvement (le 02/05/2011), seul le génome des adénovirus a été retrouvé dans la Moselle sans que des indicateurs aient été décelés dans l'eau traitée. Dans ce dernier cas, et en l'absence d'information sur des aspects morphologiques des virus décelés dans l'eau traitée (génome encapsidé ou génome libre), il pourrait être admis que le génome provienne de la rivière et qu'il ait passé la filière de traitement.

D'un point de vue méthodologique, nous avons montré au cours de cette étude, que la technique de PCR en temps réel était adaptée à la recherche des adénovirus dans les différentes matrices hydriques. Cette méthode, rapide, sensible et spécifique présente tout de même l'inconvénient de ne pouvoir mettre en évidence l'infectiosité des virus détectés. L'interférence de la méthode mesurée sur l'ensemble de l'année n'est pas très élevée dans la nappe et l'eau traitée (respectivement 3,4% (ET=2,9%) et 5% (ET=2,6%)) alors que dans l'eau de la Moselle, il a clairement été démontré une corrélation positive entre la turbidité de l'eau et l'interférence de la méthode de détection ( $r=0,637$ ,  $p<0,05$ ). Pour ces eaux, des inhibitions pouvant atteindre 99,9% ont été relevées, ce qui, par réajustement par rapport à la quantité mesurée dans l'échantillon, a pu induire une incertitude au niveau de la détermination de la quantité de virus (fortes quantités de virus déterminées). Concernant la méthode de concentration sur laine de verre, les résultats obtenus montrent ainsi que ce principe est bien adapté à la recherche de ces virus dans les eaux quelle que soit leur origine et la turbidité. L'absence de colmatage de la méthode sur des échantillons chargés en matières organiques nous a permis d'analyser l'ensemble des échantillons collectés dans le cadre des campagnes opérées.

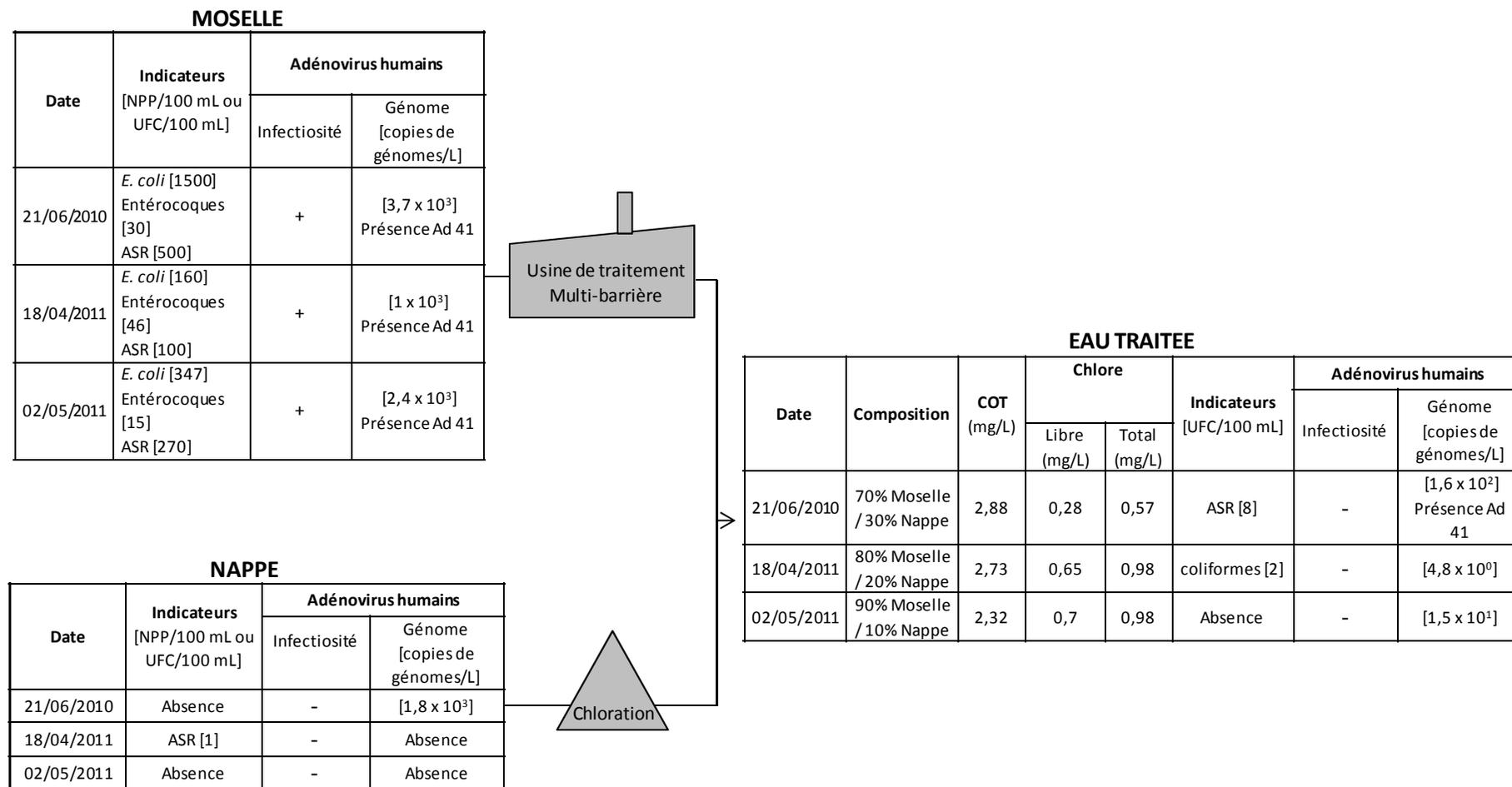


Figure 69: Concentrations en adénovirus humains dans les échantillons d'eau traitée retrouvés positifs et dans les échantillons d'eau de Moselle et d'eau de nappe correspondant à la même période.

### 5.3. Présence des parasites *Cryptosporidium* dans les différents milieux hydriques

Dans la Moselle, le nombre d'échantillons hydriques retrouvés contaminés en parasites *Cryptosporidium* au niveau du site E sur toute la période de l'étude a été relativement faible (19,5%) par rapport aux autres micro-organismes recherchés. La concentration retrouvée a oscillé entre 1 à 10 oocystes dans les 20 litres d'eau analysés. Au niveau de tous les autres sites étudiés, en mars 2011, aucun échantillon collecté et analysé ne s'est révélé contaminé en oocystes. Il existe peu de données relatives à la présence et à la circulation des ces pathogènes dans ce cours d'eau. Seules quelques analyses réalisées au niveau de sites en amont et en aval du site d'étude ont montré la présence de concentrations similaires (analyses de l'agence régionale de santé). D'une manière générale, dans la littérature, la prévalence des oocystes de *Cryptosporidium* est plus importante mais les concentrations mesurées restent relativement faibles (Karanis *et al.*, 2006; Castro-Hermida *et al.*, 2008b, 2009; Cavereau *et al.*, 2009; Lobo *et al.*, 2009; Skrabber *et al.*, 2009). Pour d'autres rivières, telles que la Seine, également employée pour produire de l'eau potable, Touron *et al.* (2007) ont mis en évidence la présence d'oocystes de *Cryptosporidium* par immunofluorescence dans 78,9% des échantillons analysés, à des concentrations comprises entre 1,7 à 34 oocystes/10 L. Mons *et al.* (2009), dans une étude organisée au niveau de la Seine et de la Marne dans l'agglomération parisienne, mettent en évidence des concentrations moyennes comprises entre 0,3 et 3,2 oocystes/10 L au niveau de 7 sites étudiés, avec des concentrations mesurées par immunofluorescence pouvant atteindre 30,5 oocystes/10 L.

A partir des données obtenues au niveau du site E, il n'a pas été possible d'établir de corrélation avec les indicateurs bactériens ou avec la qualité physico-chimique de la Moselle. Des corrélations entre la concentration en oocystes de *Cryptosporidium* et celles des Entérocoques ou des spores de *Clostridium perfringens* ont été observées dans l'étude de Touron *et al.* (2007) et un effet saison a été mis en évidence dans l'étude de Mons *et al.* (2009), avec une prévalence des parasites plus importante en automne. Cet effet de saisonnalité a également été montré dans l'étude de Cavereau *et al.* (2009) puisqu'ils détectent des oocystes de *Cryptosporidium* dans des eaux de rivière en France à des fréquences de 25% en été, 44% en automne et 19% en hiver. Dans notre étude, l'échantillon retrouvé positif en oocystes (le 16/08/10) est clairement lié à une forte pluviométrie avec une turbidité de la Moselle de 288 NTU mesurée à cette période. Cependant, aucun oocyste de *Cryptosporidium* n'a été décelé lors d'un autre épisode pluvieux (08/11/10) où une turbidité de 471 NTU avait été mesurée. Pourtant, cette corrélation entre la présence de ces protozoaires et la turbidité de l'eau ou la pluviométrie a déjà été montré dans de nombreuses publications scientifiques (Ferguson *et al.*, 1996; Atherholt *et al.*, 1998; Kistemann *et al.*, 2002; Schets *et al.*, 2008).

Dans ce travail il est intéressant de signaler que grâce à l'emploi de la méthode moléculaire mise en place, il a été possible de révéler la présence d'espèces reconnues comme pathogènes pour l'Homme (*C. hominis*, *C. parvum* ou *C. meleagridis*) dans les échantillons pour lesquels la présence d'oocystes a été mise en évidence par immunofluorescence ce qui n'est pas obtenu dans les autres études. L'obtention de ces données permet d'indiquer la circulation de souches pouvant potentiellement infecter l'Homme si elles venaient à se retrouver dans l'eau distribuée (en cas de défaut du traitement) à des concentrations supérieures à celle de la DMI définie pour ce pathogène et sous condition d'être encore viable. Les faibles concentrations retrouvées au niveau de ces échantillons ne nous ont pas permis d'effectuer une recherche de la viabilité de ces agents.

Dans la nappe alluviale du site E, ainsi que dans toutes les autres nappes des autres sites, il n'a pas été mis en évidence la présence de *Cryptosporidium* avec les méthodes à disposition. Ces résultats sont concordants avec ceux retrouvés dans la littérature car dans les eaux souterraines, la détection des oocystes de *Cryptosporidium* est rare (Cavereau *et al.*, 2009; Skraber *et al.*, 2009). Cependant, il faut nuancer ces conclusions, car au cours de cette étude, il n'a pas été possible d'analyser de plus grands volumes d'eau, ce qui, pour ce type de ressource aurait permis d'accroître la probabilité de détection de ce pathogène.

Dans les eaux traitées, compte tenu des résultats analytiques obtenus dans les eaux de rivière et/ou des eaux de nappe, ainsi que des différents traitements mis en place dans les stations de traitement, ce pathogène n'a pas été recherché.

D'un point de vue purement méthodologique, la méthode de référence NF T90-455 (AFNOR, 2001) est une méthode robuste et efficace permettant d'analyser des eaux aux profils physico-chimiques très différents. Cependant cette méthode reste complexe, longue et fastidieuse notamment lors de la recherche et du dénombrement des oocystes sur les lames en microscopie, surtout si l'échantillon contient un grand nombre de molécules autres que les parasites (fluorescence d'autres molécules autres que les parasites).

Dans cette étude, nous avons montré l'intérêt de l'utilisation de méthode moléculaire type PCR en temps réel qui a permis d'augmenter le nombre d'échantillons positifs, ceci essentiellement en raison de la grande sensibilité de la méthode. Cette approche, permettant de spécifier les souches pathogènes pour l'Homme, est plus simple dans son utilisation de part l'absence d'un dénombrement sous microscope.

***En conclusion, notre étude met en évidence que la contamination microbiologique est abondante dans la Moselle, notamment par la forte prévalence des adénovirus humains et des campylobacters. Aucune corrélation entre les trois micro-organismes ciblés et les indicateurs de contamination fécale n'a été mise en évidence au cours de cette étude. Concernant la nappe alluviale au niveau du site E, l'analyse d'échantillons, selon un plan continu s'inscrivant sur une durée de 12 mois, a démontré que cette ressource ne pouvait être considérée comme complètement protégée vis-à-vis de pollution microbiologique provenant de la rivière. Dans les eaux traitées, il est possible de retrouver du génome de campylobacters et d'adénovirus humains sans qu'il puisse être établi s'ils proviennent de formes intracellulaires (bactéries) ou encapsidées (virus), ou s'ils sont simplement libres dans le milieu hydrique. Le caractère viable et/ou infectieux des agents décelés n'a pas été mis en évidence.***

***Dans la suite de nos travaux nous avons recherché à acquérir des informations sur le comportement de ces différents agents dans les eaux de la Moselle, de la nappe et l'eau traitée du site E de manière à pouvoir interpréter les résultats obtenus dans ces étude en termes de risque.***

***Partie 3: Persistance de C. jejuni, de  
l'adénovirus 1 et de C. parvum dans les  
différents milieux hydriques***

---



A ce jour, indépendamment de la détection des indicateurs de contamination fécale, seule la mise en évidence de la viabilité des bactéries et des parasites pathogènes pour l'Homme ou de l'infectiosité des virus entériques, fait référence pour l'évaluation du risque. Or, de plus en plus d'études, valorisées scientifiquement, se basent sur la détection des pathogènes dans différents milieux hydriques à l'aide d'outils moléculaires qui vont tracer la présence du génome. Il faut rappeler que les méthodes moléculaires ne peuvent différencier du génome de pathogènes viables/infectieux, non viables/non infectieux. Ces méthodes présentent pourtant l'avantage d'être simples, sensibles, spécifiques et surtout d'être rapides puisque quelques heures sont nécessaires pour obtenir un résultat, contre quelques jours par les méthodes classiques de culture. Pour certains virus tels que les norovirus, seuls ces outils sont capables de les mettre en évidence dans des échantillons hydriques. La révélation de la présence de micro-organismes pathogènes pour l'Homme par ces méthodes pose donc la question de leur comportement et de leur persistance aux traitements de potabilisation.

Nous avons donc étudié le comportement d'une souche de *C. jejuni*, d'un adénorivirus 1 et de l'espèce *C. parvum*, pris comme modèle, dans ces eaux traitées mais également dans les eaux brutes, représentatives des eaux étudiées. La perte de la viabilité et de l'infectiosité de ces micro-organismes a été suivie au cours du temps, parallèlement à la perte du génome intracellulaire ou nu, de manière à préciser les processus de dégradation se produisant au cours du temps au niveau de ces différents pathogènes.

## **1. PERSISTANCE DE LA VIABILITE ET DU GENOME DE *CAMPYLOBACTER JEJUNI* A 4°C ET 22°C**

Cette étude a été réalisée sur une souche de *C. jejuni* prise comme «modèle». La persistance de la viabilité de *C. jejuni* et de son génome (ADN nu et ADN intracellulaire) a été suivie sur une période de 30 jours à 4°C et 22°C, (i) dans une eau collectée dans la rivière Moselle au niveau du point de captage de la station E, (ii) dans l'eau de la nappe alluviale située en bord de Moselle et également captée par la station E pour produire de l'eau d'alimentation, et (iii) dans l'eau d'alimentation produite par cette même station et qui est la résultante d'un mélange d'eau de rivière traitée (60%) et d'eau de nappe (40%). Cette eau est traitée par chloration après mélange à une teneur de 0,71 mg/L de chlore libre et 0,95 mg/L de chlore total.

Pour suivre l'évolution au cours du temps de la viabilité des bactéries et de l'ADN intracellulaire, nous avons artificiellement contaminé les eaux citées ci-dessus avec une suspension de *C. jejuni* (souche NCTC 11168) de façon à obtenir une concentration finale en bactéries viables d'environ  $10^4$  UFC/mL. Après homogénéisation des suspensions de travail, celles-ci ont été réparties en portions d'1 mL dans des tubes en verre borosilicaté puis incubées à l'obscurité dans une enceinte thermostatée dont la température est contrôlée à 4°C et 22°C via une centrale de température. L'inactivation des bactéries au cours du temps a été mesurée sur les échantillons collectés régulièrement par culture sur gélose mCCDA en employant la méthode d'étalement de dilutions décimales successives. Parallèlement une mesure de la quantité de génome intracellulaire a été opérée par PCR quantitative en temps réel en analysant l'intégralité du volume d'essai (1mL).

Pour suivre la dégradation du génome nu, une seconde série d'expérimentations opérées sur les mêmes eaux et en respectant les mêmes conditions de préparation, a été réalisée. L'ADN nu employé est issu de bactéries *C. jejuni* (souche NCTC 11168) dont le génome a été extrait deux fois successivement par combinaison d'un cycle thermique (100°C, 10 min/-80°C, 10 min) suivi d'une purification de l'ADN nu à l'aide du kit QIAmp viral RNA mini kit (Qiagen). La réalisation d'une double extraction successive avait pour objectif de s'assurer de travailler avec de l'ADN nu débarrassé de protéines. La dégradation du génome nu a été suivie par PCR quantitative en temps réel en analysant également l'intégralité du volume d'essai (1 mL) sur des échantillons collectés régulièrement.

### 1.1. Persistence de *C. jejuni* dans la Moselle

La dégradation du génome intracellulaire et nu ainsi que la perte de viabilité de *C. jejuni* ont été suivies sur une période de 30 jours à 4°C et 22°C, dans la même eau de Moselle. Les résultats sont présentés sur la Figure 70 et la Figure 71, ainsi que dans le Tableau 80.

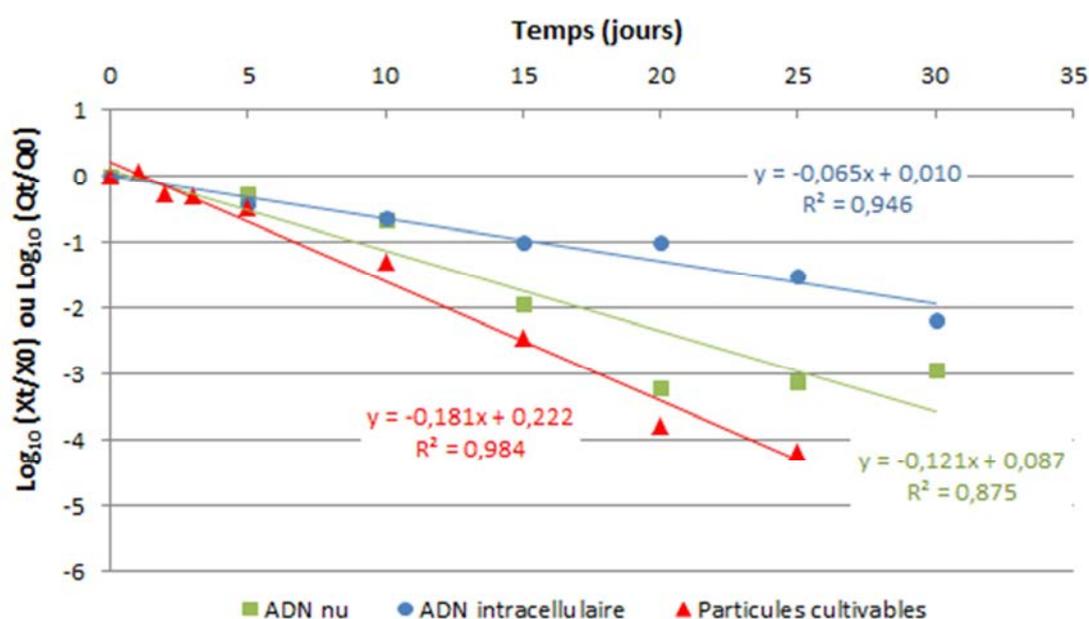


Figure 70: Perte de viabilité et dégradation du génome (ADN intracellulaire et ADN nu) de *C. jejuni* dans la Moselle à 4°C

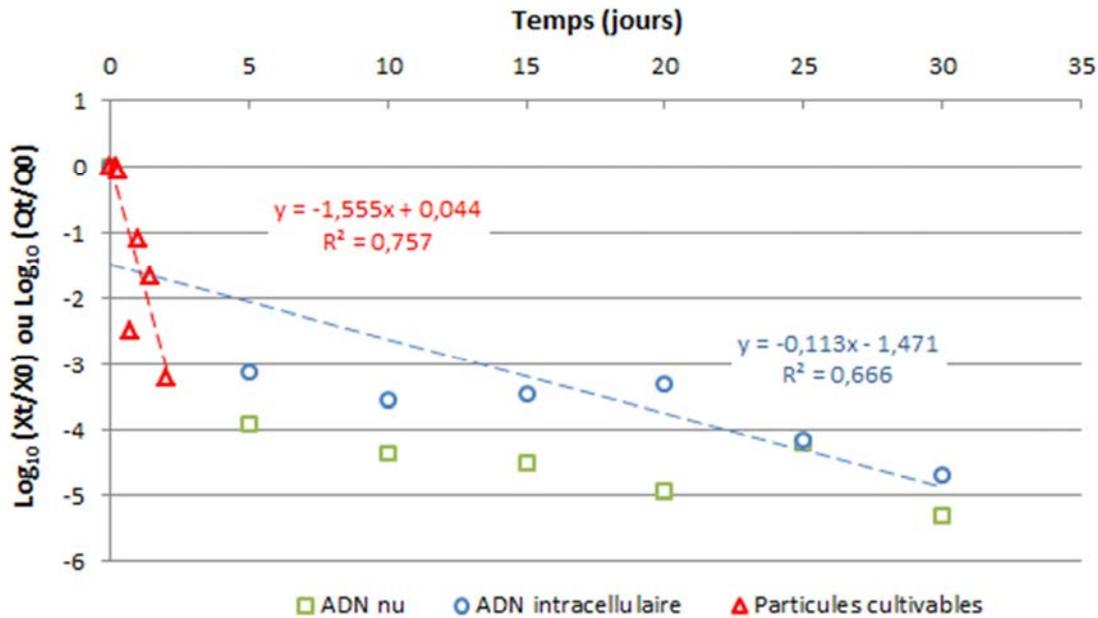


Figure 71: Perte de viabilité et dégradation du génome (ADN intracellulaire et ADN nu) de *C. jejuni* dans la Moselle à 22°C

Tableau 80: Modélisation de la perte de viabilité et de la dégradation du génome (ADN intracellulaire et ADN nu) de *C. jejuni* dans la Moselle à 4°C et 22°C

Conditions expérimentales	n	Pente	p	T <sub>90</sub> (jours)	Intervalle de confiance (à 95%)	
Génome intracellulaire	4°C	7	-0,065	0,0002	15,5	[12,1-21,4]
	22°C	7	-0,113	0,025	8,8	[4,9-47,4]
Génome nu	4°C	7	-0,121	0,002	8,2	[5,4-14,6]
	22°C	7		ns		
Viabilité	4°C	9	-0,181	<0,0001	5,5	[4,9-6,2]
	22°C	7	-1,555	0,011	0,6	[0,4-1,8]

ns: non significatif au risque 5%

- Les résultats obtenus concernant la viabilité des bactéries mettent en évidence une perte progressive et régulière au cours du temps, quelle que soit la température d'incubation testée. L'augmentation de la température d'incubation de 4°C à 22°C affecte significativement le comportement des bactéries dans l'eau de rivière (Test de Student,  $p < 0,05$ ), avec une perte de 90% (1  $\log_{10}$ ) de la population mesurée au bout de 0,6 jours à 22°C alors qu'elle se réalise en 5,5 jours à 4°C.

- Concernant l'ADN intracellulaire à 4°C, il est constaté une perte progressive au cours du temps ce qui nous a permis de calculer un  $T_{90}$  à 15,5 jours. Une différence de persistance de l'ADN intracellulaire a été relevée lorsque la température d'incubation était portée à 22°C, où une dégradation plus rapide est constatée. A l'inverse de celle constatée à 4°C, l'allure de la cinétique obtenue à 22°C n'est pas linéaire mais plutôt biphasique, avec une perte rapide de 3  $\log_{10}$  après 5 jours d'incubation, suivie d'une phase progressive de diminution d'environ 1  $\log_{10}$  en 25 jours. Un  $T_{90}$  de 8,8 jours a été déterminé en prenant en compte l'ensemble des points de la cinétique.
- Pour l'ADN nu, une perte progressive de la quantité d'ADN est constatée à 4°C, ce qui nous a permis d'estimer un  $T_{90}$  à 8,2 jours. A 22°C, comme pour l'ADN intracellulaire, une perte similaire en deux temps est constatée.

***D'un point de vue comparatif, à 4°C il existe une différence significative de comportement sur la période de 30 jours entre la perte de la viabilité et celle du génome intracellulaire qui persiste nettement plus longtemps (Test de Student,  $p < 0,05$ ). En revanche, il n'y a pas de différence significative entre la perte de viabilité et celle de l'ADN nu ni entre celle du génome intracellulaire et le génome libre. A 22°C, il est difficile de réaliser une évaluation statistique compte tenu de l'allure différente des cinétiques obtenues, même si celles en lien avec le génome mettent en évidence une persistance toujours plus importante. Toutefois, il semble qu'une perte importante soit observée dans les premiers jours de l'expérimentation, quelle que soit l'entité considérée (viabilité, génome intracellulaire et nu).***

## **1.2. Persistance de *C. jejuni* dans la nappe alluviale à 4°C et 22°C**

La dégradation du génome intracellulaire et nu ainsi que la persistance de viabilité de *C. jejuni* ont été suivies dans l'eau de nappe alluviale sur une période de 30 jours à 4°C et 22°C. Les résultats sont présentés sur la Figure 72 et la Figure 73, ainsi que dans le Tableau 81.

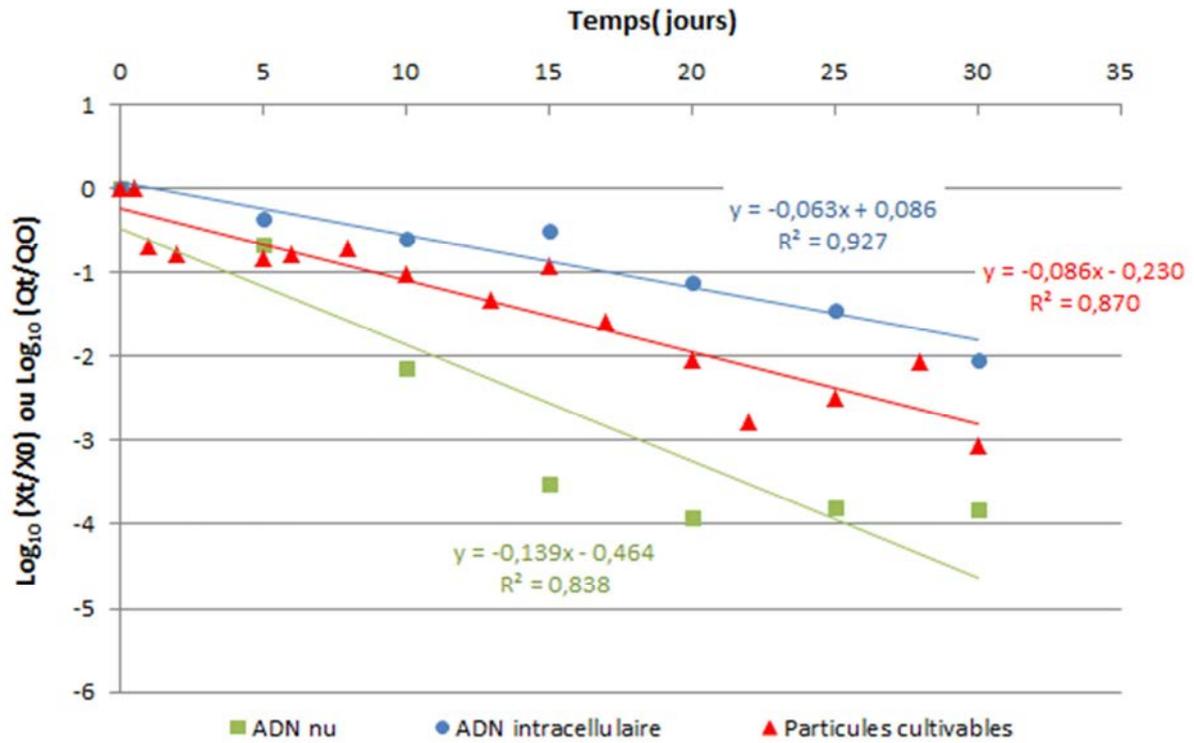


Figure 72: Perte de viabilité et dégradation du génome (ADN intracellulaire et ADN nu) de *C. jejuni* dans la nappe alluviale à 4°C

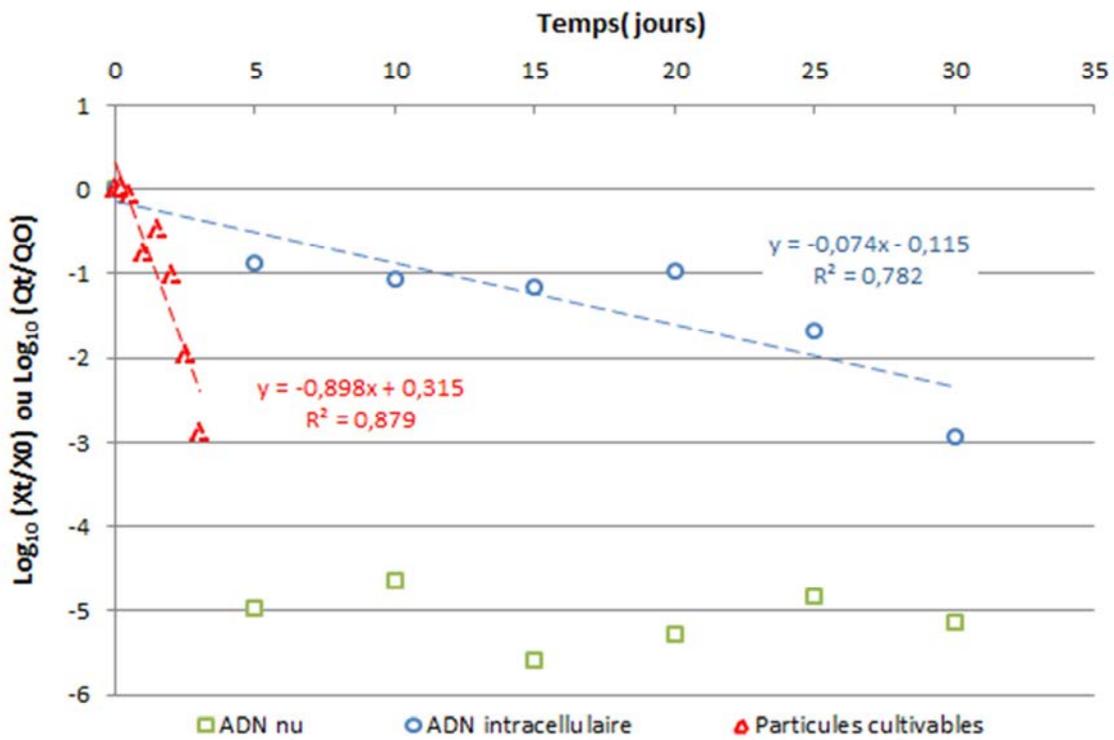


Figure 73: Perte de viabilité et dégradation du génome (ADN intracellulaire et ADN nu) de *C. jejuni* dans la nappe alluviale à 22°C

Tableau 81: Modélisation de la perte de viabilité et de la dégradation du génome (ADN intracellulaire et ADN nu) de *C. jejuni* dans la nappe alluviale à 4°C et 22°C

Conditions expérimentales		n	Pente	p	T <sub>90</sub> (jours)	Intervalle de confiance (à 95%)
Génome intracellulaire	4°C	7	-0,063	0,0005	15,9	[12-23,5]
	22°C	7	-0,074	0,008	13,6	[8,4-34,6]
Génome nu	4°C	7	-0,139	0,004	7,2	[4,8-14,5]
	22°C	7		ns		
Viabilité	4°C	16	-0,086	<0,0001	11,7	[9,5-14]
	22°C	8	-0,898	0,0005	1,1	[0,8-1,8]

ns: non significatif au risque 5%

- Concernant la perte de viabilité de *C. jejuni* mesurée par culture sur milieu gélosé, il est observé, à 4°C et à 22°C, une perte progressive au cours du temps conduisant à des T<sub>90</sub> significativement très différents qui sont respectivement de 11,7 jours et 1,1 jour (Test de Student, p<0,05).

- Cette différence de comportement n'a en revanche pas été observée pour l'ADN intracellulaire au cours des 30 jours de stockage. Les T<sub>90</sub> estimés à partir des cinétiques linéaires obtenues sont respectivement de 15,9 jours et 13,6 jours pour des températures de stockage de 4°C et 22°C.

- Pour l'ADN nu, à 4°C une perte progressive est mesurée au cours du temps et conduit à la détermination d'un T<sub>90</sub> de 7,2 jours. A 22°C, nous observons une accélération de la dégradation du génome nu entraînant une perte de plus de 4,5 log<sub>10</sub> en 5 jours suivi d'une seconde phase stationnaire pendant tout le reste de l'expérimentation. Compte tenu de l'allure de la cinétique obtenue, il n'a pu être estimé un T<sub>90</sub> pour cette dernière condition.

***D'un point de vue comparatif, dans l'eau de nappe à 4°C, la comparaison des cinétiques traduisant la perte de la viabilité des bactéries et de celle du génome intracellulaire ne met pas en évidence une différence significative de comportement à cette température, alors qu'il existe une différence significative d'une part entre le comportement du génome nu et celui du génome intracellulaire, et d'autre part entre le comportement du génome nu et la viabilité. En revanche à 22°C, il existe une différence significative entre la perte de la viabilité et celle du génome intracellulaire au cours du temps. Compte tenu des cinétiques obtenues pour le génome nu à cette dernière température, il n'a pu être réalisé de tests statistiques adéquats.***

### 1.3. Persistence de *C. jejuni* dans l'eau d'alimentation

L'évolution de la viabilité des bactéries, de la quantité d'ADN intracellulaire et du génome nu a été mesurée sur une période de 30 jours dans l'eau d'alimentation collectée en sortie de la station de traitement du site E. De manière à mettre en évidence l'influence du traitement final de chloration, nous avons ajouté à l'eau du chlore à une concentration de 0,95 mg/L en chlore total et 0,71 mg/L en chlore libre juste avant le dopage. Cette concentration correspond à la quantité moyenne obtenue en fin de traitement au niveau de ce site. De manière à suivre la consommation du chlore au cours du temps, des mesures de la quantité de chlore libre et total ont été réalisées parallèlement sur des échantillons de volumes plus conséquents, également dopés en micro-organismes ou en génome, stockés dans les mêmes conditions. Les résultats sont présentés sur la Figure 74.

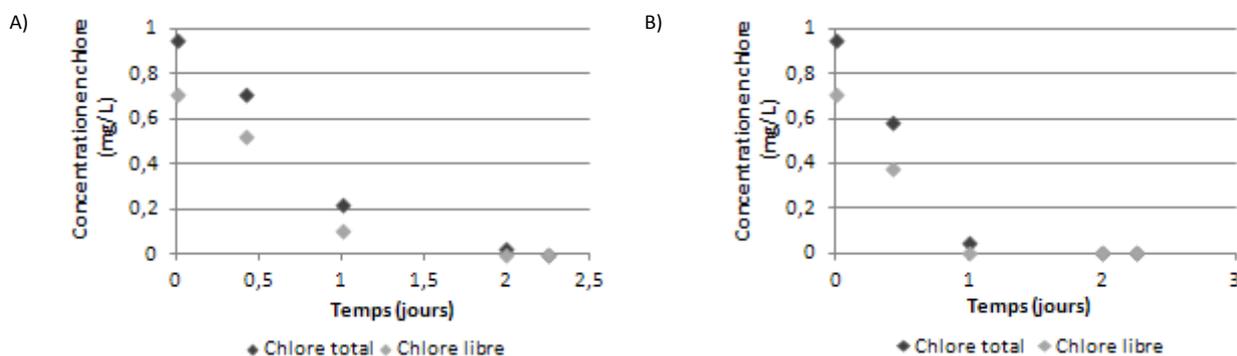


Figure 74: Evolution de la concentration en chlore (libre et total) dans l'eau traitée au cours du temps à 4°C (A) et 22°C (B)

Les résultats présentés sur la Figure 74 montrent que dans les conditions retenues, le chlore est complètement consommé en moins de trois jours quelle que soit la température de stockage. Une concentration en chlore total supérieure ou égale à 0,5 mg/L est maintenue pendant un temps de stockage de 0,6 jours à 4°C et 0,5 jours à 22°C. Compte tenu de ces derniers résultats, la persistance de la viabilité, du génome intracellulaire ou du génome nu doit être interprétée différemment selon le temps de stockage considéré.

L'inactivation des bactéries au cours du temps, ainsi que la dégradation du génome nu et intracellulaire ont été mesurées à partir d'échantillons collectés régulièrement dont le chlore a été préalablement neutralisé par du thiosulfate de sodium avant l'analyse de l'échantillon. Les résultats obtenus à 4° et 22°C sont présentés sur la Figure 75 et le Tableau 82.

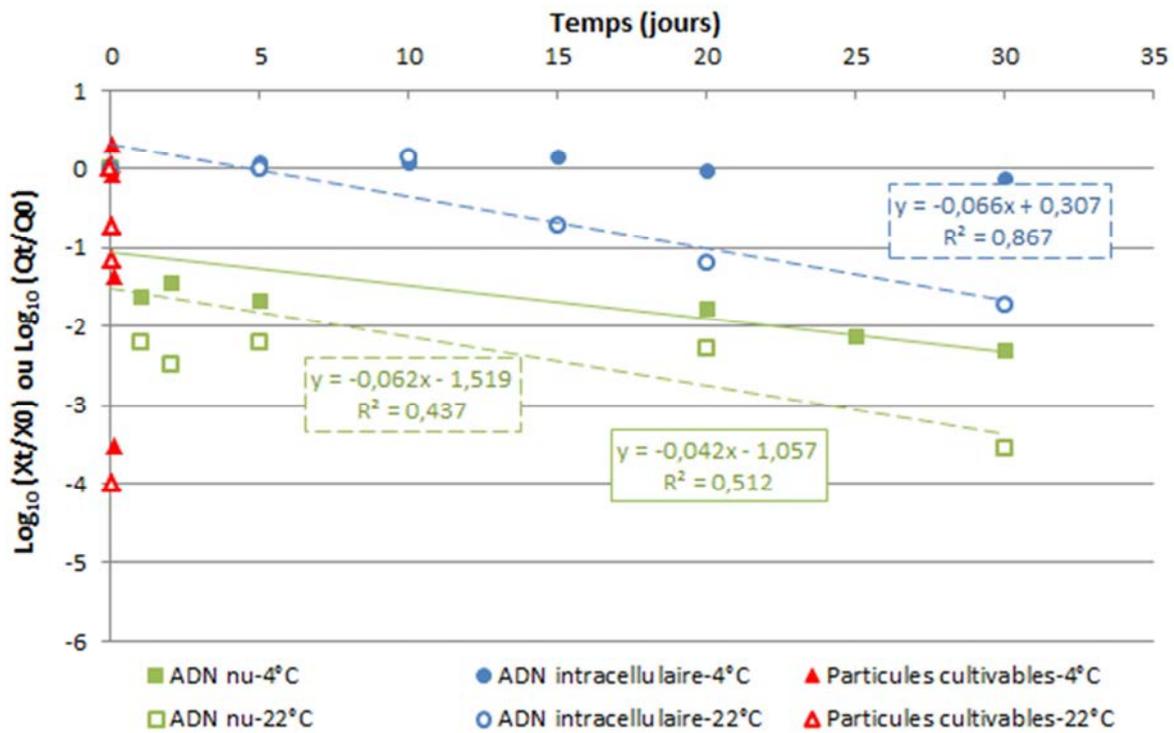


Figure 75: Perte de viabilité et dégradation du génome (ADN intracellulaire et ADN nu) de *C. jejuni* dans l'eau d'alimentation chlorée à 4 et 22°C

Tableau 82: Modélisation de la perte de viabilité et de la dégradation du génome (ADN intracellulaire et ADN nu) de *C. jejuni* dans l'eau d'alimentation chlorée à 4°C et 22°C

Conditions expérimentales	n	Pente	p	T <sub>90</sub> (jours)	Intervalle de confiance (à 95%)	
<b>Génome intracellulaire</b>	4°C	6	ns			
	22°C	6	-0,066	0,007	15,2	[9,9-33,3]
<b>Génome nu</b>	4°C	7	-0,059	0,015	16,9	[9,9-59]
	22°C	7	-0,062	0,017	11,5	[6,6-43,7]
<b>Viabilité</b>	4°C	6	ns			
	22°C	4	ns			

ns: non significatif au risque 5%

- Dans l'eau d'alimentation, il est constaté que la perte de viabilité de *C. jejuni* est extrêmement rapide quelle que soit la température d'incubation. Moins de 3 minutes d'incubation sont nécessaires pour inactiver la totalité des bactéries à 4°C et 22°C.

- Concernant le génome intracellulaire, il n'a pas été observé de dégradation au cours des 30 jours de stockage à 4°C. L'augmentation de la température d'incubation de 4°C à 22°C provoque une diminution progressive de la quantité de génome intracellulaire dans l'eau. Un  $T_{90}$  de 15,2 jours a été calculé pour cette dernière condition.

- Pour le génome nu, quelle que soit la température d'incubation, il est tout d'abord constaté une diminution rapide de la quantité de génome dans un premier temps (5 jours) de l'ordre de 1 à 2  $\log_{10}$  selon la température, puis une perte progressive et faible dans un second temps (jusqu'à 30 jours) à 22°C.

***D'un point de vue comparatif, dans l'eau d'alimentation, il existe clairement une différence significative entre la persistance de la viabilité et celle du génome intracellulaire à 4°C et 22°C (Test de student,  $p < 0,05$ ). Une différence de comportement est également observée entre le génome intracellulaire et le génome libre, tout au moins dans les premiers jours de stockage, puisqu'après 5 jours, quelle que soit la température d'incubation, la perte constatée est peu différente pour ces deux entités. A l'inverse, entre la persistance de la viabilité et celle du génome libre, si le comportement est peu différent en début d'expérimentation, il le devient dans la seconde partie après 5 jours de stockage.***

## **2. PERSISTANCE DU POUVOIR INFECTIEUX ET DU GENOME DE L'ADENOVIRUS 1 A 4°C ET 22°C**

Cette étude a été réalisée avec une souche virale humaine d'adénovirus 1 humain prise comme « modèle ». La persistance de l'infectiosité et du génome (ADN nu et ADN encapsidé) a été suivie sur une période de 30 jours à 4°C et 22°C, (i) dans une eau collectée dans la rivière Moselle au niveau du point de captage de la station E, (ii) dans une eau de nappe alluviale employée pour produire de l'eau d'alimentation de la station E, et (iii) dans l'eau d'alimentation produite par cette même station de potabilisation résultant du mélange de l'eau de rivière traitée (60%) et de l'eau de nappe (40%).

Pour suivre l'évolution de la perte de l'infectiosité et de la dégradation de l'ADN encapsidé du virus au cours du temps, nous avons artificiellement contaminé les eaux étudiées avec une suspension virale de façon à obtenir une concentration finale d'environ  $10^4$  TCID<sub>50</sub>/mL. Après homogénéisation des suspensions de travail, celles-ci ont été réparties en portions d'1 mL dans des tubes en verre borosilicaté et incubées à l'obscurité dans une enceinte thermostatée à 4°C et 22°C dont la température est contrôlée via une centrale de température. L'inactivation virale au cours du temps a été mesurée sur des échantillons collectés régulièrement en employant une méthode de culture cellulaire à partir de plusieurs dilutions décimales successives. Parallèlement une mesure de la quantité de génome encapsidé a été opérée par PCR quantitative en temps réel au cours du temps en analysant l'intégralité du volume d'essai (1mL).

Pour suivre la dégradation du génome nu, une seconde série d'expérimentations opérées sur les mêmes eaux et en respectant les mêmes conditions de préparation, ont été réalisées. Le stock d'ADN nu employé, issu du stock d'adénovirus 1, a été obtenu après une double extraction à l'aide du kit QIAmp viral RNA mini kit (Qiagen). La réalisation de deux extractions successives avait pour objectif de s'assurer de travailler avec de l'ADN nu exempt de protéines. La dégradation du génome nu a été suivie par PCR temps réel en analysant l'intégralité du volume d'essai (1mL).

### 2.1. Persistence de l'adénovirus 1 dans la Moselle

L'inactivation virale et la dégradation du génome (ADN nu et ADN encapsidé) ont été suivies à 4°C et 22°C sur une période de 30 jours dans de l'eau de la Moselle. Les résultats sont présentés sur la Figure 76 et la Figure 77 ainsi que dans le Tableau 83.

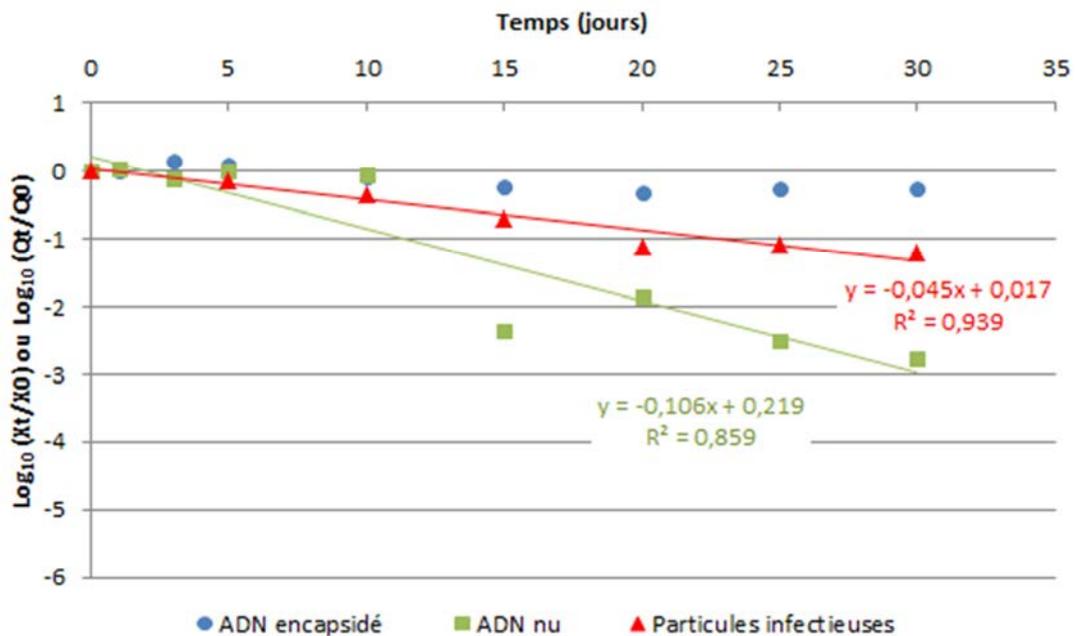


Figure 76: Inactivation des particules virales infectieuses et dégradation du génome (ADN encapsidé et ADN nu) dans la Moselle à 4°C

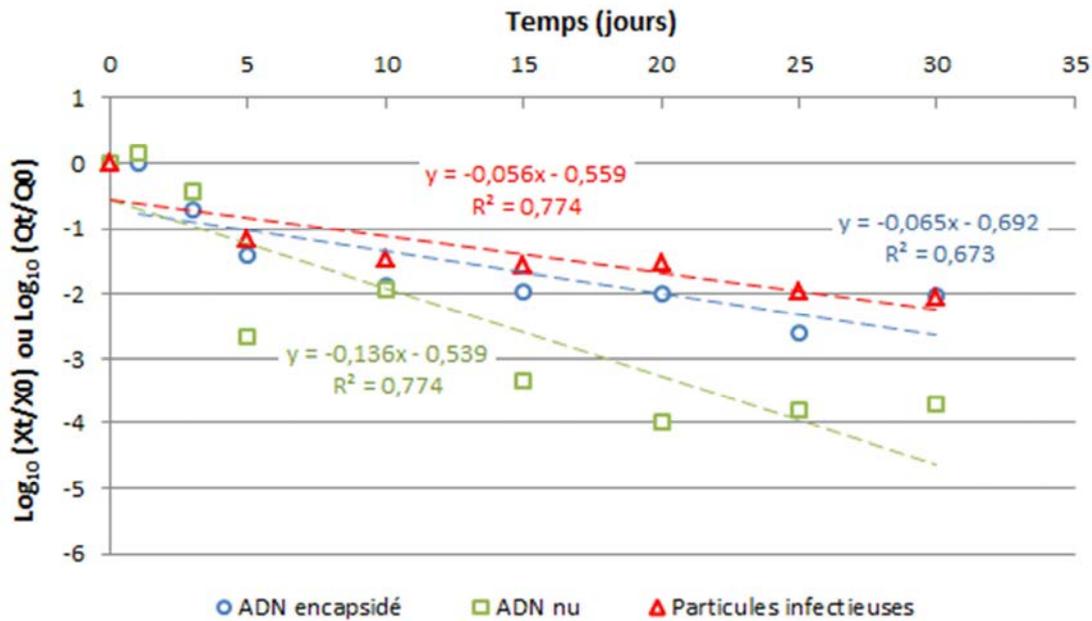


Figure 77: Inactivation des particules virales infectieuses et dégradation du génome (ADN encapsidé et ADN nu) dans la Moselle à 22°C

Tableau 83: Modélisation de l'inactivation virale et de la dégradation du génome (ADN encapsidé et ADN nu) de l'adénovirus 1 dans la Moselle à 4°C et 22°C

Conditions expérimentales	n	Pente	p	T <sub>90</sub> (jours)	Intervalle de confiance (à 95%)	
Génome encapsidé	4°C	9	ns			
	22°C	9	-0,064	0,004	15,6	[9,9-36,5]
Génome nu	4°C	9	-0,106	0,0003	9,4	[6,9-14,7]
	22°C	9	-0,136	0,002	7,3	[5-14,2]
Infectiosité	4°C	7	-0,045	0,0003	22,1	[17,1-31,3]
	22°C	7	-0,055	0,009	18	[11,1-47,7]

ns: non significatif au risque 5%

- Concernant l'inactivation virale, il est constaté à 4°C et 22°C une diminution progressive de l'infectiosité au cours du temps conduisant à des T<sub>90</sub> peu différents, respectivement 22,1 jours et 18 jours.
- Pour l'ADN encapsidé, compte tenu d'une variation non significative de la quantité de génome mesurée par PCR temps réel à 4°C au cours du temps, il n'a pas été possible d'estimer de T<sub>90</sub>. En revanche, à 22°C un T<sub>90</sub> proche de celui estimé pour l'infectiosité (15,6 jours) a pu être déterminé à partir des différents points de mesure obtenus.

- Pour l'ADN nu, quelle que soit la température de stockage, il est observé une perte plus rapide de la quantité de génome avec des  $T_{90}$  similaires estimés à 9,4 jours à 4°C et 7,3 jours à 22°C.

*La comparaison des résultats met en évidence une légère différence de comportement entre le génome encapsidé et l'infectiosité à 4°C mais pas à 22°C où il est observé un comportement similaire entre les deux entités. Concernant le génome nu, la perte au cours du temps est significativement plus rapide que celle de l'infectiosité à 4°C et 22°C (Tests de Student,  $p < 0.05$ ). Le comportement du génome nu est également différent de celui de l'ADN encapsidé sur toute la période de l'étude.*

## 2.2. Persistence de l'adénovirus 1 dans la nappe alluviale

La dégradation du génome encapsidé et nu ainsi que la persistance de l'infectiosité de l'adénovirus 1 ont été suivies dans l'eau de nappe alluviale pendant une période de 30 jours à 4°C et 22°C. Les résultats sont présentés sur la Figure 78 et la Figure 79 ainsi que dans le Tableau 84.

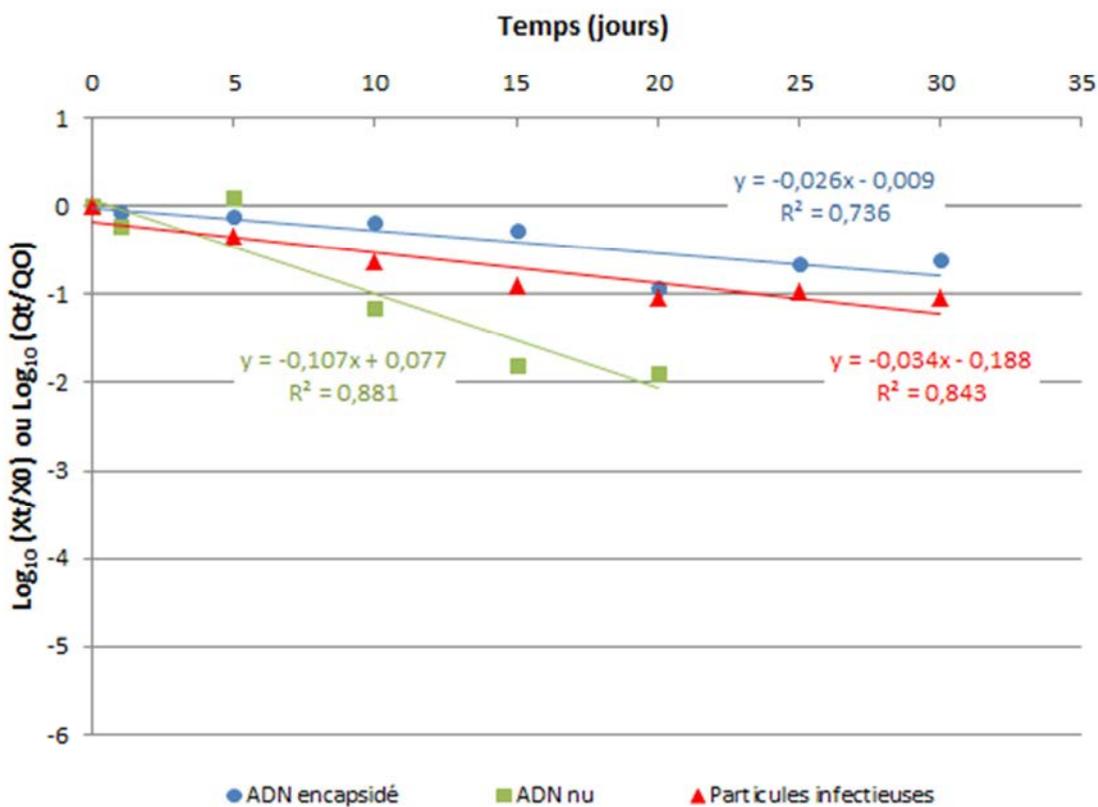


Figure 78: Inactivation des particules virales infectieuses et dégradation du génome (ADN encapsidé et ADN nu) dans la nappe alluviale à 4°C

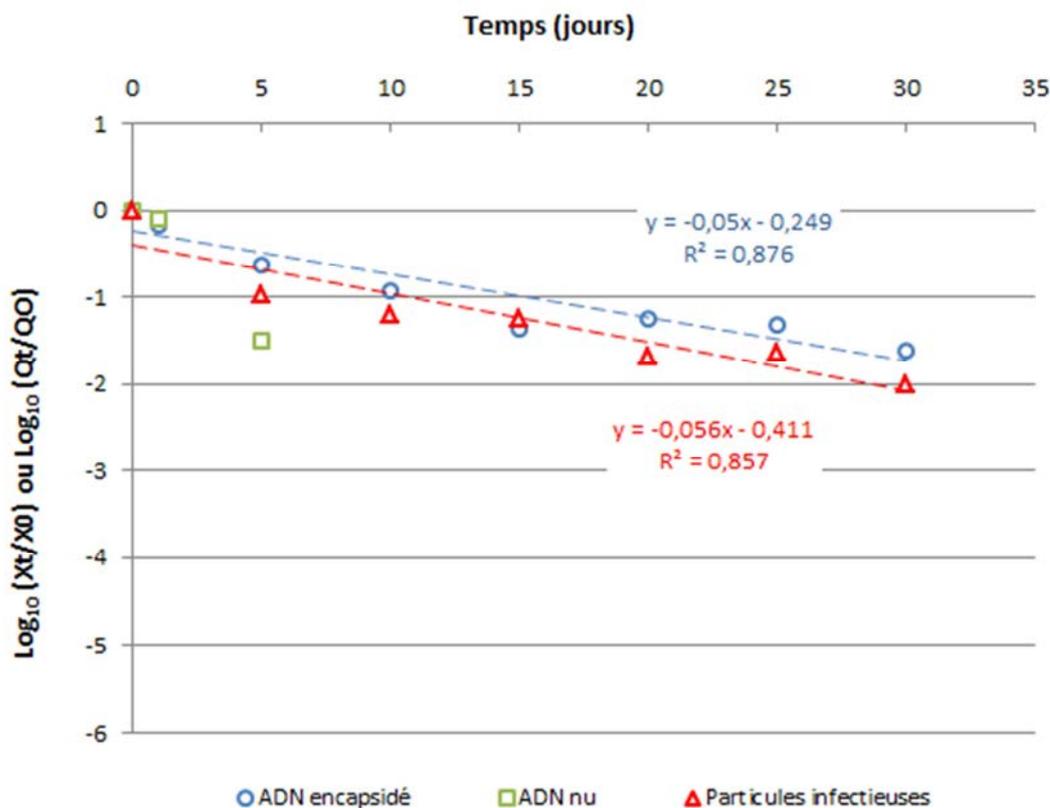


Figure 79: Inactivation des particules virales infectieuses et dégradation du génome (ADN encapsidé et ADN nu) dans la nappe alluviale à 22°C

Tableau 84: Modélisation de l'inactivation virale et de la dégradation du génome (ADN encapsidé et ADN nu) de l'adénovirus 1 dans la nappe alluviale à 4°C et 22°C

Conditions expérimentales	n	Pente	p	T <sub>90</sub> (jours)	Intervalle de confiance (à 95%)	
Génome encapsidé	4°C	8	-0,026	0,006	38,8	[24,3-96,5]
	22°C	8	-0,05	0,0006	20,1	[14,6-32,3]
Génome nu	4°C	6	-0,107	0,002	9,3	[6,2-19]
	22°C	3		ns		
Infectiosité	4°C	7	-0,034	0,003	29,2	[19,6-57,9]
	22°C	7	-0,056	0,003	17,9	[12,2-33,8]

ns: non significatif au risque 5%

- En ce qui concerne l'inactivation virale dans l'eau de nappe, il est observé une perte progressive plus rapide à 22°C par rapport à 4°C, ce qui conduit à des T<sub>90</sub> respectivement de 29,2 jours et 17,9 jours.

- Pour l'ADN encapsidé, la perte mesurée au cours du temps est également progressive et différente selon la température. Ainsi un  $T_{90}$  de 38,8 jours est obtenu à 4°C alors qu'il est de 20,1 jours à 22°C.
- La durée de l'expérimentation a suffi à dégrader l'ensemble des particules d'ADN nu à 4°C et 22°C avec des concentrations en ADN qui deviennent inférieures aux limites de détection après 5 jours d'incubation à 22°C et 20 jours d'incubation à 4°C.

***L'analyse statistique en lien avec la comparaison de la persistance du génome encapsidé et du pouvoir infectieux montre qu'il n'existe pas de différence significative de comportement entre ces deux entités quelle que soit la température d'incubation (Test de Student,  $p>0,05$ ), alors qu'une différence de comportement est constatée entre le génome nu et (i) le génome encapsidé ou (ii) avec l'infectiosité.***

### **2.3. Persistence de l'adénovirus 1 dans l'eau d'alimentation chlorée.**

L'inactivation des particules virales infectieuses et la dégradation de génome encapsidé et du génome nu ont été mesurées sur une période de 30 jours dans l'eau d'alimentation collectée en sortie de la station de traitement du site E. De manière à mettre en évidence l'influence du traitement final de chloration, du chlore à une concentration de 0,95 mg/L, correspondant à la quantité moyenne obtenue en fin de traitement au niveau de ce site, a été ajouté à l'eau juste avant le dopage. Les résultats des expérimentations réalisées en parallèle pour suivre la consommation du chlore au cours du temps, montrent que le chlore est complètement consommé en moins de deux jours quelle que soit la température de stockage (Figure 74). Une concentration supérieure ou égale à 0,5 mg/L est maintenue pendant un temps de stockage de 0,6 jours. Compte tenu de ces derniers résultats, la persistance de l'infectiosité, du génome intracellulaire ou du génome nu doit être interprétée différemment selon le temps de stockage considéré.

L'inactivation des particules virales au cours du temps, ainsi que la dégradation du génome nu et encapsidé ont été mesurées à partir d'échantillons collectés régulièrement dont le chlore a été préalablement neutralisé par du thiosulfate de sodium avant l'analyse de l'échantillon. Les résultats obtenus à 4° et 22°C sont présentés sur la Figure 80 et le Tableau 85.

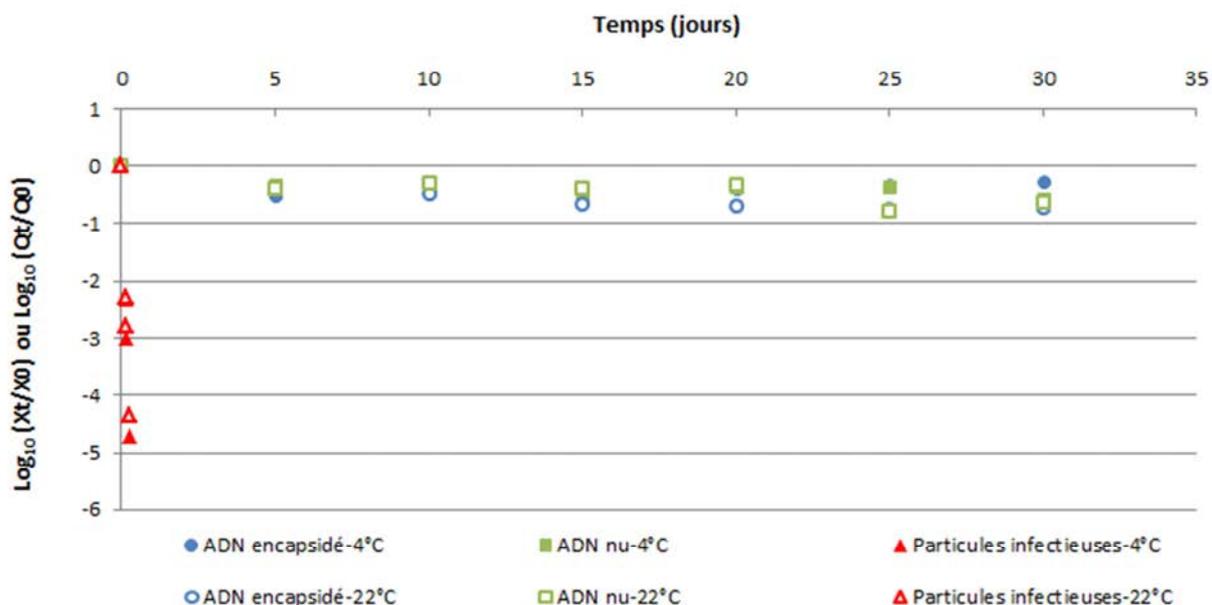


Figure 80: Inactivation des particules virales infectieuses et dégradation du génome (ADN encapsidé et ADN nu) de l'adénovirus 1 dans l'eau d'alimentation chlorée à 4°C et 22°C

Tableau 85: Modélisation de l'inactivation des particules virales infectieuses et dégradation du génome (ADN encapsidé et ADN nu) de l'adénovirus 1 dans l'eau d'alimentation chlorée à 4°C et 22°C

Conditions expérimentales	n	Pente	p	T <sub>90</sub> (jours)	Intervalle de confiance (à 95%)	
Génome encapsidé	4°C	7	ns			
	22°C	7	-0,021	0,01	47,3	[28,7-133,9]
Génome nu	4°C	7	-0,013	0,04	74,9	[38,9-979,9]
	22°C	7	-0,019	0,02	52,5	[29,6-233,7]
Infectiosité	4°C	4	-18,72	0,001	0,05	[0,05-0,06]
	22°C	4	-17,26	0,001	0,06	[0,05-0,07]

ns: non significatif au risque 5%

- Au vu des résultats quantitatifs obtenus en culture cellulaire, il apparaît que les particules infectieuses sont très rapidement inactivées au cours du temps lorsque l'eau est chlorée. Une perte complète de l'infectiosité est observée après seulement 6 heures d'incubation et ce quelle que soit la température.

- Concernant la dégradation du génome encapsidé, il n'est pas observé de perte de plus d'1 log<sub>10</sub> aux deux températures d'incubation sur la période d'étude fixée. A 4°C, il n'a pu être estimé de T<sub>90</sub> durant les 30 jours de l'expérimentation. En revanche à 22°C, un T<sub>90</sub> de 47,3 jours a été déterminé.

- Pour l'ADN nu, comme pour l'ADN encapsidé, les variations de quantités sont relativement faibles au cours du temps et peu différentes. Des  $T_{90}$  de 74,9 jours et 52,5 jours ont été estimés à ces deux températures d'incubation respectivement.

***Dans l'eau d'alimentation, il est observé un comportement différent entre la persistance de l'infectiosité de l'adénovirus 1 et celle du génome encapsidé ou nu dans l'eau d'alimentation. La persistance du génome, quelle que soit sa forme et quelle que soit la température d'incubation, est significativement plus importante que celle du pouvoir infectieux au cours du temps (Tests de Student,  $p < 0,05$ ).***

### **3. PERSISTANCE DE LA VIABILITE ET DU GENOME DE *CRYPTOSPORIDIUM PARVUM* A 4°C ET 22°C**

L'évolution de la quantité de génome (ADN intracellulaire et ADN nu) ainsi que de la quantité d'oocystes totaux et viables de *C. parvum* a été évaluée sur une période de 30 jours, (i) dans une eau collectée dans la Moselle, (ii) dans la nappe alluviale, et (iii) dans l'eau d'alimentation produite au niveau de la station E à deux températures différentes, 4°C et 22°C. Les expérimentations ont été organisées de la même manière que pour les deux autres micro-organismes. Ainsi, pour chaque type d'eau testé, deux solutions de travail ont été préparées, l'une pour suivre l'évolution de la quantité d'oocystes (viables et totaux) ainsi que celle du génome intracellulaire, l'autre pour suivre l'évolution de la quantité d'ADN nu au cours du temps. Dans le premier cas, les eaux ont été artificiellement contaminées avec une suspension d'oocystes *C. parvum* dont la proportion d'oocystes viables a été estimée à plus de 95%, de manière à obtenir une concentration finale de  $10^4$  oocystes/mL. La deuxième solution a été préparée en contaminant artificiellement les eaux étudiées avec une suspension d'ADN nu issu d'une double extraction d'une suspension d'oocystes viables par combinaison de trois cycles thermiques (100°C, 5 min/ -80°C, 5 min) et d'une purification de l'ADN à l'aide du kit QIAmp viral RNA mini kit (Qiagen).

Après homogénéisation, les deux suspensions de travail ont été réparties sous des volumes de 1 mL dans les tubes en verre borosilicaté qui ont été stockés à l'obscurité à 4°C et 22°C dans des enceintes thermostatées dont les températures sont contrôlées via une centrale de température.

L'évolution de la quantité d'oocystes totaux a été suivie en triplicat sur des volumes de 20  $\mu$ L par immunofluorescence directe à l'aide d'un couplage d'anticorps monoclonaux couplés au fluorochrome FITC et de colorant vital DAPI. Pour suivre l'inactivation des oocystes, la méthode de détection par couplage du fluorochrome FITC avec un marqueur de létalité, l'iodure de propidium, a été employée en triplicat sur des volumes de 100  $\mu$ L d'échantillon. La dégradation du génome (ADN nu et ADN intracellulaire) au cours du temps a été suivie par PCR en temps réel sur la totalité de l'échantillon (1 mL).

### 3.1. Persistence de *C. parvum* dans la Moselle

Les résultats obtenus dans l'eau de Moselle prélevée au niveau du site E sont rapportés sur la Figure 81 pour la température de 4°C et sur la Figure 82 pour la température de 22°C. Les données en lien avec les cinétiques obtenues ainsi que les  $T_{90}$  estimés sont présentés dans le Tableau 86.

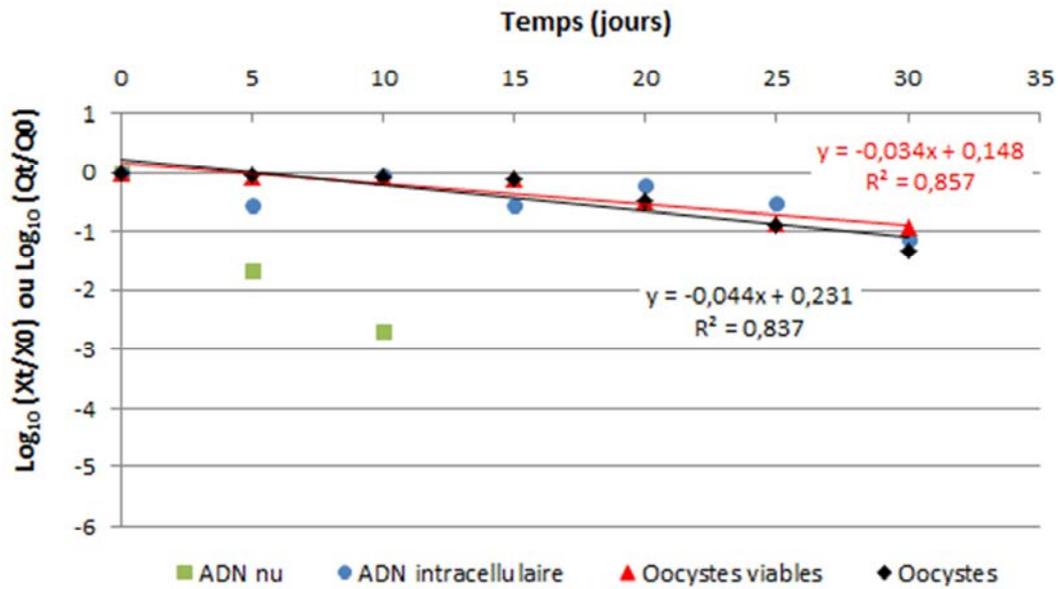


Figure 81: Evolution de la quantité d'oocystes totaux et d'oocystes viables ainsi que de la quantité de génome (ADN intracellulaire et ADN nu) de *C. parvum* dans la Moselle à 4°C

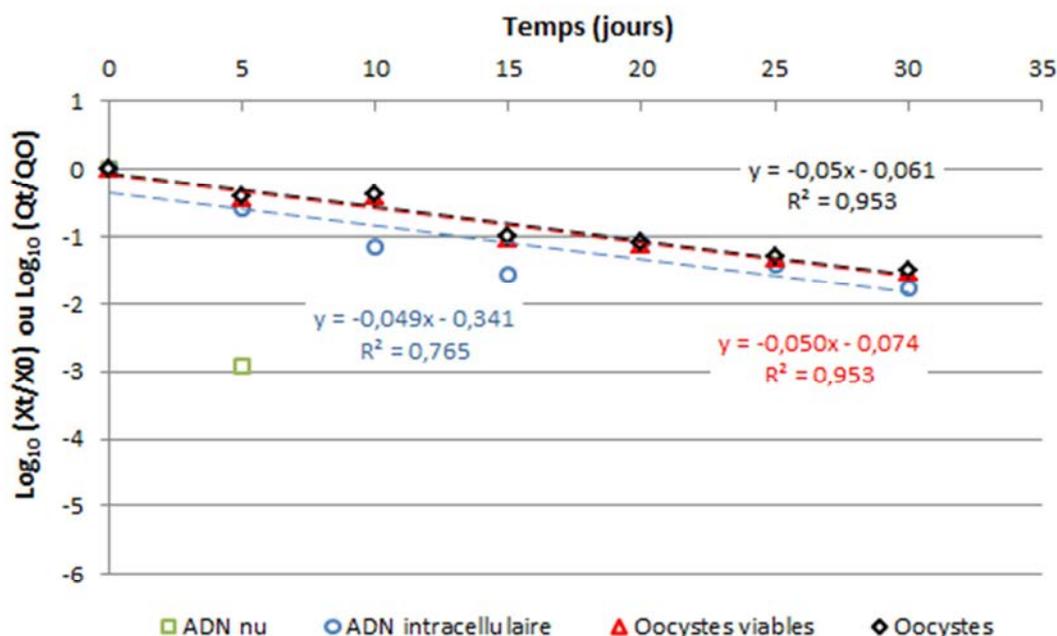


Figure 82: Evolution de la quantité d'oocystes totaux et d'oocystes viables ainsi que de la quantité de génome (ADN intracellulaire et ADN nu) de *C. parvum* dans la Moselle à 22°C

Tableau 86: Modélisation de l'évolution de la quantité d'oocystes totaux et d'oocystes viables ainsi que de la quantité de génome (ADN intracellulaire et ADN nu) de *C. parvum* dans la Moselle à 4°C et 22°C

Conditions expérimentales	n	Pente	p	T <sub>90</sub> (jours)	Intervalle de confiance (à 95%)	
Génome intracellulaire	4°C	7	ns			
	22°C	7	-0,049	0,01	20,2	[12,4-55,9]
Génome nu	4°C	3	ns			
	22°C	2	ns			
Viabilité	4°C	7	-0,034	0,003	29,2	[19,8-55]
	22°C	7	-0,05	0,0002	19,9	[15,8-26,8]
Oocystes totaux	4°C	7	-0,044	0,004	22,9	[15,2-46,5]
	22°C	7	-0,05	0,0002	20,1	[16-27]

ns: non significatif au risque 5%

Concernant l'évolution du nombre d'oocystes totaux et viables, il est constaté une perte progressive simultanée et équivalente, quelle que soit la température d'incubation. En effet, les T<sub>90</sub> obtenus d'une part pour les oocystes totaux et d'autre part pour les oocystes viables sont respectivement de 22,9 jours et 29,2 jours à 4°C et de 20,1 jours et 19,9 jours à 22°C.

- La dégradation du génome intracellulaire est significative à 22°C avec une perte d'1,8 log<sub>10</sub> après 30 jours d'incubation. Le T<sub>90</sub> obtenu à cette condition de stockage est de 20,2 jours. A 4°C, il n'a pas pu être possible d'établir une régression linéaire mais l'évolution semble également suivre celle constatée pour la mesure de la perte de viabilité ou des oocystes totaux.
- Pour l'ADN nu, nous observons une dégradation très rapide aux deux températures de stockage, avec une perte totale observée après 5 jours d'incubation à 22°C et après 10 jours d'incubation à 4°C. Du fait du faible nombre de points expérimentaux pour chaque condition testée, les cinétiques de dégradation du génome n'ont pu être modélisées par des régressions linéaires.

***L'évolution de la perte du nombre d'oocystes totaux et viables dans l'eau de rivière est peu différentes de celle du génome intracellulaire quelle que soit les conditions de stockage testées (Tests de Student, p>0,05), ce qui contraste fortement avec l'évolution de la perte du génome libre qui est très rapide au cours du temps.***

### 3.2. Persistance de *C. parvum* dans la nappe alluviale

Les résultats obtenus dans l'eau de nappe alluviale prélevée au niveau du site E concernant la dégradation du génome (ADN intracellulaire et ADN nu) et l'évolution de la quantité d'oocystes viables et totaux de *C. parvum* sont présentés sur la Figure 83 et la Figure 84, ainsi que dans le Tableau 87.

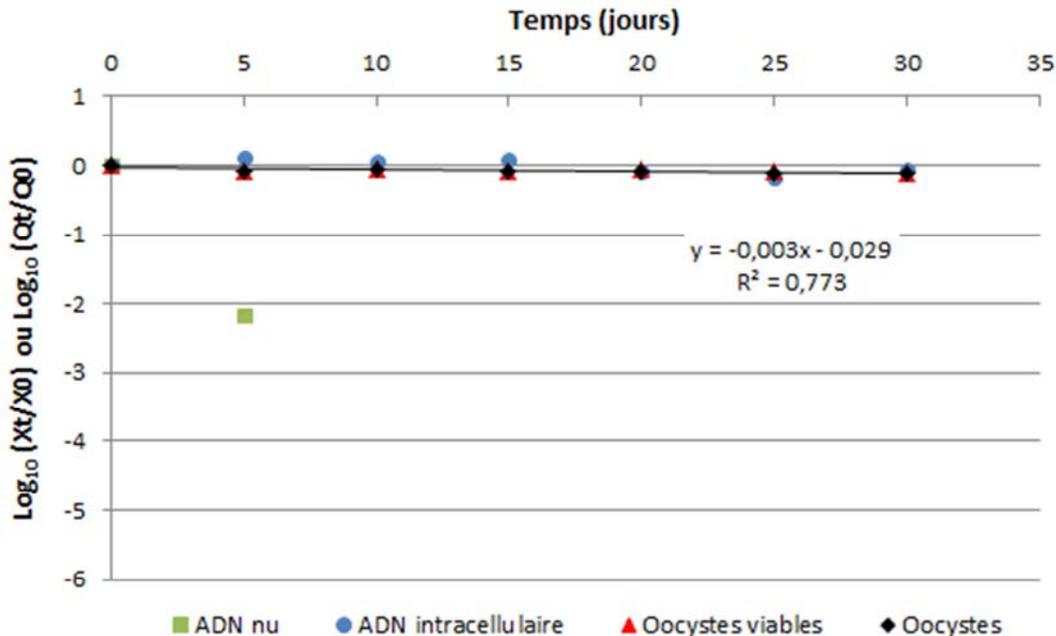


Figure 83: Evolution de la quantité d'oocystes totaux et d'oocystes viables ainsi que de la quantité de génome (ADN intracellulaire et ADN nu) de *C. parvum* dans la nappe alluviale à 4°C

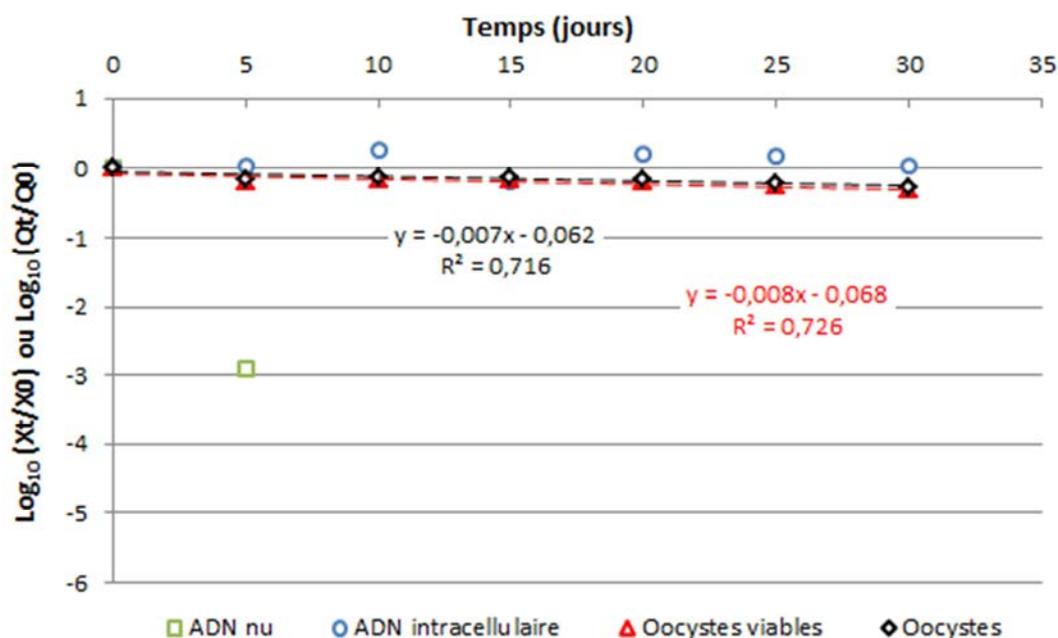


Figure 84: Evolution de la quantité d'oocystes totaux et d'oocystes viables ainsi que de la quantité de génome (ADN intracellulaire et ADN nu) de *C. parvum* dans la nappe alluviale à 22°C

Tableau 87: Modélisation de l'évolution de la quantité d'oocystes totaux et d'oocystes viables ainsi que de la quantité de génome (ADN intracellulaire et ADN nu) de *C. parvum* dans la nappe alluviale à 4°C et 22°C

Conditions expérimentales	n	Pente	p	T <sub>90</sub> (jours)	Intervalle de confiance (à 95%)	
Génome intracellulaire	4°C	7	ns			
	22°C	7	ns			
Génome nu	4°C	2	ns			
	22°C	2	ns			
Viabilité	4°C	7	ns			
	22°C	7	-0,008	0,015	129,2	[75,7-439,2]
Oocystes totaux	4°C	7	-0,003	0,009	302,1	[186,1-801,3]
	22°C	7	-0,007	0,016	152,3	[88,3-553,2]

ns: non significatif au risque 5%

- Concernant l'évolution du nombre d'oocystes totaux et viables, il est observé de très faibles variations de perte au cours du temps ce qui ne permet pas d'être précis dans la comparaison des cinétiques selon les différentes conditions testées. Les T<sub>90</sub> estimés pour la perte de viabilité sont respectivement de 302,1 jours et 152,3 jours à 4°C et 22°C. Cependant il est observé des intervalles de temps se chevauchant. Pour la viabilité, seule la cinétique obtenue à 22°C nous a permis d'estimer un T<sub>90</sub> de 129,2 jours.

- Pour l'ADN intracellulaire, la quantité a également peu varié sur l'ensemble de la période à 4°C et 22°C.
- En revanche pour l'ADN nu, il est mesuré une perte très rapide de plus de 2 log<sub>10</sub> à 4°C et de plus de 2,5 log<sub>10</sub> à 22°C après 5 jours de stockage. Au delà de 5 jours, il n'a pu être mesuré de génome libre de *C. parvum* dans ces eaux. Compte tenu des deux seuls résultats positifs, nous n'avons pas pu déterminer de T<sub>90</sub>.

*Comme pour l'eau de rivière, l'évolution de la perte du nombre d'oocystes totaux et viables dans l'eau de nappe est peu différente de celle du génome intracellulaire quelle que soit les conditions de stockage testées (Tests de Student, p>0,05) alors qu'il se produit une perte du génome libre très rapide au cours du temps.*

### 3.3. Persistence de *C. parvum* dans l'eau d'alimentation chlorée

Nous avons étudié la persistance de *C. parvum* dans la même eau d'alimentation que celle employée pour l'étude de persistance des autres pathogènes. Les résultats obtenus à 4°C et 22°C sur une période de 30 jours, sont présentés sur la Figure 85 et la Figure 86, ainsi que dans le Tableau 88.

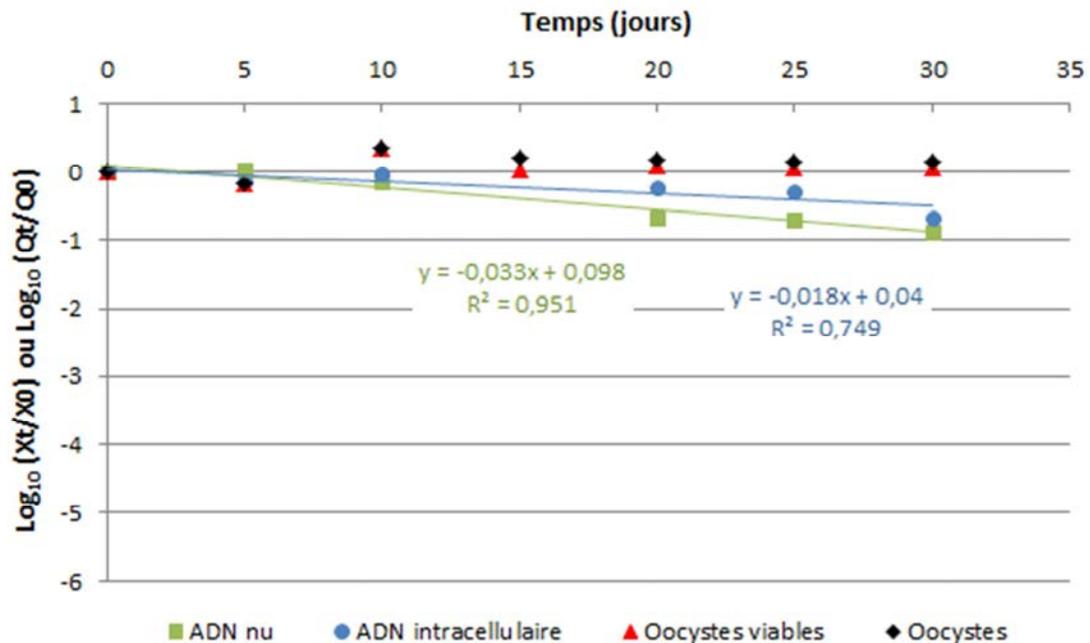


Figure 85: Evolution de la quantité d'oocystes totaux et d'oocystes viables ainsi que de la quantité de génome (ADN intracellulaire et ADN nu) de *C. parvum* dans l'eau d'alimentation chlorée à 4°C

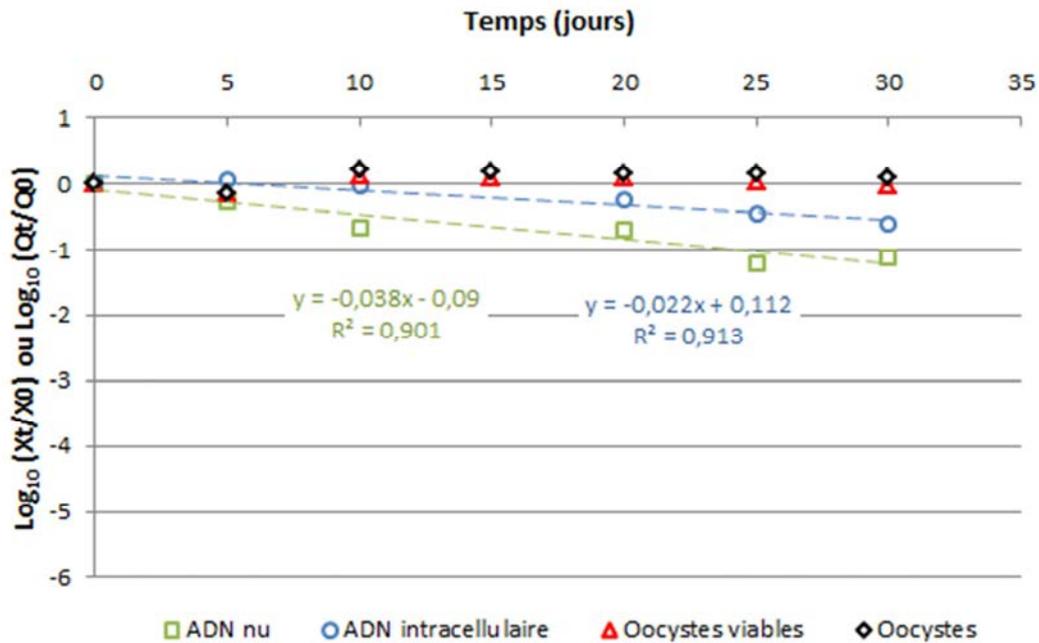


Figure 86: Evolution de la quantité d'oocystes totaux et d'oocystes viables ainsi que de la quantité de génome (ADN intracellulaire et ADN nu) de *C. parvum* dans l'eau d'alimentation chlorée à 22°C

Tableau 88: Modélisation de l'évolution de la quantité d'oocystes totaux et d'oocystes viables ainsi que de la quantité de génome (ADN intracellulaire et ADN nu) de *C. parvum* dans l'eau d'alimentation chlorée à 4°C et 22°C

Conditions expérimentales	n	Pente	p	T <sub>90</sub> (jours)	Intervalle de confiance (à 95%)	
Génome intracellulaire	4°C	6	-0,018	0,026	55,4	[30,7-281,9]
	22°C	6	-0,022	0,003	45,7	[32-80,2]
Génome nu	4°C	6	-0,033	0,0009	30,5	[23,2-44,4]
	22°C	6	-0,038	0,004	26,6	[18,2-49,2]
Viabilité	4°C	7	ns			
	22°C	7	ns			
Oocystes	4°C	7	ns			
	22°C	7	ns			

ns: non significatif au risque 5%

- Dans l'eau d'alimentation, dans des conditions où le chlore aurait été consommé après 5 jours de stockage, il n'est pas constaté de perte d'oocystes ni de leur viabilité sur l'ensemble de la période étudiée, et ceci quelle que soit la température de stockage. Compte tenu de ces résultats, il n'a pu être estimé de T<sub>90</sub>.

- Concernant l'ADN intracellulaire, une perte très faible de 0,5 log<sub>10</sub> est constatée après 30 jours de stockage à 4°C et 22°C ce qui conduit à estimer des T<sub>90</sub> de 55,4 jours et 45,7 jours respectivement.

- Pour l'ADN nu, une perte de plus de 0,5 log<sub>10</sub> est obtenue en moins de 20 jours de stockage. Les T<sub>90</sub> estimés sont relativement proches: 30,5 jours à 4°C et 26,6 jours à 22°C.

***Dans l'eau d'alimentation traitée, le comportement des oocystes totaux et viables diffère très peu de celui du génome intracellulaire au cours du temps, et ceci quelle que soit la température de stockage (Test de Student, p>0,05).***

## **4. DISCUSSION**

### **4.1. Persistence de *C. jejuni***

Dans cette étude, nous avons clairement montré que dans l'eau d'alimentation, la présence de chlore provoquait une inactivation très rapide de la souche de *C. jejuni* employée comme modèle. En effet, une inactivation complète a été mesurée en moins de 3 minutes en présence de chlore à une teneur de 0,71 mg/L de chlore libre et 0,95 mg/L de chlore total, à 4°C et 22°C, alors qu'il faut entre 2 et 5 jours dans l'eau de rivière et entre 25 et plus de 30 jours dans la nappe alluviale pour obtenir la même perte. Ces résultats mettent clairement en évidence l'efficacité du traitement de chloration employé pour désinfecter l'eau et inactiver ces bactéries, quelle que soit la température d'incubation. L'efficacité du chlore sur les bactéries est reconnue depuis de nombreuses années (LeChevallier *et al.*, 1980; Blaser et Cody, 1986; Huang *et al.*, 1997; Zhao *et al.*, 2001; Zhang *et al.*, 2007). L'action de ce désinfectant vis-à-vis des bactéries se produit à trois niveaux. La membrane cytoplasmique est la cible privilégiée de cet oxydant qui va provoquer, en la déstabilisant, une augmentation de la perméabilité cellulaire ce qui permet l'entrée de diverses molécules présentes dans le milieu à l'intérieur de la bactérie (Wolfe *et al.*, 1984; Preez *et al.*, 1995; Virto *et al.*, 2005; Zhang *et al.*, 2007). Il s'en suivra une perturbation des enzymes impliquées dans le cycle respiratoire (Zhang *et al.*, 2007).

Dans les milieux hydriques ne contenant pas d'oxydant (eau de rivière ou eau de nappe), il a été montré indépendamment de la température, une différence de comportement de *C. jejuni* selon la matrice hydrique considérée. Ainsi l'inactivation est moins rapide dans l'eau de nappe que dans l'eau de surface. Il est difficile d'indiquer les raisons de cette différence de comportement dans ces deux milieux compte tenu du nombre d'expérimentations réalisées. Seules des études *in vitro* spécifiques, visant à répéter des expérimentations d'inactivation en se focalisant sur différents paramètres (physico-chimiques ou microbiologiques) pris un à un, auraient pu permettre d'apporter des éléments de réponse. Néanmoins, une différence de concentration de la flore autochtone pourrait être responsable de l'inactivation des bactéries via des processus de compétition pour les nutriments du milieu, de prédation, d'antagonisme (Thomas *et al.*, 1999). L'impact de la présence de la flore autochtone sur la persistance des campylobacters dans l'eau a déjà été mise en évidence par certains auteurs (Korhonen et Martikainen, 1991a, 1991b; Guillou *et al.*, 2008).

Dans ce travail, seul le paramètre «température» a été pris en considération au travers de deux températures représentatives des conditions thermiques hivernales ou estivales. La comparaison des cinétiques obtenues lors des expérimentations de survie organisées à 4°C et à 22°C d'une part dans l'eau de nappe, et d'autre part dans l'eau de rivière, a clairement mis en évidence l'impact de la température sur l'inactivation des campylobacters, avec une survie 10 fois moindre à 22°C comparée à 4°C. Dans la littérature, il est reconnu que les campylobacters persistent plus longtemps à de basses températures, entre 4°C et 10°C, et ceci quelle que soit la matrice hydrique (Korhonen et Martikainen, 1991a; Buswell *et al.*, 1998; Obiri-Danso *et al.*, 2001; Tatchou-Nyamsi *et al.*, 2007). Rollins et Colwell (1986) montrent que cette différence de persistance en fonction de la température serait en raison d'une utilisation des substrats du milieu plus rapide à des températures élevées provoquant un déclin plus rapide du nombre de cellules cultivables. Toutefois, dans le même temps, ces auteurs observent une transition vers des formes VNC. Ces formes confèreraient aux bactéries la capacité de survivre plus longtemps par un ralentissement de leur métabolisme, de la respiration cellulaire et du transport de nutriments (Thomas *et al.*, 2002; Oliver, 2005; Abulreesh *et al.*, 2006).

Les résultats obtenus sur le comportement du génome nu et du génome intracellulaire permettent d'apporter différentes informations très intéressantes sur la dégradation de la structure cellulaire des campylobacters lors de leur stockage dans l'eau.

Concernant le génome nu, la différence de cinétiques de dégradation en fonction de la température d'incubation, avec une perte plus lente à 4°C par rapport à 22°C, mais aussi le fait que l'ADN nu des bactéries soit moins dégradé dans l'eau désinfectée comparée aux eaux non chlorées, semble orienter l'hypothèse vers la présence d'une flore autochtone ou la présence de molécules biologiques qui seraient responsables de cette dégradation. En effet, dans l'eau chlorée, la première phase de dégradation du génome, qui dure 2 jours, serait due à la présence de chlore dans le milieu qui s'attaquerait aux acides nucléiques de ce fragment de 444 pb mais qui inactiverait également les micro-organismes et les molécules biologiques présentes dans le milieu, alors que la seconde phase de dégradation, plus lente, pourrait s'expliquer par une absence ou une quantité réduite de micro-organismes ou de molécules biologiques. Dans l'eau de rivière, la flore mesurée est nettement plus importante que dans l'eau de nappe ce qui expliquerait également pourquoi la dégradation du génome est plus rapide dans les eaux de surface.

Concernant le génome intracellulaire, l'absence d'une première phase de dégradation rapide en présence de chlore dans le milieu semble traduire une protection du génome vis-à-vis du désinfectant présent dans le milieu. Ainsi, la différence de comportement entre le génome nu et le génome intracellulaire dans l'eau chlorée met en évidence une protection du génome intracellulaire par la cellule bactérienne liée à un problème d'accessibilité. Si ces hypothèses s'avéraient fondées cela pourrait permettre d'indiquer que, malgré une perte extrêmement rapide de la cultivabilité, la structure architecturale des bactéries serait maintenue, ce qui pourrait indiquer la présence de formes de résistance et pourquoi pas envisager la possibilité d'être en présence de formes VNC. Oliver *et al.* (2005) avaient d'ailleurs mis en évidence que le chlore, normalement bactéricide pour les bactéries, le serait beaucoup moins en présence de formes VNC. L'expression d'une forme de résistance sous-entendrait que ces bactéries garderaient une activité intracellulaire ralentie les maintenant viables et donc potentiellement infectieuses. Toutefois, dans l'état actuel des connaissances et des résultats obtenus au cours de cette étude, nous ne pouvons valider ni même invalider cette hypothèse. Seules des expérimentations complémentaires, en étudiant d'autres paramètres biologiques tels que la concentration en ATP, l'activité métabolique des cellules (test de réduction de CTC par exemple), ou encore en examinant l'intégrité de la membrane cytoplasmique (à l'aide de PI ou BaLight), nous permettraient de fournir une réponse.

#### **4.2. Persistence de l'adénovirus 1**

Dans cette étude nous avons clairement démontré l'efficacité du chlore pour inactiver les particules d'adénovirus 1 infectieuses employées comme modèle. Une perte complète est observée après 6 heures d'incubation dans l'eau d'alimentation chlorée dont la teneur en chlore libre et en chlore total est de 0,71 mg/L et 0,95 mg/L, respectivement. Les virus entériques sont relativement sensibles au chlore et des pertes importantes ont été observées dans de nombreuses études aussi bien pour les adénovirus (Thurston-Enriquez *et al.*, 2003; Cromeans *et al.*, 2010), les coxackievirus (Engelbrecht *et al.*, 1980; Cromeans *et al.*, 2010), les échovirus (Engelbrecht *et al.*, 1991; Cromeans *et al.*, 2010), les poliovirus (Engelbrecht *et al.*, 1991; Thurston-Enriquez *et al.*, 2003; Cromeans *et al.*, 2010), que les norovirus (Shin et Sobsey, 2008). En outre, bien que l'efficacité du chlore soit reconnue pour être dépendante de la température de l'eau, avec une efficacité 3 à 4 fois plus importante lorsque la température est augmentée de 10°C (AFSSA, 2007), ceci n'a pu être observé au cours de notre étude, en raison de l'inactivation très rapide des particules infectieuses.

Dans les eaux non chlorées, l'effet de la température sur la persistance du pouvoir infectieux des virus est également reconnu, que ce soit dans les eaux souterraines (Yates *et al.*, 1985; Nasser *et al.*, 1993b; Gordon et Toze, 2003; Ogorzaly *et al.*, 2010; Rigotto *et al.*, 2011), dans les eaux de surfaces (Noble *et al.*, 2004), ou encore dans l'eau de mer (Enriquez *et al.*, 1995; Gantzer *et al.*, 1998a; Noble *et al.*, 2004).

Dans notre étude, il est observé une accélération de l'inactivation virale au cours du temps dans l'eau de nappe avec une perte de particules infectieuses de  $2 \log_{10}$  observée au bout de 30 jours à 22°C. Dans ce même type de milieu, l'effet de la température a également été mis en évidence mais Rigotto *et al.* (2011) observent une perte de 0,7 à  $1 \log_{10}$  du pouvoir infectieux de l'adénovirus 2 à 19°C au bout de 30-40 jours d'incubation, tout comme Ogorzaly *et al.* (2010) pour la même sérotype à 20°C. Une des raisons pouvant expliquer cette différence serait la nature physico-chimique et biologique des eaux employées dans les différentes études puisque la teneur en oxygène dissout, en COT, ainsi que le pH, la turbidité et la concentration en flore autochtone sont des facteurs reconnus pour avoir une influence sur la survie des virus dans les eaux de surface et les eaux souterraines (Yates *et al.*, 1989; Gordon et Toze, 2003; John et Rose, 2005; Pedley *et al.*, 2006; Rigotto *et al.*, 2011). D'ailleurs, Skrabber (2003) avait mis en évidence une différence significative d'inactivation du Poliovirus 1 dans de l'eau de rivière en fonction de sa composition avec une persistance plus importante dans une eau de rivière prélevée en hiver comparée à cette même eau prélevée en été, et ce dans les mêmes conditions expérimentales.

Comme pour les campylobacters, l'étude du comportement du génome nu par rapport au génome encapsidé permet d'apporter des informations intéressantes sur la dégradation de la structure virale au cours du temps. Tout d'abord, quelle que soit la nature de la matrice, nous avons montré une persistance plus importante du génome (nu ou encapsidé) à 4°C comparée à 22°C, ce qui corrobore les données de la littérature (Skraber, 2003; Bae et Schwab, 2008; de Roda-Husman *et al.*, 2009; Ogorzaly *et al.*, 2010). Par ailleurs, dans les eaux de surface et les eaux de nappe, quelle que soit la température, la dégradation du génome nu est plus rapide que celle du génome encapsidé ce qui permet donc de démontrer, comme pour les campylobacters, une protection du génome intracellulaire face aux facteurs environnementaux par rapport au génome nu.

En revanche, dans l'eau chlorée, les deux entités ont un comportement similaire sur la période d'étude, de même que la dégradation du génome nu est beaucoup plus lente ( $T_{90} = 74,9$  jours) que celle observée dans l'eau de nappe ou l'eau de Moselle ( $T_{90} = 9,3$  jours et  $9,4$  jours, respectivement). Cette différence de comportement pourrait être attribuée au traitement de désinfection qui limiterait la présence de la flore autochtone et d'autres structures biologiques pouvant dégrader le génome. La différence de comportement du génome nu des adénovirus (96 pb) et de celui des campylobacters (444 pb) s'expliquerait par leur taille très différente. L'impact plus ou moins important des oxydants sur la dégradation des génomes nus selon la taille du génome considéré a été démontré dans différents travaux (Gassilloud, communication personnelle).

Quelle que soit la nature de la matrice, nous avons clairement montré que l'inactivation virale était plus rapide que la dégradation du génome, ce qui est tout à fait concordant avec les résultats déjà publiés obtenus avec les adénovirus (Ogorzaly *et al.*, 2010); les entérovirus (Gantzer *et al.*, 1998; Sobsey *et al.*, 1998; Gassilloud, 2003; Skrabber, 2003; Bae et Schwab, 2008; de Roda-Husman *et al.*, 2008) ou encore les norovirus (Bae et Schwab, 2008) et les rotavirus (Dubois, 1995).

### 4.3. Persistence de *C. parvum*

Dans ce travail nous avons clairement montré une différence de comportement des oocystes de *Cryptosporidium* en fonction de la matrice hydrique. Les résultats d'inactivation obtenus à partir de *C. parvum* dans l'eau traitée chlorée confirment que le chlore, à des concentrations initiales de 0,71 mg/L de chlore libre et 0,95 mg/L de chlore total, tout au moins dans les premières heures de l'étude, a peu d'influence sur la viabilité des oocystes. Les parasites *Cryptosporidium* sont reconnus pour être les micro-organismes les plus résistants à la chloration, et de nombreuses études ont montré que des doses importantes de chlore sont nécessaires pour inactiver les parasites (Korich *et al.*, 1990; Liyanage *et al.*, 1997; Chauret *et al.*, 2001; Betancourt et Rose, 2004). Ainsi, il a été montré que des valeurs de CT de l'ordre de 15 mg/L.min, classiquement employées dans les traitements de potabilisation n'ont aucun effet sur la persistance des oocystes et qu'un abattement d'1 log<sub>10</sub> est obtenu avec des valeurs de l'ordre de 7000 mg/L.min (Baudin *et al.*, 2001).

Dans les eaux non chlorées, il est constaté une différence significative de comportement dans l'eau de nappe et l'eau de rivière. En effet, si dans la nappe la viabilité des oocystes de *C. parvum* est peu affectée, il n'en est pas de même dans l'eau de rivière où une perte de plus d'1 log<sub>10</sub> est observée sur toute la période de l'étude. Ives *et al.* (2007) observent une différence d'inactivation entre les eaux souterraines et les eaux de surface mais seulement à 22°C, en raison d'une flore autochtone plus importante à cette température comparée à 4°C. Chauret *et al.* (2001) ont proposé que l'antagonisme biologique naturel pouvait avoir une influence marquée dans la persistance des parasites dans l'eau. Ils émettent l'hypothèse que l'antagonisme biologique observé pourrait être dû à une dégradation microbienne, à une modification de l'environnement par les métabolismes microbiens, ou encore à la prédation par des organismes plus grands. Toutefois, dans notre étude, il est difficile d'indiquer quelles sont les causes de ce comportement différentiel compte tenu du faible nombre de données obtenues.

Par ailleurs, nous n'avons pas observé un effet de la température sur la viabilité des oocystes quelle que soit la nature de la matrice alors que certains auteurs mettent en évidence que la persistance de la viabilité ou de l'infectiosité des oocystes est plus importante à de basses températures (Fayer et Nérard, 1996; King *et al.*, 2005; Ives *et al.*, 2007; Reinoso *et al.*, 2008). Toutefois, la plupart des études étant réalisées sur plusieurs mois, contre 30 jours dans notre cas, il se peut que la période d'incubation soit trop courte pour mettre en évidence cet effet.

Concernant la dégradation du génome, comme pour les autres micro-organismes, nous avons mis en évidence une persistance plus importante du génome intracellulaire comparé au génome nu, et ce quelle que soit la température d'incubation et la matrice hydrique. Ces résultats confirment donc que l'ADN des parasites est bien protégé par la double paroi des oocystes. La résistance de la paroi des oocystes est d'ailleurs bien connue puisque des traitements thermiques de chaleur (60°C-100°C) / congélation (-80°C) sont nécessaires pour lyser la double paroi cellulaire et ainsi extraire le génome lors de l'utilisation d'outils moléculaires.

Par ailleurs, un comportement identique est observé entre le génome intracellulaire et la quantité totale d'oocystes ou la quantité d'oocystes viables. Ces résultats sont tout à fait concordants puisqu'il est indispensable d'avoir un génome intègre pour qu'un oocyste soit viable.

***Dans cette étude nous avons clairement montré une différence de comportement des trois micro-organismes considérés quelle que soit la matrice étudiée et la température d'incubation (Figure 87). Les cinétiques d'inactivation mesurées pour chaque micro-organisme mettent clairement en évidence une sensibilité accrue des bactéries C. jejuni dans les eaux par rapport aux autres micro-organismes. L'inactivation la plus importante est observée dans l'eau chlorée alors que l'inactivation la plus faible est observée dans la nappe. En revanche, C. parvum est le micro-organisme pour lequel l'inactivation est très peu altérée dans l'eau traitée, même en présence de chlore ce qui confirme les données connues dans les travaux publiés. En fonction de la matrice, il a pu être observé pour l'adénovirus 1, que l'inactivation est similaire à celle de C. jejuni dans l'eau chlorée, similaire à celle de C. parvum dans l'eau de rivière, et que l'inactivation se situe au niveau intermédiaire dans la nappe alluviale.***

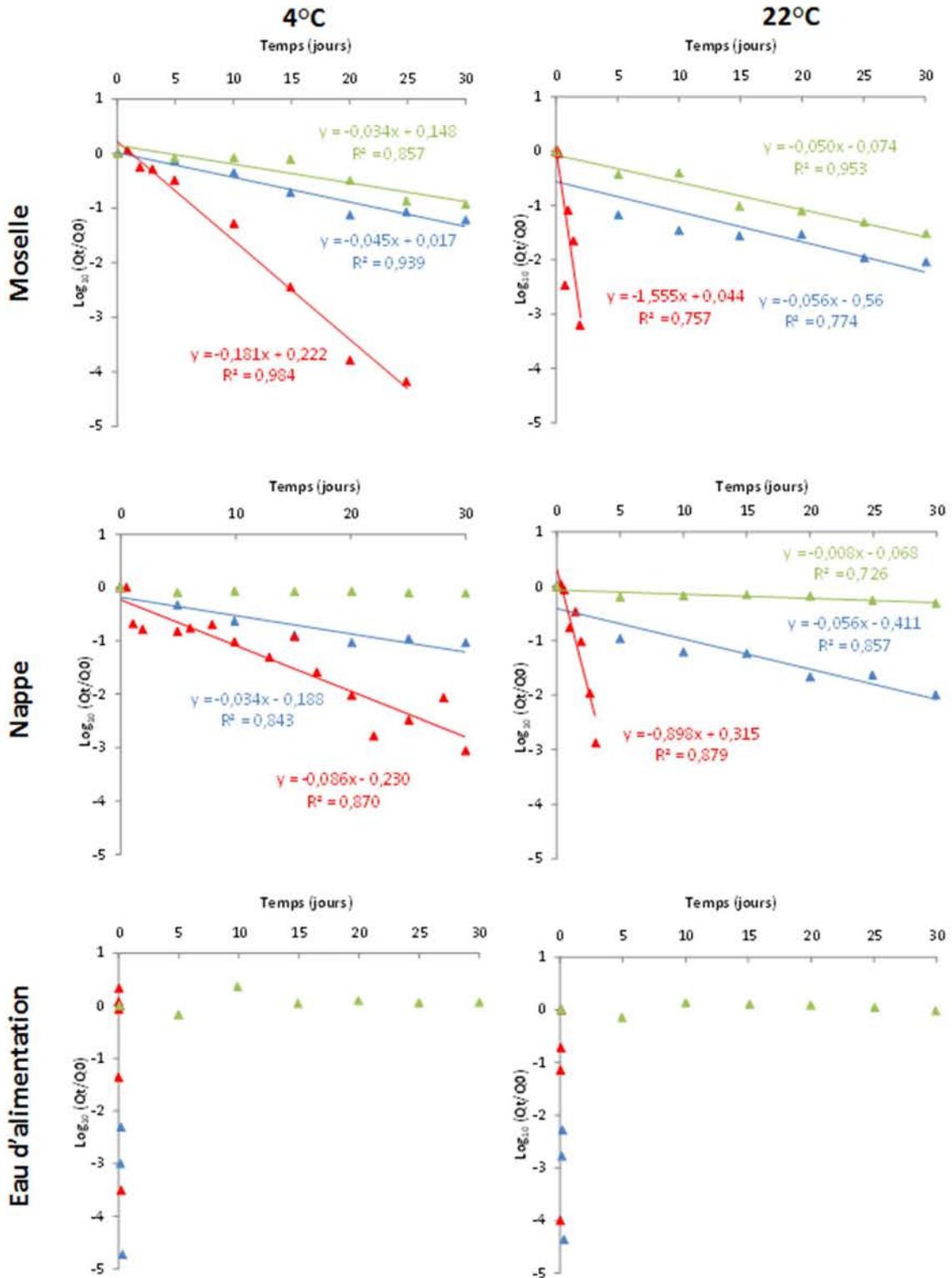


Figure 87: Inactivation des particules viables de *C. jejuni* (en rouge) et *C. parvum* (en vert), et des particules infectieuses de l'adénovirus 1 (en bleu) dans les différents milieux hydriques, à 4°C et 22°C.

#### 4.4. Comparasion de la persistance des trois micro-organismes

La corrélation entre la présence de génome et le risque lié à la viabilité ou à l'infectiosité des micro-organismes est relativement controversée. A notre connaissance, il n'existe pas à ce jour de corrélation claire et universelle qui pourrait s'appliquer à tous les micro-organismes et à tous les milieux. Ainsi, à titre d'exemple, sur des micro-organismes n'ayant pas de métabolisme propre tels que les virus entériques, Skraber (2003) montre, sur une même souche virale et avec les mêmes outils de détection, une corrélation relative entre la dégradation du génome et la perte d'infectiosité du poliovirus 1 dans des échantillons d'eau de surface prélevés dans la Moselle, alors que dans le même temps, Gassilloud (2003) démontre qu'il n'existe pas de corrélation lorsque cette même souche est inoculée dans des eaux embouteillées.

Dans cette étude, concernant la bactérie *C. jejuni* et le virus adénovirus, nous avons confirmé cette dualité dans l'information de la signification de la présence de génome en termes de risque. Ainsi pour ces deux types de pathogènes, deux situations distinctes ont été relevées selon que les eaux soient traitées ou non par un oxydant.

Dans les eaux traitées, nous avons clairement démontré, pour *C. jejuni* et l'adénovirus 1, que la présence de génome ne pouvait être employée pour estimer un risque. En effet, quelle que soit la température d'incubation, une différence de comportement est observée entre la mesure du pouvoir infectieux ou de la viabilité et celle de la quantité de génome. Ainsi, alors qu'une inactivation complète est observée après 5 minutes d'incubation, la quantité d'ADN intracellulaire ou encapsidé reste relativement constante en présence de chlore (2 jours environ) puis, une fois le chlore consommé, diminue faiblement ou reste stable jusqu'à la fin de l'expérimentation (30 jours). De plus, l'absence de dégradation complète du génome libre sur l'ensemble de la période d'étude, confirme que la détection du génome ne peut être reliée à la viabilité ou à l'infectiosité de ces micro-organismes.

En revanche, dans les eaux non traitées (eau de rivière et eau de nappe), quelle que soit la température d'incubation, il est observé un comportement similaire entre la perte d'infectiosité et la dégradation du génome encapsidé de l'adénovirus 1. Nos résultats confortent ceux de Skraber (2003) obtenus avec du poliovirus 1 inoculé dans des échantillons d'eau de rivière, ou encore ceux d'Ogorzaly *et al.* (2010) dans l'eau souterraine à 4°C inoculée avec de l'adénovirus 2. Dans ce contexte, dans les études d'occurrence réalisées dans ces eaux non traitées, la présence de génome pourrait être attribuée à un risque, d'autant plus qu'il est peu probable de détecter du génome libre étant donné qu'il est rapidement dégradé.

Pour *C. jejuni*, les résultats sont plus contrastés et semblent dépendre de la température d'incubation et du milieu considéré. Ainsi dans l'eau de rivière, quelle que soit la température, la perte de viabilité des campylobacters est toujours plus rapide que celle du génome. Cependant, à 4°C, la perte de viabilité est constante au cours du temps de même que celle du génome intracellulaire ou celle du génome nu, alors qu'à 22°C une perte importante de plus de 3 log<sub>10</sub> est observée dans un premier temps pour la viabilité et le génome (intracellulaire ou nu), et dans un second temps, une rémanence plus importante du génome. Dans cette matrice, la détection de génome pourrait donc être attribuée aussi bien à des particules viables, que des particules non

viables ou même à de l'ADN libre. En revanche, dans la nappe, une perte équivalente de la viabilité et du génome intracellulaire est observée à 4°C, alors que le génome nu est plus vite dégradé. Dans ce cas, une corrélation pourrait être établie ce qui implique que la présence de génome pourrait être reliée à la présence de bactéries viables, mais seulement à cette température puisqu'à 22°C cette corrélation n'est plus respectée. Dans ce contexte, pour les bactéries, à l'inverse des virus, on observe clairement qu'il faut considérer plusieurs paramètres en lien avec la température et la matrice pour établir un lien entre la présence de génome et la présence d'un risque lié à la viabilité. Il faut cependant être prudent quant à ces interprétations compte tenu, d'une part du faible nombre d'expérimentations réalisées, et d'autre part que les données scientifiques obtenues sur la viabilité de ces bactéries mettent en avant une importante variabilité dans les résultats selon la souche considérée (Buswell *et al.*, 1998; Talibart *et al.*, 2000; Cools *et al.*, 2003). Néanmoins, ces différents résultats nous permettent d'établir que le génome des adénovirus et celui de *C. jejuni*, décelés dans les échantillons d'eau traitée lors du suivi du niveau de pollution fécale de différents milieux hydriques, serait issu de micro-organismes non viables et non infectieux, inactivés par le traitement au chlore. Par contre, dans les échantillons d'eau de nappe, il est possible d'admettre que le génome des campylobacters pourrait provenir de bactéries viables. Toutefois, il faut bien sûr prendre en compte que les caractéristiques physico-chimiques et biologiques des échantillons d'eau de nappe de l'étude la pollution fécale ont varié au cours du temps et ont pu avoir une influence sur le comportement des bactéries dans l'eau.

Pour les oocystes de *C. parvum*, les résultats obtenus dans l'eau chlorée sont différents de ceux obtenus pour *C. jejuni* et pour l'adénovirus 1, essentiellement en raison de leur grande résistance au traitement de chloration. Sur l'ensemble de la période étudiée, quelle que soit la température, il existe une corrélation entre le génome intracellulaire et la viabilité, même s'il est vrai que les résultats concernant le génome nu, dont la dégradation progressive est d'environ 1 log<sub>10</sub> sur l'ensemble de la période d'étude, rendent difficile l'interprétation du risque. Il est très probable que la présence de chlore libre ou total dans le milieu pendant toute la durée de l'étude aurait entraîné une disparition plus importante et plus rapide du génome libre dans le milieu par rapport au génome intracellulaire. D'un point de vue purement méthodologique, il semble également peu probable de retrouver la présence de génome nu dans l'eau de réseau, compte tenu des outils analytiques employés pour la détection des parasites lors de l'étude dans les différents milieux hydriques (norme NF T90-455 (AFNOR, 2001)). Ainsi, il semble peu probable de pouvoir concentrer des ADN nus présents dans l'eau sur la membrane en polyéthylène sulfoné étant donné sa porosité de 1 µm. De même, la vitesse de centrifugation à 1250 g, employée lors de l'étape de concentration secondaire est insuffisante pour concentrer les génomes, et enfin l'étape de purification par IMS est basée sur un principe visant à purifier et concentrer les oocystes grâce à l'utilisation d'anticorps dirigés contre les protéines de la paroi et non les acides nucléiques. Dans ce cadre, on peut alors admettre que la présence de génome pourrait être reliée à la présence d'un risque. Dans les eaux non traitées, eau de rivière et eau de nappe, les résultats obtenus sont nettement plus clairs. Quelle que soit la température d'incubation, il existe une corrélation entre la dégradation du génome intracellulaire et l'inactivation des oocystes, et le génome nu est systématiquement plus vite dégradé que le génome encapsidé. Dans ce cadre, la présence de génome traduirait un risque de viabilité des oocystes. Cette dernière information est d'autant plus importante qu'elle permet de valider l'utilisation de ces outils moléculaires pour obtenir ce type d'information.



---

---

## **CONCLUSION**

---

---



L'objectif de cette thèse était de fournir des informations sur la circulation des trois micro-organismes d'intérêt (*Campylobacter*, adénovirus humains et *Cryptosporidium*) dans la rivière Moselle, entre sa source et sa confluence avec la Meurthe, ainsi que dans des nappes alluviales. Ces deux ressources étant employées pour la production d'eau potable, nous avons également recherché une contamination par ces pathogènes dans les eaux traitées produites afin de vérifier l'efficacité des traitements de potabilisation. Dans ce cadre, il était nécessaire d'avoir à disposition des méthodes rapides, sensibles et spécifiques, de manière à détecter et quantifier la présence de ces pathogènes, mais également de caractériser leur état de viabilité ou d'infectiosité.

Dans la Moselle, nous avons mis en évidence une contamination abondante aussi bien au niveau du site E au cours de l'année, qu'au niveau des huit sites situés le long de la rivière, pendant la campagne de mars. Des campylobacters viables ont été détectés dans une grande majorité des échantillons collectés lorsque la méthode normalisée ISO 17995 (2005) a été utilisée et ceci au niveau de tous les sites. Nous avons clairement montré, grâce à l'emploi de deux méthodes moléculaires, une distribution différente des souches de *C. jejuni* et *C. coli* au cours de l'année. Le génome d'adénovirus humains, dont celui des adénovirus entériques (sérotypage 41), a été décelé par PCR en temps réel dans tous les échantillons, à des concentrations variables au cours du temps avec un pic observé en hiver correspondant à la période durant laquelle les épidémies de gastro-entérites sont les plus nombreuses. Seuls environ 10% des échantillons contaminés se sont révélés contenir des virus infectieux. Concernant les parasites *Cryptosporidium* pathogènes pour l'Homme, ils ont été détectés ponctuellement au cours de l'année d'étude au niveau du site E et l'emploi de la PCR en temps réel développée lors de nos travaux, a confirmé la présence d'espèces pathogènes pour l'Homme (*C. hominis*, *C. parvum*, *C. meleagridis*). Si les quantités retrouvées n'ont pas permis de caractériser l'état de viabilité des parasites, les études de survie réalisées dans la troisième partie de cette thèse ont montré que le génome de ce parasite pouvait être relié à la présence d'oocystes viables et donc potentiellement infectieux. Par ailleurs, bien que les indicateurs fécaux (*E. coli* et Entérocoques) aient été retrouvés dans tous les échantillons, aucune corrélation avec les autres pathogènes a pu être mise en évidence.

Dans la nappe alluviale du site E, la présence d'indicateurs fécaux, d'adénovirus humains ou de campylobacters viables indique que cette ressource n'est pas protégée d'une contamination microbiologique. Du génome de *C. jejuni* et *C. coli* a été détecté ponctuellement dans des échantillons de 20 L, grâce à la méthode développée au cours de ce travail. Bien que la présence de génome ne peut être reliée à un risque, l'étude de survie réalisée dans ce milieu à partir de l'espèce *C. jejuni* a permis de mettre en évidence qu'à une température de 4°C, une corrélation existait entre la persistance du génome et la viabilité de *C. jejuni*. Ces résultats ont permis de conclure qu'il existe un risque potentiel dans les échantillons pour lesquels du génome était détecté.

Comme pour les campylobacters, les adénovirus humains ont été détectés ponctuellement par PCR en temps réel sans qu'il puisse être établi le caractère infectieux de ces virus. L'absence de résultats concernant l'infectiosité des virus retrouvés dans ces eaux doit être nuancée car la méthode de culture cellulaire employée peut ne pas être suffisamment efficace pour pouvoir révéler cet état particulier, notamment en présence d'adénovirus entériques.

Les résultats obtenus dans l'étude de survie de l'adénovirus 1 mettent en évidence que le pouvoir infectieux se comporte de façon similaire au génome encapsidé ce qui indique que la présence d'ADN dans les échantillons d'eau de nappe pourrait conduire à estimer qu'il existe une forte probabilité pour que ces virus soient en réalité potentiellement infectieux.

Dans l'eau d'alimentation, aucun échantillon collecté au niveau des différents sites étudiés ne s'est révélé être contaminé par des campylobacters ou des adénovirus lors de la campagne de mars. Par contre durant l'année d'étude réalisée au niveau du site E, 5 échantillons contenaient du génome d'adénovirus humains (3 échantillons) ou du génome de *C. jejuni* (2 échantillons). En l'absence d'une détection soit de l'infectiosité soit de la viabilité, il était difficile de conclure à un risque. Cependant, rappelons que la présence d'indicateurs bactériens de types coliformes et de spores de bactéries ASR a été mise en évidence dans les échantillons contaminés. Les résultats sont résumés dans la Figure 68 et la Figure 69 de la discussion de la Partie 2 du chapitre Résultats et Discussion. Il est d'emblée important de préciser qu'aucun signalement d'épidémie d'origine hydrique n'a été soulevé au niveau de la collectivité desservie par le site E au cours de cette étude.

Afin d'évaluer un risque infectieux en tenant compte des résultats positifs obtenus pour les adénovirus humains par PCR, nous avons utilisé le diagramme établi dans le rapport AFSSA (2007) et nous avons appliqué la démarche en fonction des données acquises pour chaque situation (Figure 88).

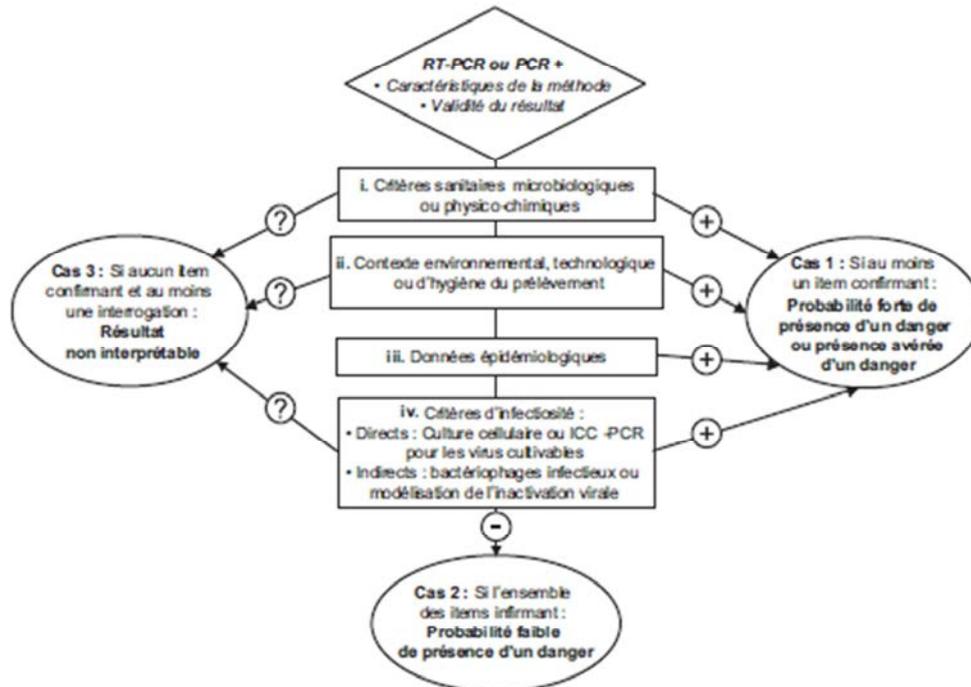


Figure 88 : Logigramme d'interprétation d'un résultat positif par les techniques de biologie moléculaire

Concernant l'échantillon du 21/06/2010, pour rappel, l'eau analysée contenait du génome d'adénovirus 41 et également des spores de bactéries ASR. Dans ce contexte, en respectant la démarche du logigramme présenté ci-dessus, nous serions dans un cas de type 1 « Probabilité forte de présence d'un danger ou présence avérée d'un danger ». Compte tenu (i) des données de chlore libre et total mesurées sur le terrain lors de ce prélèvement, respectivement de 0,28 mg/L et 0,57 mg/L, (ii) du temps de contact du chlore avec les virus lors du transport de l'eau jusqu'au réservoir tampon avant distribution au consommateur, (iii) du mélange de l'eau traitée dans le réservoir avec de l'eau provenant d'une autre ressource dans un ratio variable mais proche de 50%, et (iv) des données d'inactivation obtenues dans la partie 3 du chapitre Résultats et Discussion de ce travail, il peut être considéré que le risque évalué à partir du logigramme soit sur-estimé et qu'en réalité, au niveau du robinet du consommateur, il existe une « probabilité faible de présence de danger » (cas n°2). L'absence de cas groupés de gastro-entérites liés à la consommation d'eau à cette période semble confirmer ce dernier constat.

Le même cheminement peut être opéré pour le second échantillon du 18/04/2011 avec des doses de chlore libre et total de 0,65 mg/L et 0,98 mg/L, respectivement.

Enfin, pour l'échantillon du 02/05/2011 en l'absence de bactéries indicatrices ou de spores de bactéries ASR et en présence de chlore libre et total de 0,7 mg/L et 0,98 mg/L respectivement, nous nous situons clairement dans un cas de type 2. Il semble rétrospectivement que l'absence de signe épidémiologique relevé lors de chaque période incriminée semble confirmer ces différentes évaluations.

Pour les échantillons dans lesquels il a été retrouvé du génome de *Campylobacter*, nous avons décidé de retenir la même démarche d'évaluation. Pour les deux échantillons retrouvés contaminés, aucun indicateur ou de spore de bactéries ASR n'a été décelé et les concentrations en chlore libre et total étaient supérieures à 0,2 mg/L. Compte tenu (i) des données d'inactivation acquises sur ces bactéries dans la partie 3 du chapitre Résultats et Discussion de ce travail mais aussi (ii) en l'absence de cas groupés de gastro-entérites relevés au niveau de la collectivité, il peut être considéré un cas de type 2 pour chaque échantillon concerné.

Bien évidemment cette évaluation de risque sommaire, se basant notamment sur l'absence de cas de gastro-entérites avérés, pourrait être remise en cause de part un taux d'attaque non suffisant pour qu'un signal d'alerte soit transféré et décelé par les services en charge de la gestion de ce type d'épisode. L'utilisation des outils développés par l'InVS, basés sur l'exploitation des données de l'assurance maladie concernant la prescription et la vente de médicaments destinés à guérir des symptomatologies en lien avec des gastro-entérites, devrait permettre à court terme de valider les hypothèses émises ci-dessus. A plus long terme, l'ensemble des données acquises lors de (i) l'évaluation méthodologique, (ii) l'étude d'occurrence et (iii) du comportement des différents pathogènes, devrait permettre de pouvoir préciser les analyses quantitatives de risque élaborées pour les gestionnaires du risque.



---

## **REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES**

---



- Abbaszadegan, M., Huber, M. S., Gerba, C. P., Pepper, I. L.,** 1993. Detection of enteroviruses in groundwater with the polymerase chain reaction. *Applied and Environmental Microbiology* 59, 1318-1324.
- Abbaszadegan, M., Stewart, P., LeChevallier, M.,** 1999. A strategy for detection of viruses in groundwater by PCR. *Applied and Environmental Microbiology* 65, 444-449.
- Abe, T., Haga, S., Yokoyama, K., Watanabe, N.,** 2008. An outbreak of *Campylobacter jejuni* subsp. *jejuni* infection via tap water. *Japanese Journal of Infectious Diseases* 61, 327.
- Abu-Halaweh, M., Bates, J., Patel, B. K. C.,** 2005. Rapid detection and differentiation of pathogenic *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* by real-time PCR. *Research in Microbiology* 156, 107-114.
- Abulreesh, H. H., Paget, T. A., Goulder, R.,** 2005. Recovery of thermophilic campylobacters from pond water and sediment and the problem of interference by background bacteria in enrichment culture. *Water Research* 39, 2877-2882.
- Abulreesh, H. H., Paget, T. A., Goulder, R.,** 2006. *Campylobacter* in waterfowl and aquatic environments: Incidence and methods of detection. *Environmental Science and Technology* 40, 7122-7131.
- Adak, G. K., Cowden, J. M., Nicholas, S., Evans, H. F.,** 1995. The Public Health Laboratory Service national case-control study of primary indigenous sporadic cases of campylobacter infection. *Epidemiology and Infection* 115, 15-22.
- AFNOR,** 1996. Norm procedure XP T 90-451. Testing water: Detection of enterovirus. Method by concentration on glass wool and detection by cell culture. Association Française de Normalisation, Saint-Denis La Plaine, France.
- 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 2005, Saint-Denis la Plaine, France.
- AFSSA,** 2007. Bilan des connaissances relatives aux virus transmissibles à l'homme par voie orale. Pothier, P., Bultel, C., Grimault, L., Bertagnoli, S., Carre, J., Deportes, I., De Valk, H., Dubois, E., Dubrou, S., Dussaix, E., Ferré- Aubineau, V., Gantzer, C., Hartemann, P., Legeay, O., Le Guyader, S., Lina, B., Montiel, A., Picoche, B., Vilagines, P. AFSSA, Maison Alfort.
- Ahmed, W., Sawant, S., Huygens, F., Goonetilleke, A., Gardner, T.,** 2009. Prevalence and occurrence of zoonotic bacterial pathogens in surface waters determined by quantitative PCR. *Water Research* 43, 4918-4928.
- Albinana-Gimenez, N., Clemente-Casares, P., Calgua, B., Huguet, J. M., Courtois, S., Girones, R.,** 2009. Comparison of methods for concentrating human adenoviruses, polyomavirus JC and noroviruses in source waters and drinking water using quantitative PCR. *Journal of Virological Methods* 158, 104-109.

- Ali, M. A., Al-Herrawy, A. Z., El-Hawaary, S. E.,** 2004. Detection of enteric viruses, *Giardia* and *Cryptosporidium* in two different types of drinking water treatment facilities. *Water Research* 38, 3931-3939.
- Almeida, A., Moreira, M. J., Soares, S., De Delgado, M. L., Figueiredo, J., Silva, E., Castro, A., Da Cosa, J. M. C.,** 2010. Presence of *Cryptosporidium* spp. and *Giardia duodenalis* in drinking water samples in the North of Portugal. *Korean Journal of Parasitology* 48, 43-48.
- Alonso, J. L., Alonso, M. A.,** 1993. Presence of *Campylobacter* in marine waters of Valencia, Spain. *Water Research* 27, 1559-1562.
- Anderson, A. D., Heryford, A. G., Sarisky, J. P., Higgins, C., Monroe, S. S., Beard, R. S., Newport, C. M., Cashdollar, J. L., Fout, G. S., Robbins, D. E., Seys, S. A., Musgrave, K. J., Medus, C., Vinjé, J., Bresee, J. S., Mainzer, H. M., Glass, R. I.,** 2003. A waterborne outbreak of Norwalk-like virus among snowmobilers - Wyoming, 2001. *Journal of Infectious Diseases* 187, 303-306.
- Armon, R., Kott, Y.,** 1996. Bacteriophages as indicators of pollution. *Critical Reviews. Environmental Science and Technology* 26, 299-335.
- Arnal, C., Crance, J. M., Gantzer, C., Schwartzbrod, L., Deloince, R., Billaudel, S.,** 1998. Persistence of infectious hepatitis A virus and its genome in artificial seawater. *Zentralblatt für Hygiene und Umweltmedizin* 201, 279-284.
- Arvanitidou, M., Constantinidis, T. C., Katsouyannopoulos, V.,** 1995a. A survey on *Campylobacter* and *Yersinia* spp. occurrence in sea and river waters in Northern Greece. *Science of the Total Environment* 171, 101-106.
- Arvanitidou, M., Stathopoulos, G. A., Constantinidis, T. C., Katsouyannopoulos, V.,** 1995b. The occurrence of *Salmonella*, *Campylobacter* and *Yersinia* spp. in river and lake waters. *Microbiological Research* 150, 153-158.
- Atherholt, T. B., LeChevallier, M. W., Norton, W. D., Rosen, J. S.,** 1998. Effect of rainfall of *Giardia* and *Crypto*. *Journal of the American Water Works Association* 90, 66-80.
- Bae, J., Schwab, K.,** 2008. Evaluation of murine norovirus, feline calicivirus, poliovirus, and MS2 as surrogates for human norovirus in a model of viral persistence in surface water and groundwater. *Applied and Environmental Microbiology* 74, 477-484.
- Baffone, W., Casaroli, A., Citterio, B., Pierfelici, L., Campana, R., Vittoria, E., Guaglianone, E., Donelli, G.,** 2006. *Campylobacter jejuni* loss of culturability in aqueous microcosms and ability to resuscitate in a mouse model. *International Journal of Food Microbiology* 107, 83-91.
- Baudin, I., Gabard, N., Bernazeau, F., Laine, J. M.,** 2001. Suivi et optimisation des procédés de clarification pour l'élimination de *Cryptosporidium*. *Technique Science Méthodes* 96, 41-47.

- Bautista, E., Pezzani, B. C., Cordoba, A., De Luca, M. M., Basualdo, J. A.,** 1999. Relationship between the viability of oocysts of *Cryptosporidium sp.* and their behavior on a discontinuous sucrose gradient. *Relacion entre el gradiente discontinuo de sacarosa y la viabilidad de ooquistes de Cryptosporidium sp.* 31, 188-192.
- Baylis, C. L., MacPhee, S., Martin, K. W., Humphrey, T. J., Betts, R. P.,** 2000. Comparison of three enrichment media for the isolation of *Campylobacter* spp. from foods. *Journal of Applied Microbiology* 89, 884-891.
- Beaudeau, P., Bertin, L.,** 1999. Etude in situ sur la pertinence des nouveaux indicateurs pour le classement de la qualité des eaux de baignade. 58 p.
- Beaudeau, P., de Valk, H., Vaillant, V., Mannschott, C., Tillier, C., Mouly, D., Ledrans, M.,** 2008. Lessons learned from ten investigations of waterborne gastroenteritis outbreaks, France, 1998-2006. *Journal of Water and Health* 6, 491-503.
- Beaudeau, P., Valk, H., Vaillant, V., Mouly, D.,** 2007. Détection et investigation des épidémies d'infection liées à l'ingestion d'eau de distribution-Approche intégrée environnementale et sanitaire. Institut de Veille Sanitaire.
- Bell-Ajy, K., Abbaszadegan, M., Ibrahim, E., Verges, D., Lechevallier, M.,** 2000. Conventional and optimized coagulation for NOM removal. *Journal of the American Water Works Association* 92, 44-58.
- Beller, M., Ellis, A., Lee, S. H., Drebot, M. A., Jenkerson, S. A., Funk, E., Sobsey, M. D., Simmons III, O. D., Monroe, S. S., Ando, T., Noel, J., Petric, M., Middaugh, J. P., Spika, J. S.,** 1997. Outbreak of viral gastroenteritis due to a contaminated well: International consequences. *Journal of the American Medical Association* 278, 563-568.
- Belliot, G., Laveran, H., Monroe, S. S.,** 1997. Outbreak of gastroenteritis in military recruits associated with serotype 3 astrovirus infection. *Journal of Medical Virology* 51, 101-106.
- Betancourt, W. Q., Rose, J. B.,** 2004. Drinking water treatment processes for removal of *Cryptosporidium* and *Giardia*. *Veterinary Parasitology* 126, 219-234.
- Beumer, R. R., De Vries, J., Rombouts, F. M.,** 1992. *Campylobacter jejuni* non-culturable coccoid cells. *International Journal of Food Microbiology* 15, 153-163.
- Black, E. K., Finch, G. R., Taghikilani, R., Belosevic, M.,** 1996. Comparison of assays for *Cryptosporidium parvum* oocysts viability after chemical disinfection. *FEMS Microbiology Letters* 135, 187-189.
- Black, R. E., Levine, M. M., Clements, M. L., Hughes, T. P., Blaser, M. J.,** 1988. Experimental *Campylobacter jejuni* infection in humans. *Journal of Infectious Diseases* 157, 472-479.
- Blaser, M. J., Cody, H. J.,** 1986. Methods for isolating *Campylobacter jejuni* from low-turbidity water. *Applied and Environmental Microbiology* 51, 312-315.

- Blaser, M. J., Smith, P. F., Wang, W. L. L., Hoff, J. C.,** 1986. Inactivation of *Campylobacter jejuni* by chlorine and monochloramine. *Applied and Environmental Microbiology* 51, 307-311.
- Boccia, D., Tozzi, A. E., Benvon, C., Rizzo, C., Russo, T., Buttinelli, G., Caprioli, A., Marziano, M. L., Ruggeri, F. M.,** 2002. Waterborne outbreak of norwalk-like virus gastroenteritis at a tourist resort, Italy. *Emerging Infectious Diseases* 8, 563-568.
- Bogosian, G., Morris, P. J. L., O'Neil, J. P.,** 1998. A mixed culture recovery method indicates that enteric bacteria do not enter the viable but nonculturable state. *Applied and Environmental Microbiology* 64, 1736-1742.
- Bon, F., Ambert-Balay, K., Giraudon, H., Kaplon, J., Le Guyader, S., Pommepuy, M., Gallay, A., Vaillant, V., De Valk, H., Chikhi-Brachet, R., Flahaut, A., Pothier, P., Kohli, E.,** 2005. Molecular epidemiology of caliciviruses detected in sporadic and outbreak cases of gastroenteritis in France from December 1998 to February 2004. *Journal of Clinical Microbiology* 43, 4659-4664.
- Bopp, D. J., Sauders, B. D., Waring, A. L., Ackelsberg, J., Dumas, N., Braun-Howland, E., Dziewulski, D., Wallace, B. J., Kelly, M., Halse, T., Aruda Musser, K., Smith, P. F., Morse, D. L., Limberger, R. J.,** 2003. Detection, isolation, and molecular subtyping of *Escherichia coli* O157:H7 and *Campylobacter jejuni* associated with a large waterborne outbreak. *Journal of Clinical Microbiology* 41, 174-180.
- Borchardt, M. A., Bertz, P. D., Spencer, S. K., Battigelli, D. A.,** 2003. Incidence of enteric viruses in groundwater from household wells in Wisconsin. *Applied and Environmental Microbiology* 69, 1172-1180.
- Borchardt, M. A., Bradbury, K. R., Gotkowitz, M. B., Cherry, J. A., Parker, B. L.,** 2007. Human enteric viruses in groundwater from a confined bedrock aquifer. *Environmental Science and Technology* 41, 6606-6612.
- Borchardt, M. A., Haas, N. L., Hunt, R. J.,** 2004. Vulnerability of drinking-water wells in La Crosse, Wisconsin, to enteric-virus contamination from surface water contributions. *Applied and Environmental Microbiology* 70, 5937-5946.
- Bosch, A., Pintó, R. M., Abad, F. X.,** 2006. Survival and transport of enteric viruses in the environment. In "Viruses in Food", S. M. Goyal (Ed.). *Food Microbiology and Food Safety Series*. Springer, New York, NY, pp 151-187.
- Bosh, A., Lucena, F., Girones, R., Jofre, J.,** 1986. Survey of viral pollution in Besos river. *Journal of the Water Pollution Control Federation* 58, 87-91.
- Bovill, R. A., Mackey, B. M.,** 1997. Resuscitation of 'non-culturable' cells from aged cultures of *Campylobacter jejuni*. *Microbiology* 143, 1575-1581.
- Bower, W. A., Nainan, O. V., Han, X., Margolis, H. S.,** 2000. Duration of viremia in hepatitis A virus infection. *Journal of Infectious Diseases* 182, 12-17.

- Brassard, J., Guévremont, É., Gagné, M. J., Lamoureux, L., 2011.** Simultaneous recovery of bacteria and viruses from contaminated water and spinach by a filtration method. *International Journal of Food Microbiology* 144, 565-568.
- Brennhovd, O., Kapperud, G., Langeland, G., 1992.** Survey of thermotolerant *Campylobacter* spp. and *Yersinia* spp. in three surface water sources in Norway. *International Journal of Food Microbiology* 15, 327-338.
- Brescia, C. C., Griffin, S. M., Ware, M. W., Varughese, E. A., Egorov, A. I., Villegas, E. N., 2009.** *Cryptosporidium* propidium monoazide-PCR, a molecular biology-based technique for genotyping of viable *Cryptosporidium* oocysts. *Applied and Environmental Microbiology* 75, 6856-6863.
- Briancesco, R., Della Libera, S., Semproni, M., Bonadonna, L., 1999.** Relationship between *Cryptosporidium* and microbiological water quality parameters in raw water. *Journal of Preventive Medicine and Hygiene* 40, 39-42.
- Bridgman, S. A., Robertson, R. M. P., Syed, Q., Speed, N., Andrews, N., Hunter, P. R., 1995.** Outbreak of cryptosporidiosis associated with a disinfected groundwater supply. *Epidemiology and Infection* 115, 555-566.
- Brooks, H. A., Gersberg, R. M., Dharb, A. K., 2005.** Detection and quantification of hepatitis A virus in seawater via real-time RT-PCR. *Journal of Virological Methods* 127, 109-118.
- Brown, P. E., Christensen, O. F., Clough, H. E., Diggle, P. J., Hart, C. A., Hazel, S., Kemp, R., Leatherbarrow, A. J. H., Moore, A., Sutherst, J., Turner, J., Williams, N. J., Wright, E. J., French, N. P., 2004.** Frequency and spatial distribution of environmental *Campylobacter* spp. *Applied and Environmental Microbiology* 70, 6501-6511.
- Brown, M., Petric, M., 1986.** Evaluation of cell line 293 for virus isolation in routine viral diagnosis. *Journal of Clinical Microbiology* 23, 704-708.
- Bukhari, Z., McCuin, R. M., Fricker, C. R., Clancy, J. L., 1998.** Immunomagnetic separation of *Cryptosporidium parvum* from source water samples of various turbidities. *Applied and Environmental Microbiology* 64, 4495-4499.
- Burch, D. G. S., 2002.** Risk assessment - *Campylobacter* infection transmission from pigs to man using Erythromycin resistance as a marker. *Pig Journal* 50, 53-58.
- Buswell, C. M., Herlihy, Y. M., Lawrence, L. M., McGuiggan, J. T. M., Marsh, P. D., Keevil, C. W., Leach, S. A., 1998.** Extended survival and persistence of *Campylobacter* spp. in water and aquatic biofilms and their detection by immunofluorescent-antibody and -rRNA staining *Applied and Environmental Microbiology* 64, 733-741.
- Caccio, S. M., Thompson, R. C. A., McLauchlin, J., Smith, H. V., 2005.** Unravelling *Cryptosporidium* and *Giardia* epidemiology. *Trends in Parasitology* 21, 430-437.

- Campbell, A. T., Robertson, L. J., Smith, H. V.,** 1992. Viability of *Cryptosporidium parvum* oocysts: Correlation of in vitro excystation with inclusion or exclusion of fluorogenic vital dyes. *Applied and Environmental Microbiology* 58, 3488-3493.
- Cappelier, J. M., Magras, C., Jouve, J. L., Federighi, M.,** 1999. Recovery of viable but non-culturable *Campylobacter jejuni* cells in two animal models. *Food Microbiology* 16, 375-383.
- Carey, C. M., Lee, H., Trevors, J. T.,** 2004. Biology, persistence and detection of *Cryptosporidium parvum* and *Cryptosporidium hominis* oocyst. *Water Research* 38, 818-862.
- Carmena, D., Aguinagalde, X., Zigorraga, C., Fernandez-Crespo, J. C., Ocio, J. A.,** 2007. Presence of *Giardia* cysts and *Cryptosporidium* oocysts in drinking water supplies in northern Spain. *Journal of Applied Microbiology* 102, 619-629.
- Carreno, R. A., Pokorny, N. J., Weir, S. C., Lee, H., Trevors, J. T.,** 2001. Decrease in *Cryptosporidium parvum* oocyst infectivity in vitro by using the membrane filter dissolution method for recovering oocysts from water samples. *Applied and Environmental Microbiology* 67, 3309-3313.
- Carrique-Mas, J., Andersson, Y., Hjertqvist, M., Svensson, A., Torner, A., Giesecke, J.,** 2005. Risk factors for domestic sporadic campylobacteriosis among young children in Sweden. *Scandinave Journal of Infection Diseases* 37, 101-110.
- Carter, A. M., Pacha, R. E., Clark, G. W., Williams, E. A.,** 1987. Seasonal occurrence of *Campylobacter* spp. in surface waters and their correlation with standard indicator bacteria. *Applied and Environmental Microbiology* 53, 523-526.
- Castro-Hermida, J. A., Garcia-Presedo, I., Almeida, A., Gonzalez-Warleta, M., Correia Da Costa, J. M., Mezo, M.,** 2008a. Presence of *Cryptosporidium* spp. and *Giardia duodenalis* through drinking water. *Science of the Total Environment* 405, 45-53.
- Castro-Hermida, J. A., Garcia-Presedo, I., Almeida, A., Gonzalez-Warleta, M., Correia Da Costa, J. M., Mezo, M.,** 2009. Detection of *Cryptosporidium* spp. and *Giardia duodenalis* in surface water: A health risk for humans and animals. *Water Research* 43, 4133-4142.
- Castro-Hermida, J. A., Garcia-Presedo, I., Almeida, A., Gonzalez-Warleta, M., Da Costa, J. M. C., Mezo, M.,** 2008b. Contribution of treated wastewater to the contamination of recreational river areas with *Cryptosporidium* spp. and *Giardia duodenalis*. *Water Research* 42, 3528-3538.
- Cavereau, D., Lenes, D., Arnal, C., Arfi, C., Joret, J. C.,** 2009. Assessment of virus contamination risk in water resources. Evaluation de la vulnérabilité des ressources en eau vis-à-vis du risque viral 40, 1-15.
- Chang, B., Sugiyama, K., Taguri, T., Amemura-Maekawa, J., Kura, F., Watanabe, H.,** 2009. Specific detection of viable *Legionella* cells by combined use of photoactivated ethidium monoazide and PCR/real-time PCR. *Applied and Environmental Microbiology* 75, 147-153.

- Chapron, C. D., Ballester, N. A., Fontaine, J. H., Frades, C. N., Margolin, A. B.,** 2000. Detection of astroviruses, enteroviruses, and adenovirus types 40 and 41 in surface waters collected and evaluated by the information collection rule and an integrated cell culture-nested PCR procedure. *Applied and Environmental Microbiology* 66, 2520-2525.
- Chauret, C., Armstrong, N., Fisher, J., Sharma, R., Springthorpe, S., Sattar, S.,** 1995. Correlating *Cryptosporidium* and *Giardia* with microbial indicators. *Journal / American Water Works Association* 87, 76-84.
- Chauret, C. P., Radziminski, C. Z., Lepuil, M., Creason, R., Andrews, R. C.,** 2001. Chlorine dioxide inactivation of *Cryptosporidium parvum* oocysts and bacterial spore indicators. *Applied and Environmental Microbiology* 67, 2993-3001.
- Cheng, Z., Griffiths, M. W.,** 2003. Rapid detection of *Campylobacter jejuni* in chicken rinse water by melting-peak analysis of amplicons in real-time polymerase chain reaction. *Journal of Food Protection* 66, 1343- 1352.
- Choi, S., Jiang, S. C.,** 2005. Real-time PCR quantification of human adenoviruses in urban rivers indicates genome prevalence but low infectivity. *Applied and Environmental Microbiology* 71, 7426-7433.
- Chung, H., Jaykus, L. A., Sobsey, M. D.,** 1996. Detection of human enteric viruses in oysters by in vivo and in vitro amplification of nucleic acids. *Applied and Environmental Microbiology* 62, 3772-3778.
- Clark, C. G., Price, L., Ahmed, R., Woodward, D. L., Melito, P. L., Rodgers, F. G., Jamieson, F., Ciebin, B., Li, A., Ellis, A.,** 2003. Characterization of waterborne outbreak-associated *Campylobacter jejuni*, Walkerton, Ontario. *Emerg Infect Dis* 9, 1232-1241.
- Cools, I., Uyttendaele, M., Caro, C., D'Haese, E., Nelis, H. J., Debevere, J.,** 2003. Survival of *Campylobacter jejuni* strains of different origin in drinking water. *Journal of Applied Microbiology* 94, 886-892.
- Cools, I., Uyttendaele, M., D'Haese, E., Nelis, H. J., Debevere, J.,** 2006. Development of a real-time NASBA assay for the detection of *Campylobacter jejuni* cells. *Journal of Microbiological Methods* 66, 313-320.
- Corwin, A. L., Khiem, H. B., Clayson, E. T., Sac, P. K., Nhung, V. T. T., Yen, V. T., Cuc, C. T. T., Vaughn, D., Merven, J., Richie, T. L., Putri, M. P., He, J., Graham, R., Wignall, F. S., Hyams, K. C.,** 1996. A waterborne outbreak of hepatitis E virus transmission in southwestern Vietnam. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 54, 559-562.
- Craun, G. F., Berger, P. S., Calderon, R. L.,** 1997. Coliform bacteria and waterborne disease outbreaks. *Journal of the American Water Works Association* 89, 96-104.
- Cromeans, T. L., Kahler, A. M., Hill, V. R.,** 2010. Inactivation of adenoviruses, enteroviruses, and murine norovirus in water by free chlorine and monochloramine. *Applied and Environmental Microbiology* 76, 1028-1033.

- Daczowska-Kozon, E., Brzostek-Nowakowska, J.,** 2001. *Campylobacter* spp. in waters of three main Western Pomerania water bodies. *International Journal of Hygiene and Environmental Health* 203, 435-443.
- Dalle, F., Roz, P., Dautin, G., Di Palma, M., Kohli, E., Sire-Bidault, C., Fleischmann, M. G., Gallay, A., Carbonel, S., Bon, F., Tillier, C., Beaudou, P., Bonnin, A.,** 2003. Molecular characterization of isolates of waterborne *Cryptosporidium* spp. collected during an outbreak of gastroenteritis in South Burgundy, France. *Journal of Clinical Microbiology* 41, 2690-2693.
- Dasti, J. I., Tareen, A. M., Lugert, R., Zautner, A. E., Groß, U.,** 2010. *Campylobacter jejuni*: A brief overview on pathogenicity-associated factors and disease-mediating mechanisms. *International Journal of Medical Microbiology* 300, 205-211.
- Davison, A. J., Benko, M., Harrach, B.,** 2003. Genetic content and evolution of adenoviruses. *Journal of General Virology* 84, 2895-2908.
- de Roda Husman, A. M., Lodder, W. J., Rutjes, S. A., Schijven, J. F., Teunis, P. F. M.,** 2009 Long-term inactivation study of three Enteroviruses in artificial surface and groundwaters, using PCR and cell culture. *Applied and Environmental Microbiology* 75, 1050-1057.
- Debruyne, L., Gevers, D., Vandamme, P.,** 2005. Taxonomy of the family Campylobacteraceae. In *Campylobacter*, 3rd Edn, eds I. Nachamkin and M.J. Blaser (Washington, DC:ASM). 3-27.
- Delaunay, A., Gargala, G., Li, X., Favennec, L., Ballet, J. J.,** 2000. Quantitative flow cytometric evaluation of maximal *Cryptosporidium parvum* oocyst infectivity in a neonate mouse model. *Applied and Environmental Microbiology* 66, 4315-4317.
- Delom, E., Munoz, J. F.,** 2000. Caractérisation de la présence de *Campylobacter jejuni* dans un réseau de distribution d'eau d'alimentation. *Technique Science Méthodes* 9, 71-77.
- Denis, M., Soumet, C., Rivoal, K., Ermel, G., Blivet, D., Salvat, G., Colin, P.,** 1999. Development of a PCR assay for simultaneous identification of *Campylobacter jejuni* and *C. coli*. *Letters in Applied Microbiology* 29, 406-410.
- Denis, M., Tanguy, M., Chidaine, B., Laisney, M. J., Mégraud, F., Fravallo, P.,** 2009. Description and sources of contamination by *Campylobacter* spp. of river water destined for human consumption in Brittany, France. *Pathologie Biologie* 59, 256-263.
- Devane, M. L., Nicol, C., Ball, A., Klena, J. D., Scholes, P., Hudson, J. A., Baker, M. G., Gilpin, B. J., Garrett, N., Savill, M. G.,** 2005. The occurrence of *Campylobacter* subtypes in environmental reservoirs and potential transmission routes. *Journal of Applied Microbiology* 98, 980-990.
- DGS,** 2006. Avis du conseil supérieur d'hygiène publique de France- Section maladies transmissibles- Relatif à la vaccination anti-rotavirus chez les nourrissons de moins de six mois. Ministère de la Santé et des Solidarités.
- Di Giovanni, G. D., LeChevallier, M. W.,** 2005. Quantitative-PCR assessment of *Cryptosporidium parvum* cell culture infection. *Applied and Environmental Microbiology* 71, 1495-1500.

- Diergaardt, S. M., Venter, S. N., Spreeth, A., Theron, J., Brözel, V. S.,** 2004. The occurrence of campylobacters in water sources in South Africa. *Water Research* 38, 2589-2595.
- Dimmock, N. J.,** 1967. Differences between the thermal inactivation of Picornaviruses at high and low temperatures. *Virology* 31, 338-353.
- Divizia, M., Gabrieli, R., Donia, D., Macaluso, A., Bosch, A., Guix, S., Sánchez, G., Villena, C., Pintó, R. M., Palombi, L., Buonomo, E., Cenko, F., Leno, L., Bebeci, D., Bino, S.,** 2004. Waterborne gastroenteritis outbreak in Albania. *Water Science and Technology* 50, 57-61.
- Divizia, M., Ruscio, V., Degener, A. M., Panà, A.,** 1998. Hepatitis A virus detection in wastewater by PCR and hybridization. *New Microbiologica* 21, 161-167.
- Dong, Y., Kim, J., Lewis, G. D.,** 2010. Evaluation of methodology for detection of human adenoviruses in wastewater, drinking water, stream water and recreational waters. *Journal of Applied Microbiology* 108, 800-809.
- Dromigny, E.,** 2007. *Campylobacter*. In Monographies de microbiologie. Tec. et Doc. Lavoisier, Paris.
- Dubois, E.,** 1995. Contamination de l'environnement littoral par les Rotavirus du groupe A, Thèse université de Rennes, 154 p.
- DuPont, H. L., Chappell, C. L., Sterling, C. R., Okhuysen, P. C., Rose, J. B., Jakubowski, W.,** 1995. The infectivity of *Cryptosporidium parvum* in healthy volunteers. *New England Journal of Medicine* 332, 855-859.
- du Preez, M., Kfir, R., Coubrough, P.,** 1995. Investigation on injury of coliforms after chlorination. *Water Science and Technology* 31, 115-118.
- Durepaire, N., Pradie, M. P., Ploy, M. C., Mounier, M., Ranger-Rogez, S., Martin, C., Denis, F.,** 1995. Adenoviruses from stool samples in a university hospital. Comparison with other main enteropathogens (rotavirus, *Campylobacter*, *Salmonella*). *Pathologie Biologie* 43, 601-610.
- Eberhart-Phillips, J., Walker, N., Garrett, N., Bell, D., Sinclair, D., Rainger, W., Bates, M.,** 1997. Campylobacteriosis in New Zealand: results of a case-control study. *Journal of Epidemiology & Community Health* 51, 686-691.
- Edberg, S. C., Rice, E. W., Karlin, R. J., Allen, M. J.,** 2000. *Escherichia coli*: the best biological drinking water indicator for public health protection. *Symposium series (Society for Applied Microbiology)* 29, 106S-116S.
- EFSA,** 2011. The European Union Summary Report on Trends and Sources of Zoonoses, Zoonotic Agents and Food-borne Outbreaks in 2009. *EFSA Journal* 9, 2090.
- El-Sherbeeny, M. R., Bopp, C., Wells, J. G., Morris, G. K.,** 1985. Comparison of gauze swabs and membrane filters for isolation of *Campylobacter* spp. from surface water. *Applied and Environmental Microbiology* 50, 611-614.

- Ellis, K. V.**, 1991. Water disinfection: a review with some consideration of the requirements for the third world. *Critical Reviews in Environmental Control* 20,: 341-407.
- Engelbrecht, R. S., Weber, M. J., Salter, B. L., Schmidt, C. A.**, 1980. Comparative inactivation of viruses by chlorine. *Applied and Environmental Microbiology* 40, 249-256.
- Enriquez, C. E., Gerba, C. P.**, 1995. Concentration of enteric adenovirus 40 from tap, sea and waste water. *Water Research* 29, 2554-2560.
- Enriquez, C. E., Hurst, C. J., Gerba, C. P.**, 1995. Survival of the enteric adenoviruses 40 and 41 in tap, sea, and waste water. *Water Research* 29, 2548-2553.
- Espié, E., Rouaul, E., Gallay, A., Lehours, P., Mégraud, P.**, 2006. Bilan de la surveillance des infections à *Campylobacter* chez l'Homme en France en 2006. Bordeaux: Centre National de Référence des Campylobacters et Hélicobacters.  
[http://www.cnrch.u-bordeaux2.fr/Campylobacter\\_Bilan\\_surveillance\\_reseau\\_2006.pdf](http://www.cnrch.u-bordeaux2.fr/Campylobacter_Bilan_surveillance_reseau_2006.pdf).
- Espinosa, A. C., Mazari-Hiriart, M., Espinosa, R., Maruri-Avidal, L., Mendez, E., Arias, C. F.**, 2008. Infectivity and genome persistence of rotavirus and astrovirus in groundwater and surface water. *Water Research* 42, 2618-2628.
- Evans, M. R., Ribeiro, C. D., Salmon, R. L.**, 2003. Hazards of healthy living: bottled water and salad vegetables as risk factors for campylobacter infection. *Emerging Infectious Disease* 9, 1219-1225.
- Evans, M. R., Roberts, R. J., Ribeiro, C. D., Gardner, D., Kembrey, D.**, 1996. A milk-borne campylobacter outbreak following an educational farm visit. *Epidemiology and Infection* 117, 457-462.
- Farkas, T., Zhong, W. M., Jing, Y., Huang, P. W., Espinosa, S. M., Martinez, N., Morrow, A. L., Ruiz-Palacios, G. M., Pickering, L. K., Jiang, X.**, 2004. Genetic diversity among sapoviruses. *Archives of Virology* 149, 1309-1323.
- Fayer, R., Nerad, T.**, 1996. Effects of low temperatures on viability of *Cryptosporidium parvum* oocysts. *Applied and Environmental Microbiology* 62, 1431-1433.
- Federighi, M.**, 1999. *Campylobacter* et hygiène des aliments. Paris: Polytechnica. 160 p, pp 66-68.
- Federighi, M., Tholozan, J. L., Cappelier, J. M., Tissier, J. P., Jouve, J. L.**, 1998. Evidence of non-cocoid viable but non-culturable *Campylobacter jejuni* cells in microcosm water by direct viable count, CTC-DAPI double staining, and scanning electron microscopy. *Food Microbiology* 15, 539-550.
- Feng, Y., Zhao, X., Chen, J., Jin, W., Zhou, X., Li, N., Wang, L., Xiao, L.**, 2011. Occurrence, source, and human infection potential of *Cryptosporidium* and *Giardia* spp. in source and tap water in Shanghai, China. *Applied and Environmental Microbiology* 77, 3609-3616.
- Ferguson, C. M., Coote, B. G., Ashbolt, N. J., Stevenson, I. M.**, 1996. Relationships between indicators, pathogens and water quality in an estuarine system. *Water Research* 30, 2045-2054.

- Fernández, H., Vera, F., Villanueva, M. P., García, A.,** 2008. Occurrence of *Campylobacter* species in healthy well-nourished and malnourished children. *Brazilian Journal of Microbiology* 39, 1-3.
- Finch, G. R., Black, E. K., Gyurek, L., Belosevic, M.,** 1993. Ozone inactivation of *Cryptosporidium parvum* in demand-free phosphate buffer determined by in vitro excystation and animal infectivity. *Applied and Environmental Microbiology* 59, 4203-4210.
- Finch, G. R., Li, H.,** 1999. Inactivation of *Cryptosporidium* at 1°C using ozone or chlorine dioxide. *Ozone: Science and Engineering* 21, 477-486.
- Finch, G. R., Smith, D. W., Stiles, M. E.,** 1988. Dose-responses of *E. coli* in ozone demand-free phosphate buffer. *Water Research* 22, 1563-1570.
- Flekna, G., Stefanic, P., Wagner, M., Smulders, F. J. M., Mozina, S. S., Hein, I.,** 2007. Insufficient differentiation of live and dead *Campylobacter jejuni* and *Listeria monocytogenes* cells by ethidium monoazide (EMA) compromises EMA/real-time PCR. *Research in Microbiology* 158, 405-412.
- Fontaine, M., Guillot, E.,** 2003. An immunomagnetic separation-real-time PCR method for quantification of *Cryptosporidium parvum* in water samples. *Journal of Microbiological Methods* 54, 29-36.
- Foster, G., Holmes, B., Steigerwalt, A. G., Lawson, P. A., Thorne, P., Byrer, D. E., Ross, H. M., Xerry, J., Thompson, P. M., Collins, M. D.,** 2004. *Campylobacter insulaenigrae* sp.nov., isolated from marine mammals. *International Journal Of Systematic And Evolutionary Microbiology* 54, 2369-2373.
- Fout, G. S., Martinson, B. C., Moyer, M. W. N., Dahling, D. R.,** 2003. A multiplex reverse transcription-PCR method for detection of human enteric viruses in groundwater. *Applied and Environmental Microbiology* 69, 3158-3164.
- Foxman, B., Zhang, L., Koopman, J. S., Manning, S. D., Marrs, C. F.,** 2005. Choosing an appropriate bacterial typing technique for epidemiologic studies. *Epidemiologic Perspectives & Innovations* 2, 10.
- Fricke, C. R.,** 1987. A review: The isolation of salmonellas and campylobacters. *Journal of Applied Bacteriology* 63, 99-116.
- Fujioka, R. S., Yoneyama, B. S.,** 2002. Sunlight inactivation of human enteric viruses and fecal bacteria. *Water Science and Technology* 46, 291-295.
- Gallay, A., De Valk, H., Cournot, M., Ladeuil, B., Hemery, C., Castor, C., Bon, F., Mégraud, F., Le Cann, P., Desenclos, J. C.,** 2006. A large multipathogen waterborne community outbreak linked to faecal contamination of a groundwater system, France, 2000. *Clinical Microbiology and Infection* 12, 561-570.

- Gantzer, C., Maul, A., Audic, J. M., Schwartzbrod, L., 1998a.** Detection of infectious enteroviruses, enterovirus genomes, somatic coliphages, and *Bacteroides fragilis* phages in treated wastewater. *Applied and Environmental Microbiology* 64, 4307-4312.
- Gantzer, C., Maul, A., Levi, Y., Schwartzbrod, L., 1998b.** Fate of the genome and infectious units of *Coxsackie B3* virus in phosphate buffered saline. *Water Research* 32, 1329-1333.
- Gassilloud, B., 2003.** Adhésion-agrégation et dégradation des particules virales dans une eau minérale: cas d'*Enterovirus*, de *Norovirus* et de *Vesivirus*. Thèse d'Université, Université Henri Poincaré Nancy I, Nancy, France.
- Gassilloud, B., Schwartzbrod, L., Gantzer, C., 2003.** Presence of viral genomes in mineral water: A sufficient condition to assume infectious risk? *Applied and Environmental Microbiology* 69, 3965-3969.
- Gerba, C. P., Rose, J. B., Haas, C. N., 1996.** Sensitive populations: Who is at the greatest risk? *International Journal of Food Microbiology* 30, 113-123.
- Gibson, K. E., Opryszko, M. C., Schissler, J. T., Guo, Y., Schwab, K. J., 2011.** Evaluation of human enteric viruses in surface water and drinking water resources in southern Ghana. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 84, 20-29.
- Gimbel, R., Clasen, J., 1998.** International report: removal of micro-organisms by clarification and filtration processes. *Water Supply* 16, 203-208.
- Girones, R., Jofre, J., Bosch, A., 1989.** Natural inactivation of enteric viruses in seawater. *Journal of Environmental Quality* 18, 34-39.
- Girones, R., Puig, M., Allard, A., Lucena, F., Wadell, G., Jofre, J., 1995.** Detection of adenovirus and enterovirus by PCR amplification in polluted waters. *Water Science and Technology* 31, 351-357.
- Glaberman, S., Moore, J. E., Lowery, C. J., Chalmers, R. M., Sulaiman, I., Elwin, K., Rooney, P. J., Millar, B. C., Dooley, J. S., Lal, A. A., Xiao, L., 2002.** Three drinking-water-associated cryptosporidiosis outbreaks, Northern Ireland. *Emerging Infectious Diseases* 8, 631-633.
- Glass, R. I., Bresee, J., Jiang, B., Gentsch, J., Ando, T., Fankhauser, R., Noel, J., Parashar, U., Rosen, B., Monroe, S. S., 2001.** Gastroenteritis viruses: An overview, *Novartis Foundation Symposium*, Vol. 238, pp. 5-25.
- Godoy, P., Artigues, A., Nuín, C., Aramburu, J., Pérez, M., Domínguez, A., Salleras, L., 2002.** Outbreak of gastroenteritis caused by *Campylobacter jejuni* transmitted through drinking water. *Medicina Clinica* 119, 695-698.
- Gordon, C., Toze, S., 2003.** Influence of groundwater characteristics on the survival of enteric viruses. *Journal of Applied Microbiology* 95, 536-544.

- Grabow, W. O. K., Botma, K. L., De Villiers, J. C., Clay, C. G., Erasmus, B.,** 1999. Assessment of cell culture and polymerase chain reaction procedures for the detection of polioviruses in wastewater. *Bulletin of the World Health Organization* 77, 973-980.
- Grabow, W. O. K., Gauss Muller, V., Prozesky, O. W., Deinhardt, F.,** 1983. Inactivation of hepatitis A virus and indicator organisms in water by free chlorine residuals. *Applied and Environmental Microbiology* 46, 619-624.
- Grabow, W. O., Puttergill, D. L., Bosch, A.,** 1992. Propagation of adenovirus types 40 and 41 in the PLC/PRF/5 primary liver carcinoma cell line. *Journal of Virological Methods* 37, 201-217.
- Grabow, W. O. K., Taylor, M. B., De Villiers, J. C.,** 2001. New methods for the detection of viruses: Call for review of drinking water quality guidelines, *Water Science and Technology*, Vol. 43, pp. 1-8.
- Green, K. Y., Chanock, R. M., Kapikian, A. Z.,** 2001. Human caliciviruses. In Knipe DM, Howley PM, Griffin DE et al. eds. *Fields Virology*, 4th ed., New York: Raven Press: 841-74.
- Griffin, D. W., Lipp, E. K., McLaughlin, M. R., Rose, J. B.,** 2001. Marine recreation and public health microbiology: quest for the ideal indicator. *Bioscience* 51, 817-825.
- Griffiths, J. K., Moore, R., Dooley, S., Keusch, G. T., Tzipori, S.,** 1994. *Cryptosporidium parvum* infection of Caco-2 cell monolayers induces an apical monolayer defect, selectively increases transmonolayer permeability, and causes epithelial cell death. *Infection and Immunity* 62, 4506-4514.
- Grimm, A. C., Cashdollar, J. L., Williams, F. P., Fout, G. S.,** 2004. Development of an astrovirus RT-PCR detection assay for use with conventional, real-time, and integrated cell culture/RT-PCR. *Canadian Journal of Microbiology* 50, 269-278.
- Guillou, S., Leguerinel, I., Garrec, N., Renard, M. A., Cappelier, J. M., Federighi, M.,** 2008. Survival of *Campylobacter jejuni* in mineral bottled water according to difference in mineral content: Application of the Weibull model. *Water Research* 42, 2213-2219.
- Gut, J., Petersen, C., Nelson, R., Leech, J.,** 1991. *Cryptosporidium parvum*: in vitro cultivation in Madin-Darby canine kidney cells. *Journal of Protozoology* 38, 72S-73S.
- Guyonnet, J. P., Claudet, J.,** 2002. Epidémie de gastro-entérite aiguë à *Cryptosporidium* liée à la pollution des eaux d'alimentation de la ville de Sète. *Technique Science Méthodes* 97, 23-29.
- 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. *Applied and Environmental Microbiology* 69, 5178-5185.
- Guyot, K., Follet-Dumoulin, A., Lelièvre, E., Sarfati, C., Rabodonirina, M., Nevez, G., Cailliez, J. C., Camus, D., Dei-Cas, E.,** 2001. Molecular characterization of *Cryptosporidium* isolates obtained from humans in France. *Journal of Clinical Microbiology* 39, 3472-3480.

**Häfliger, D., Hübner, P., Lüthy, J.,** 2000. Outbreak of viral gastroenteritis due to sewage-contaminated drinking water. *International Journal of Food Microbiology* 54, 123-126.

**Hallier-Soulier, S., Guillot, E.,** 2003. An immunomagnetic separation-reverse transcription polymerase chain reaction (IMS-RT-PCR) test for sensitive and rapid detection of viable waterborne *Cryptosporidium parvum*. *Environmental Microbiology* 5, 592-598.

**Hänninen, M. L., Haajanen, H., Pummi, T., Wermundsen, K., Katila, M. L., Sarkkinen, H., Miettinen, I., Rautelin, H.,** 2003. Detection and typing of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* and analysis of indicator organisms in three waterborne outbreaks in Finland. *Applied and Environmental Microbiology* 69, 1391-1396.

**Hänninen, M. L., Hörman, A., Rimhanen-Finne, R., Vahtera, H., Malmberg, S., Herve, S., Lahti, K.,** 2005. Monitoring of *Cryptosporidium* and *Giardia* in the Vantaa river basin, southern Finland. *International Journal of Hygiene and Environmental Health* 208, 163-171.

**Haramoto, E., Katayama, H., Oguma, K., Ohgaki, S.,** 2005. Application of cation-coated filter method to detection of noroviruses, enteroviruses, adenoviruses, and torque teno viruses in the Tamagawa River in Japan. *Applied and Environmental Microbiology* 71, 2403-2411.

**Haramoto, E., Katayama, H., Oguma, K., Ohgaki, S.,** 2007. Quantitative analysis of human enteric adenoviruses in aquatic environments. *Journal of Applied Microbiology* 103, 2153-2159.

**Haramoto, E., Katayama, H., Phanwuan, C., Ohgaki, S.,** 2008. Quantitative detection of sapoviruses in wastewater and river in Japan. *Letters in Applied Microbiology* 46, 408-413.

**Harvey, P., Leach, S.,** 1998. Analysis of coccal cell formation by *Campylobacter jejuni* using continuous culture techniques, and the importance of oxidative stress. *Journal of Applied Microbiology* 85, 398-404.

**Harvey, R. B., Young, C. R., Ziprin, R. L., Hume, M. E., Genovese, K. J., Anderson, R. C., Droleskey, R. E., Stanker, L. H., Nisbet, D. J.,** 1999. Prevalence of *Campylobacter* spp. isolated from the intestinal tract of pigs raised in an integrated swine production system. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 215, 1601-1604.

**Hashimoto, S., Sakakibara, N., Kumai, H., Nakai, M., Sakuma, S., Chiba, S., Fujinaga, K.,** 1991. Fastidious human adenovirus type 40 can propagate efficiently and produce plaques on a human cell line, A549, derived from lung carcinoma. *Journal of Virology* 65, 2429-2435.

**Havelaar, A. H.,** 1993. A bacteriophage standard for bathing waters. Final report. European contract B4-3040/92/012609.

**Havelaar, A. H., Van Olphen, M., Drost, Y. C.,** 1993. F-specific RNA bacteriophages are adequate model organisms for enteric viruses in fresh water. *Applied Environmental Microbiology* 59, 2956-2962.

- He, J. W., Jiang, S.,** 2005. Quantification of enterococci and human adenoviruses in environmental samples by real-time PCR. *Applied and Environmental Microbiology* 71, 2250-2255.
- He, Y., Chen, C. Y.,** 2010. Quantitative analysis of viable, stressed and dead cells of *Campylobacter jejuni* strain 81-176. *Food Microbiology* 27, 439-446.
- He, X. Q., Cheng, E. L., Zhang, E. D. Y., Li, E. W., Xie, X. M., Ma, E. M., Wang, E. Z. J.,** 2009. First molecular detection of group a rotaviruses in drinking water sources in Beijing, China. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 83, 120–124.
- Hijnen, W. A. M., Bosklopper, T. G. J., Hofman, J. A. M. H., Bosch, A. D., Medema, G. J.,** 2001. Improvement of the disinfection efficiency of the full-scale ozonation of the River-lake waterworks of Amsterdam Water Supply. In: *Proceedings of the International Ozone Association Congress, September 2001, London.*
- Hirata, T., Shimura, A., Morita, S., Suzuki, M., Motoyama, N., Hoshikawa, H., Moniwa, T., Kaneko, M.,** 2001. The effect of temperature on the efficacy of ozonation for inactivating *Cryptosporidium parvum* oocysts, *Water Science and Technology*, Vol. 43, pp. 163-166.
- Höller, C., Martin, W.,** 1998. Evaluation of the direct viable count method for temperature stressed *Campylobacter coli*. *Journal of Microbiological Methods* 33, 157-162.
- Holme, R.,** 2003. Drinking water contamination in Walkerton, Ontario: positive resolutions from a tragic event. *Water Science and Technology* 47, 1-6.
- Hopkins, R. S., Gaspard, G. B., Williams Jr, F. P.,** 1984. A community waterborne gastroenteritis outbreak: Evidence for rotavirus as the agent. *American Journal of Public Health* 74, 263-265.
- Hörman, A., Rimhanen-Finne, R., Maunula, L., Von Bonsdorff, C. H., Torvela, N., Heikinheimo, A., Hänninen, M. L.,** 2004. *Campylobacter* spp., *Giardia* spp., *Cryptosporidium* spp., Noroviruses, and Indicator Organisms in Surface Water in Southwestern Finland, 2000-2001. *Applied and Environmental Microbiology* 70, 87-95.
- Hot, D., Legeay, O., Jacques, J., Gantzer, C., Caudrelier, Y., Guyard, K., Lange, M., Andréoletti, L.,** 2003. Detection of somatic phages, infectious enteroviruses and enterovirus genomes as indicators of human enteric viral pollution in surface water. *Water Research* 37, 4703-4710.
- Howe, A. D., Forster, S., Morton, S., Marshall, R., Osborn, K. S., Wright, P., Hunter, P. R.,** 2002. *Cryptosporidium* oocysts in a water supply associated with a cryptosporidiosis outbreak. *Emerging Infectious Diseases* 8, 619-624.
- Hsu, B. M., Huang, C., Hsu, Y. F., Jiang, G. Y., Hsu, C. L.,** 2001. Evaluation of two concentration methods for detecting *Giardia* and *Cryptosporidium* in water. *Water Research* 35, 419-424.
- Hsu, B. M., Huang, Y. L., Hsu, Y. F., Shih, F. C.,** 2008. Occurrence of protozoan and bacterial pathogens in water samples from small water systems in mountainous areas of Taiwan. *Journal of Environmental Engineering* 134, 389-394.

- Huang, J., Wang, L., Ren, N., Ma, F.,** 1997. Disinfection effect of chlorine dioxide on bacteria in water. *Water Research* 31, 607–613.
- Humphrey, T. J.,** 1989. An appraisal of the efficacy of pre-enrichment for the isolation of *Campylobacter jejuni* from water and food. *Journal of Applied Bacteriology* 66, 119-126.
- Hung, T., Chen, G. M., Wang, C. G., Chou, Z. Y., Chao, T. X., Ye, W. W., Yao, H. L., Meng, K. H.,** 1983. Rotavirus-like agent in adult non-bacterial diarrhoea in China. *Lancet* 2, 1078-1079.
- Hunt, N. K., Marinas, B. J.,** 1997. Kinetics of *E. coli* inactivation with ozone. *Water Research* 31, 1355-1362.
- Hurst, C. J.,** 1988. Effect of environmental variables on enteric virus survival in surface freshwaters. *Water Science and Technology* 20, 473-476.
- Hurst, C. J., Dahling, D. R., Safferman, R. S., Goyke, T.,** 1984. Comparison of commercial beef extracts and similar materials for recovering viruses from environmental samples. *Canadian Journal of Microbiology* 30, 1253-1263.
- Ikram, R., Chambers, S., Mitchell, P., Brieseman, M. A., Ikram, O. H.,** 1994. A case-control study to determine risk factors for campylobacter infection in Christchurch in the summer of 1992-3. *New Zealand Medical Journal* 107, 430-432.
- InVS,** 2003a. Épidémie de gastro-entérites à *Cryptosporidium*, Dracy-le-fort, Saone et Loire (71). Septembre 2001. Rapport d'investigation. Institut de veille sanitaire. 2003 Juin: 72 pages.
- InVS,** 2003b. Epidémie de gastro-entérites liée à la pollution du réseau de distribution d'eau potable de la commune de Divonne-les-Bains, Ain (01). Août-septembre 2003 / Gofiti Laroche L.
- InVS & CIRE SudOuest,** 2000. Épidémie de gastro-entérite à germes multiples liés à la consommation de l'eau de distribution, Gourdon. 48 p.
- Irmischer, R., Teermann, I.,** 2002. Riverbank filtration for drinking water supply- a proven method, perfect to face today's challenges. *Water Science and Technology* 2, 1-8.
- ISO 17995,** 2005. Water quality: Detection and enumeration of thermotolerant *Campylobacter* species. International Organization for Standardisation, Geneva, Switzerland.
- Ives, R. L., Kamarainen, A. M., John, D. E., Rose, J. B.,** 2007. Use of cell culture to assess *Cryptosporidium parvum* survival rates in natural groundwaters and surface waters. *Applied and Environmental Microbiology* 73, 5968-5970.
- Jackson, C. J., Fox, A. J., Wareing, D. R. A., Hutchinson, D. N., Jones, D. M.,** 1996. The application of genotyping techniques to the epidemiological analysis of *Campylobacter jejuni*. *Epidemiology and Infection* 117, 233-244.

- Jakopanec, I., Borgen, K., Vold, L., Lund, H., Forseth, T., Hannula, R., Nygard, K., 2008.** A large waterborne outbreak of campylobacteriosis in Norway: the need to focus on distribution system safety. *BMC Infectious Diseases* 8, 128.
- Jenkins, M. C., Trout, J., Abrahamsen, M. S., Lancto, C. A., Higgins, J., Fayer, R., 2000.** Estimating viability of *Cryptosporidium parvum* oocysts using reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR) directed at mRNA encoding amyloglucosidase. *Journal of Microbiological Methods* 43, 97-106.
- Jenkins, M., Trout, J. M., Higgins, J., Dorsch, M., Veal, D., Fayer, R., 2003.** Comparison of tests for viable and infectious *Cryptosporidium parvum* oocysts. *Parasitology Research* 89, 1-5.
- Jiang, S., Dezfulian, H., Chu, W., 2005.** Real-time quantitative PCR for enteric adenovirus serotype 40 in environmental waters. *Canadian Journal of Microbiology* 51, 393-398.
- Jiang, S., Noble, R., Chu, W., 2001.** Human adenoviruses and coliphages in urban runoff-impacted coastal waters of Southern California. *Applied and Environmental Microbiology* 67, 179-184.
- Jiang, S. C., 2006.** Human adenoviruses in water: Occurrence and health implications: A critical review. *Environmental Science and Technology* 40, 7132-7140.
- Jiang, S. C., Chu, W., 2004.** PCR detection of pathogenic viruses in southern California urban rivers. *Journal of Applied Microbiology* 97, 17-28.
- Jiang, S. C., Chu, W., He, J. W., 2007.** Seasonal detection of human viruses and coliphage in Newport Bay, California. *Applied and Environmental Microbiology* 73, 6468-6474.
- Jiang, Y. J., Liao, G. Y., Zhao, W., Sun, M. B., Qian, Y., Bian, C. X., Jiang, S. D., 2004.** Detection of infectious hepatitis A virus by integrated cell culture/strand-specific reverse transcriptase-polymerase chain reaction. *Journal of Applied Microbiology* 97, 1105-1112.
- John, D. E., Rose, J. B., 2005.** Review of factors affecting microbial survival in groundwater. *Environmental Science and Technology* 39, 7345-7356.
- Johnson, D. C., Enriquez, C. E., Pepper, I. L., Davis, T. L., Gerba, C. P., Rose, J. B., 1997.** Survival of *Giardia*, *Cryptosporidium*, poliovirus and *Salmonella* in marine waters. *Water Science and Technology* 35, 261-268.
- Jones, D. M., Sutcliffe, E. M., Curry, A., 1991.** Recovery of viable but non-culturable *Campylobacter jejuni*. *Journal of General Microbiology* 137, 2477-2482.
- Jones, I. G., Roworth, M., 1996.** An outbreak of *Escherichia coli* and campylobacteriosis associated with contamination of a drinking water supply. *Public Health (London)* 110, 277-282.
- Jones, K., 2001.** Campylobacters in water, sewage and the environment. Symposium series (Society for Applied Microbiology), 68S-79S.

- Josefsen, M. H., Jacobsen, N. R., Hoorfar, J.,** 2004. Enrichment followed by quantitative PCR both for rapid detection and as a tool for quantitative risk assessment of food-borne thermotolerant campylobacters. *Applied and Environmental Microbiology* 70, 3588-3592.
- Joshua, G. W. P., Guthrie-Irons, C., Karlyshev, A. V., Wren, B. W.,** 2006. Biofilm formation in *Campylobacter jejuni*. *Microbiology* 152, 387-396.
- Jothikumar, N., Cromeans, T. L., Hill, V. R., Lu, X., Sobsey, M. D., Erdman, D. D.,** 2005. Quantitative real-time PCR assays for detection of human adenoviruses and identification of serotypes 40 and 41. *Applied and Environmental Microbiology* 71, 3131-3136.
- Jothikumar, N., Paulmurugan, R., Padmanabhan, P., Balathiripura Sundari, R., Kamatchiammal, S., Subba Rao, K.,** 2000. Duplex RT-PCR for simultaneous detection of hepatitis A and hepatitis E virus isolated from drinking water samples. *Journal of Environmental Monitoring* 2, 587-590.
- Kaplan, J. E., Goodman, R. A., Schonberger, L. B.,** 1982. Gastroenteritis due to Norwalk virus: An outbreak associated with a municipal water system. *Journal of Infectious Diseases* 146, 190-197.
- Kapperud, G., Espeland, G., Wahl, E., Walde, A., Herikstad, H., Gustavsen, S., Tveit, I., Natas, O., Bevanger, L., Digranes, A.,** 2003. Factors associated with increased and decreased risk of campylobacter infection: a prospective case-control study in Norway. *American Journal of Epidemiology* 158, 234-242.
- Kapperud, G., Lassen, J., Ostroff, S. M., Aasen, S.,** 1992. Clinical features of sporadic campylobacter infections in Norway. *Scandinavian Journal of Infectious Diseases* 24, 741-749.
- Karanis, P., Sotiriadou, I., Kartashev, V., Kourenti, C., Tsvetkova, N., Stojanova, K.,** 2006. Occurrence of *Giardia* and *Cryptosporidium* in water supplies of Russia and Bulgaria. *Environmental Research* 102, 260-271.
- Katayama, H., Shimasaki, A., Ohgaki, S.,** 2002. Development of a virus concentration method and its application to detection of enterovirus and Norwalk virus from coastal seawater. *Applied and Environmental Microbiology* 68, 1033-1039.
- Keswick, B. H., Gerba, C. P., DuPont, H. L., Rose, J.,** 1984. Detection of Enteric Viruses in treated drinking water. *Applied and Environmental Microbiology* 47, 1290-1294.
- Ketley, J. M.,** 1997. Pathogenesis of enteric infection by *Campylobacter*. *Microbiology* 143, 5-21.
- Khan, I. U. H., Gannon, V., Loughborough, A., Jokinen, C., Kent, R., Koning, W., Lapen, D. R., Medeiros, D., Miller, J., Neumann, N., Phillips, R., Robertson, W., Schreier, H., Topp, E., van Bochove, E., Edge, T. A.,** 2009. A methods comparison for the isolation and detection of thermophilic *Campylobacter* in agricultural watersheds. *Journal of Microbiological Methods* 79, 307-313.

- Kim, S. H., Cheon, D. S., Kim, J. H., Lee, D. H., Jheong, W. H., Heo, Y. J., Chung, H. M., Jee, Y., Lee, J. S.,** 2005. Outbreaks of gastroenteritis that occurred during school excursions in Korea were associated with several waterborne strains of norovirus. *Journal of Clinical Microbiology* 43, 4836-4839.
- King, A. M. Q., Brown, F., Christian, P.,** 1999. Picornaviridae. In *Virus Taxonomy. Seventh Report of the International Committee for the Taxonomy of Viruses*. Edited by M.H.V. Van Regenmortel, C.M. Fauquet D.H.L Bishop, et al.; Academic press, San Diego, pp 5249-5254.
- King, B. J., Keegan, A. R., Monis, P. T., Saint, C. P.,** 2005. Environmental temperature controls *Cryptosporidium* oocyst metabolic rate and associated retention of infectivity. *Applied and Environmental Microbiology* 71, 3848-3857.
- King, C. H., Shotts Jr, E. B., Wooley, R. E., Porter, K. G.,** 1988. Survival of coliforms and bacterial pathogens within protozoa during chlorination. *Applied and Environmental Microbiology* 54, 3023-3033.
- King, L., Lehours, P., Mégraud, F.,** 2007. Bilan de la surveillance des infections à *Campylobacter* chez l'Homme en France en 2007. Bordeaux: Centre National de Référence des Campylobacters et Hélicobacters.  
[http://www.cnrch.u-bordeaux2.fr/Campylobacter\\_Bilan\\_surveillance\\_reseau\\_2007.pdf](http://www.cnrch.u-bordeaux2.fr/Campylobacter_Bilan_surveillance_reseau_2007.pdf).
- King, L., Lehours, P., Mégraud, F.,** 2008. Bilan de la surveillance des infections à *Campylobacter* chez l'Homme en France en 2008. Bordeaux: Centre National de Référence des Campylobacters et Hélicobacters.  
[http://www.cnrch.u-bordeaux2.fr/Campylobacter\\_Bilan\\_surveillance\\_reseau\\_2008.pdf](http://www.cnrch.u-bordeaux2.fr/Campylobacter_Bilan_surveillance_reseau_2008.pdf)
- King, L., Lehours, P., Mégraud, F.,** 2009. Bilan de la surveillance des infections à *Campylobacter* chez l'Homme en France en 2009. Bordeaux: Centre National de Référence des Campylobacters et Hélicobacters.  
<http://www.cnrch.u-bordeaux2.fr/wp-content/uploads/2011/03/CNRCH-Bilan-surveillance-Campylobacter-reseau-2009.pdf>.
- Kirk, R., Rowe, M. T.,** 1994. A PCR assay for the detection of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* in water. *Letters in Applied Microbiology* 19, 301-303.
- Kistemann, T., Classen, T., Koch, C., Dangendorf, F., Fischeder, R., Gebel, J., Vacata, V., Exner, M.,** 2002. Microbial load of drinking water reservoir tributaries during extreme rainfall and runoff. *Applied and Environmental Microbiology* 68, 2188-2197.
- Kittigul, L., Khamoun, P., Sujirarat, D., Utrarachkij, F., Chitpirom, K., Chaichantanakit, N., Vathanophas, K.,** 2001. An Improved Method for Concentrating Rotavirus from Water Samples. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz* 96, 815-821.

- Kittigul, L., Raengsakulrach, B., Siritantikorn, S., Kanyok, R., Utrarachkij, F., Diraphat, P., Thirawuth, V., Siripanichgon, K., Pungchitton, S., Chitpirom, K., Chaichantanakit, N., Vathanophas, K., 2000.** Detection of poliovirus, hepatitis A virus and rotavirus from sewage and water samples. *Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health* 31, 41-46.
- Kogure, K., Simidu, U., Taga, N., 1979.** A tentative direct microscopic method for counting living marine bacteria. *Canadian Journal of Microbiology* 25, 415-420.
- Kohli, E., Bon, F., Balay, K., Pothier, P., 2005.** Human caliciviruses, a major cause of acute gastroenteritis. *Les calicivirus humains, une cause majeure de gastro-entérite aiguë* 9, 93-106.
- Koopmans, M., Von Bonsdorff, C. H., Vinjé, J., De Medici, D., Monroe, S., 2002.** Foodborne viruses. *FEMS Microbiology Reviews* 26, 187-205.
- Kopecka, H. S., Dubrou, J., Prevot, J., Marechal, J., Lopez-Pila, M., 1993.** Detection of naturally occurring Enteroviruses in waters by reverse transcription, polymerase chain reaction, and hybridization. *Applied and Environmental Microbiology* 59, 1213-1219.
- Korhonen, L. K., Martikainen, P. J., 1991.** Comparison of the survival of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* in culturable form in surface water. *Canadian Journal of Microbiology* 37, 530-533.
- Korhonen, L. K., Martikainen, P. J., 1991.** Survival of *Escherichia coli* and *Campylobacter jejuni* in untreated and filtered lake water. *Journal of Applied Bacteriology* 71, 379-382.
- Korich, D. G., Marshall, M. M., Smith, H. V., O'Grady, J., Bukhari, Z., Fricker, C. R., Rosen, J. P.; Clancy, J. L., 2000.** Inter-laboratory comparison of the CD-1 neonatal mouse logistic dose-response model for *Cryptosporidium parvum* oocysts *The Journal of Eukaryotic Microbiology* 47, 294-298.
- Korich, D. G., Mead, J. R., Madore, M. S., Sinclair, N. A., Sterling, C. R., 1990.** Effects of ozone, chlorine dioxide, chlorine, and monochloramine on *Cryptosporidium parvum* oocyst viability. *Applied and Environmental Microbiology* 56, 1423-1428.
- Koroglu, M., Yakupogullari, Y., Otlu, B., Ozturk, S., Ozden, M., Ozer, A., Sener, K., Durmaz, R., 2011.** A waterborne outbreak of epidemic diarrhea due to group A rotavirus in malatya, Turkey. *New Microbiologica* 34, 17-24.
- Kuehn, W., Mueller, U., 2000.** Riverbank filtration: an overview. *Journal of the American Water Works Association* 92, 60-69.
- Kukkula, M., Arstila, P., Klossner, M. L., Maunula, L., Bonsdorff, C. H. V., Jaatinen, P., 1997.** Waterborne outbreak of viral gastroenteritis. *Scandinavian Journal of Infectious Diseases* 29, 415-418.
- Kukkula, M., Maunula, L., Silvennoinen, E., Von Bonsdorff, C. H., 1999.** Outbreak of viral gastroenteritis due to drinking water contaminated by Norwalk-like viruses. *Journal of Infectious Diseases* 180, 1771-1776.

- LaGier, M. J., Joseph, L. A., Passaretti, T. V., Musser, K. A., Cirino, N. M.,** 2004. A real-time multiplex PCR assay for rapid detection and differentiation of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli*. *Molecular and Cellular Probes* 18, 275- 282.
- Lambertini, E., Spencer, S. K., Bertz, P. D., Loge, F. J., Kieke, B. A., Borchardt, M. A.,** 2008. Concentration of enteroviruses, adenoviruses, and noroviruses from drinking water by use of glass wool filters. *Applied and Environmental Microbiology* 74, 2990-2996.
- Lappalainen, M., Chen, R. W., Maunula, L., von Bonsdorff, C. H., Plyusnin, A., Vaheri, A.,** 2001. Molecular epidemiology of viral pathogens and tracing of transmission routes: Hepatitis-, calici- and hantaviruses. *Journal of Clinical Virology* 21, 177-185.
- Lavanchy, D., Morel, B., Frei, P. C.,** 1994. Seroprevalence of hepatitis E virus in Switzerland. *Lancet* 344, 747-748.
- Lawson, H. W., Braun, M. M., Glass, R. I. M., Stine, S. E., Monroe, S. S., Atrash, H. K., Lee, L. E., Englander, S. J.,** 1991. Waterborne outbreak of Norwalk virus gastroenteritis at a southwest US resort: Role of geological formations in contamination of well water. *Lancet* 337, 1200-1204.
- LeChevallier, M. W., Di Giovanni, G. D., Clancy, J. L., Bukhari, Z., Bukhari, S., Hargy, T., Rosen, J. S., Sobrinho, J., Frey, M. M.,** 2003. Comparison of method 1623 and cell culture-PCR for detection of *Cryptosporidium* spp. in source waters. *Applied and Environmental Microbiology* 69, 971-979.
- LeChevallier, M. W., Norton, W. D., Lee, R. G.,** 1991. Occurrence of *Giardia* and *Cryptosporidium* spp. in surface water supplies. *Applied and Environmental Microbiology* 57, 2610-2616.
- LeChevallier, M. W., Seidler, R. J., Evans, T. M.,** 1980. Enumeration and characterization of standard plate count bacteria in chlorinated and raw water supplies. *Applied and Environmental Microbiology* 40, 922-930.
- Lee, H. K., Jeong, Y. S.,** 2004. Comparison of total culturable virus assay and multiplex integrated cell culture-PCR for reliability of waterborne virus detection. *Applied and Environmental Microbiology* 70, 3632-3636.
- Lee, S. H., Kim, S. J.,** 2002. Detection of infectious enteroviruses and adenoviruses in tap water in urban areas in Korea. *Water Research* 36, 248-256.
- Lee, S.H., Lee, C., Lee, K. W., Cho, H. B., Kim S. J.,** 2005. The simultaneous detection of both enteroviruses and adenoviruses in environmental water samples including tap water with an integrated cell culture-multiplex-nested PCR procedure. *Journal of Applied Microbiology* 98, 1020-1029.
- Lehtola, M. J., Pitkänen, T., Miebach, L., Miettinen, I. T.,** 2006. Survival of *Campylobacter jejuni* in potable water biofilms: A comparative study with different detection methods. *Water Science and Technology* 54, 57-61.

- Lewis, D. C., Lightfoot, N. F., Cubitt, W. D., Wilson, S. A.,** 1989. Outbreaks of astrovirus type 1 and rotavirus gastroenteritis in a geriatric in-patient population. *Journal of Hospital Infection* 14, 9-14.
- Lindquist, H. D. A., Harris, S., Lucas, S., Hartzel, M., Riner, D., Rochele, P., DeLeon, R.,** 2007. Using ultrafiltration to concentrate and detect *Bacillus anthracis*, *Bacillus atrophaeus* subspecies *globigii*, and *Cryptosporidium parvum* in 100-liter water samples. *Journal of Microbiological Methods* 70, 484-492.
- Liu, O. C., Seraichekas, H. R., Akin, E. W., Brashear, D. A., Datz, E. L.,** 1971. Relative resistance of twenty human enteric viruses to free chlorine in Potomac water. 13th Water Quality Conference, University of Illinois, Urbana.
- Liyanage, L. R. J., Finch, G. R., Belosevic, M.,** 1997. Sequential disinfection of *Cryptosporidium parvum* by ozone and chlorine dioxide. *Ozone: Science and Engineering* 19, 409-423.
- Lobo, M. L., Xiao, L., Antunes, F., Matos, O.,** 2009. Occurrence of *Cryptosporidium* and *Giardia* genotypes and subtypes in raw and treated water in Portugal. *Letters in Applied Microbiology* 48, 732-737.
- Logan, C., O'Leary, J. J., O'Sullivan, N.,** 2006. Real-time reverse transcription-PCR for detection of rotavirus and adenovirus as causative agents of acute viral gastroenteritis in children. *Journal of Clinical Microbiology* 44, 3189-3195.
- Logan, J. M. J., Edwards, K. J., Saunders, N. A., Stanley, J.,** 2001. Rapid identification of *Campylobacter* spp. by melting peak analysis of biprobes in real-time PCR. *Journal of Clinical Microbiology* 39, 2227- 2232.
- Lucey, B., O'Halloran, F., Fanning, S.,** 2004. Molecular-based identification and typing of *Campylobacter jejuni* and *C. coli*. *Methods in molecular biology* (Clifton, N.J.) 268, 33-47.
- Lukasik, J., Scott, T. M., Andryshak, D., Farrah, S. R.,** 2000. Influence of salts on virus adsorption to microporous filters. *Applied and Environmental Microbiology* 66, 2914-2920.
- Mac Kenzie, W. R., Hoxie, N. J., Proctor, M. E., Gradus, M. S., Blair, K. A., Peterson, D. E., Kazmierczak, J. J., Addiss, D. G., Fox, K. R., Rose, J. B., Davis, J. P.,** 1994. A massive outbreak in Milwaukee of *Cryptosporidium* infection transmitted through the public water supply. *New England Journal of Medicine* 331, 161-167.
- Martikainen, P. J., Korhonen, L. K., Kosunen, T. U.,** 1990. Occurrence of thermophilic campylobacters in rural and urban surface waters in central finland. *Water Research* 24, 91-96.
- Marx, F. E., Taylor, M. B., Grabow, W. O. K.,** 1998. The application of a reverse transcriptase-polymerase chain reaction-oligonucleotide probe assay for the detection of human astroviruses in environmental water. *Water Research* 32, 2147-2153.
- 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. *Journal of Applied Microbiology* 85, 755-761.

- Mathewson, J. J., Keswick, B. H., DuPont, H. L.,** 1983. Evaluation of filters for recovery of *Campylobacter jejuni* from water. *Applied and Environmental Microbiology* 46, 985-987.
- Maurer, A. M., Sturchler, D.,** 2000. A waterborne outbreak of small round structured virus, campylobacter and shigella co-infections in La Neuveville, Switzerland, 1998. *Epidemiology and Infection* 125, 325-332.
- McAnulty, J. M., Rubin, G. L., Carvan, C. T., Huntley, E. J., Grohmann, G., Hunter, R.,** 1993. An outbreak of Norwalk-like gastroenteritis associated with contaminated drinking water at a caravan park. *Australian Journal of Public Health* 17, 36-41.
- 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. *Canadian Journal of Microbiology* 46, 700-707.
- McCuin, R. M., 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. *Applied and Environmental Microbiology* 69, 267-274.
- Medema, G. J., Bahar, M., Schets, F. M.,** 1997. Survival of *Cryptosporidium parvum*, *Escherichia coli*, faecal enterococci and *clostridium perfringens* in river water: influence of temperature and autochthonous microorganisms. *Water Science and Technology* 35, 249-252.
- Medema, G. J., Schets, F. M., Van de Giessen, A. W., Havelaar, A. H.,** 1992. Lack of colonization of 1 day old chicks by viable, non-culturable *Campylobacter jejuni*. *Journal of Applied Bacteriology* 72, 512-516.
- Mégraud, F., Cerceau, R.,** 1990. Search for *Campylobacter* species in the public water supply of a large urban community. *Zentralblatt für mikrobiologi und Hygiene (Zentralblatt für Hygiene und Umweltmedizin)* 189, 536-42.
- Meinersmann, R. J., Hesel, L. O., Fields, P. I., Hiatt, K. L.,** 1997. Discrimination of *Campylobacter jejuni* isolates by fla gene sequencing. *Journal of Clinical Microbiology* 35, 2810-2814.
- Melby, K., Gondrosen, B., Gregusson, S., Ribe, H., Dahl, O. P.,** 1991. Waterborne campylobacteriosis in northern Norway. *International Journal of Food Microbiology* 12, 151-156.
- Ménard, A., Dachet, F., Prouzet-Mauleon, V., Oleastro, M., Mégraud, F.,** 2005. Development of a real-time fluorescence resonance energy transfer PCR to identify the main pathogenic *Campylobacter* spp. *Clinical Microbiology and Infection* 11, 281-287.
- Meqdam, M. M., Thwiny, I. R.,** 2007. Prevalence of group a rotavirus, enteric adenovirus, norovirus and astrovirus infections among children with acute gastroenteritis in Al-Qassim, Saudi Arabia. *Pakistan Journal of Medical Sciences* 23, 551-555.
- Messner, M. J., Chappell, C. L., Okhuysen, P. C.,** 2001. Risk assessment for *Cryptosporidium*: A hierarchical Bayesian analysis of human dose response data. *Water Research* 35, 3934-3940.

- Michaud, S., Menard, S., Arbeit, R. D.,** 2004. Campylobacteriosis, eastern townships, Quebec. *Emerging Infectious Disease* 10, 1844-1848.
- Miller, R. S., Miller, W. G., Behringer, M., Hariharan, H., Matthew, V., Oyarzabal, O. A.,** 2009. DNA identification and characterization of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* isolated from caecal samples of chickens in Grenada. *Journal of Applied Microbiology* 108, 1041-1049.
- Moe, C., Teunis, P., Lindesmith, L., Collins McNeal, E. J., Le Pendu, J., Treanor, J., Herrmann, L., Blacklow, N. R., Baric, R.,** 2004. Norovirus Dose Response. Second International Calicivirus conference. Dijon.
- Monroe, S. S., Stine, S. E., Gorelkin, L., Herrmann, J. E., Blacklow, N. R., Glass, R. I.,** 1991. Temporal synthesis of proteins and RNAs during human astrovirus infection of cultured cells. *Journal of Virology* 65, 641-648.
- Mons, C., Dume?tre, A., Gosselin, S., Galliot, C., Moulin, L.,** 2009. Monitoring of *Cryptosporidium* and *Giardia* river contamination in Paris area. *Water Research* 43, 211-217.
- Moore, J., Caldwell, P., Millar, B.,** 2001a. Molecular detection of *Campylobacter* spp. in drinking, recreational and environmental water supplies. *International Journal of Hygiene and Environmental Health* 204, 185-189.
- Moore, J. E., Caldwell, P. S., Millar, B. C., Murphy, P. G.,** 2001b. Occurrence of *Campylobacter* spp. in water in Northern Ireland: Implications for public health. *Ulster Medical Journal* 70, 102-107.
- Moreno, Y., Botella, S., Alonso, J. L., Ferrus, M. A., Hernandez, M., Hernandez, J.,** 2003. Specific detection of *Arcobacter* and *Campylobacter* strains in water and sewage by PCR and fluorescent in situ hybridization. *Applied and Environmental Microbiology* 69, 1181-1186.
- Moreno, Y., Hernandez, M., Ferrus, M. A., Alonso, J. L., Botella, S., Montes, R., Hernandez, J.,** 2001. Direct detection of thermotolerant *Campylobacter*s in chicken products by PCR and in situ hybridization. *Research in Microbiology* 152, 577- 582.
- Morgan-Ryan, U. M., Fall, A., Ward, L. A., Hijjawi, N., Sulaiman, I., Fayer, R., Andrew Thompson, R. C., Olson, M., Lal, A., Xiao, L.,** 2002. *Cryptosporidium hominis* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) from *Homo sapiens*. *Journal of Eukaryotic Microbiology* 49, 433-440.
- Morgan, J. A. W., Cranwell, P. A., Pickup, R. W.,** 1991. Survival of *Aeromonas salmonicida* in lake water. *Applied and Environmental Microbiology* 57, 1777-1782.
- Morgan, U. M., Thompson, R. C. A.,** 1998. PCR detection of *Cryptosporidium*: The way forward? *Parasitology Today* 14, 241-245.
- Muscillo, M., La Rosa, G., Marianelli, C., Zaniratti, S., Capobianchi, M. R., Cantiani, L., Carducci, A.,** 2001. A new RT-PCR method for the identification of reoviruses in seawater samples. *Water Research* 35, 548-556.

- Muscillo, M., Pourshaban, M., Iaconelli, M., Fontana, S., Di Grazia, A., Manzara, S., Fadda, G., Santangelo, R., La Rosa, G., 2008.** Detection and quantification of human adenoviruses in surface waters by nested PCR, TaqMan real-time PCR and cell culture assays. *Water, Air, and Soil Pollution* 191, 83-93.
- Nachamkin, I., Allos, B. M., Ho, T., 1998.** *Campylobacter* species and Guillain-Barre syndrome. *Clinical Microbiology Reviews* 11, 555-567.
- Nasser, A. M., Tchorch, Y., Fatta, B., 1993a.** Comparative survival of *E. coli*, F+ bacteriophages, HAV and *Poliovirus 1* in wastewater and groundwater. *Water Science and Technology* 27, 401-407.
- Nasser, A. M., Tchorch, Y., Fattal, B., 1993b.** Comparative survival of *E. coli*, F+bacteriophages, HAV and poliovirus 1 in wastewater and groundwater. *Water Science and Technology* 27, 401-407.
- Neimann, J., Engberg, J., Molbak, K., Wegner, H. C., 2003.** A case control study of risk factors for sporadic campylobacter infections in Denmark. *Epidemiology and Infection* 130, 353-366.
- Neumann, N. F., Gyurek, L. L., Finch, G. R., Belosevic, M., 2000.** Intact *Cryptosporidium parvum* oocysts isolated after in vitro excystation are infectious to neonatal mice. *FEMS Microbiology Letters* 183, 331-336.
- NF EN ISO 7899-2, 2000.** Qualité de l'eau. Recherche et dénombrement des entérocoques intestinaux. Partie 2: Méthode par filtration sur membrane. Association Française de Normalisation, France.
- NF EN ISO 9308-1, 2000.** Qualité de l'eau. Recherche et dénombrement des *Escherichia coli* et des bactéries coliformes. Partie 1: Méthode par filtration sur membrane.
- Ng, L. K., Sherburne, R., Taylor, D. E., Stiles, M. E., 1985.** Morphological forms and viability of *Campylobacter* species studied by electron microscopy. *Journal of Bacteriology* 164, 338-343.
- Nicand, E., Teyssou, R., Buisson, Y., 1998.** Le risque fécal viral en 1998. *Virologie* 2, 103-116.
- Nieminski, E. C., Schaefer III, F. W., Ongerth, J. E., 1995.** Comparison of two methods for detection of *Giardia* cysts and *Cryptosporidium* oocysts in water. *Applied and Environmental Microbiology* 61, 1714-1719.
- Noble, R. T., Lee, I. M., Schiff, K. C., 2004.** Inactivation of indicator micro-organisms from various sources of faecal contamination in seawater and freshwater. *Journal of Applied Microbiology* 96, 464-472.
- Nocker, A., Cheung, C. Y., Camper, A. K., 2006.** Comparison of propidium monoazide with ethidium monoazide for differentiation of live vs. dead bacteria by selective removal of DNA from dead cells. *Journal of Microbiological Methods* 67, 310-320.

Noel, J. S., Fankhauser, R. L., Ando, T., Monroe, S. S., Glass, R. I., 1999. Identification of a distinct common strain of 'Norwalk-like viruses' having a global distribution. *Journal of Infectious Diseases* 179, 1334-1344.

Nygård, K., Vold, L., Halvorsen, E., Bringeland, E., Røttingen, J. A., Aavitsland, P., 2004. Waterborne outbreak of gastroenteritis in a religious summer camp in Norway, 2002. *Epidemiology and Infection* 132, 223-229.

O'Reilly, C. E., Bowen, A. B., Perez, N. E., Sarisky, J. P., Shepherd, C. A., Miller, M. D., Hubbard, B. C., Herring, M., Buchanan, S. D., Fitzgerald, C. C., Hill, V., Arrowood, M. J., Xiao, L. X., Hoekstra, R. M., Mintz, E. D., Lynch, M. F., Bannerman, T., Bradley, B., Bratka, L., Carmean, J., Fugitt, R., Golden, S., Koch, E., Murphy, M., Salehi, E., Smith, F., Osborn, N. C., Wertenbach, J. M., Young, S. M., Baker, M., Bowman, C., Kolaz, H., Messer, B., Nabors, S., White, D., Achen, M., Agin, J., Brisker, T., Byrum, B., Flynn, T., Gerhardt, T., Gosnell, C., Kallis, T., Kirchner, C., McDonnell, D., Ott, M., Panico, P., Utter, C., Bopp, C. A., Browne, L. H., 2007. A waterborne outbreak of gastroenteritis with multiple etiologies among resort island visitors and residents: Ohio, 2004. *Clinical Infectious Diseases* 44, 506-512.

Obiri-Danso, K., Jones, K., 1999a. Distribution and seasonality of microbial indicators and thermophilic campylobacters in two freshwater bathing sites on the River Lune in northwest England. *Journal of Applied Microbiology* 87, 822-832.

Obiri-Danso, K., Jones, K., 1999b. The effect of a new sewage treatment plant on faecal indicator numbers, campylobacters and bathing water compliance in Morecambe Bay. *Journal of Applied Microbiology* 86, 603-614.

Obiri-Danso, K., Paul, N., Jones, K., 2001. The effects of UVB and temperature on the survival of natural populations and pure cultures of *Campylobacter jejuni*, *Camp. coli*, *Camp. lari* and urease-positive thermophilic campylobacters (UPTC) in surface waters. *Journal of Applied Microbiology* 90, 256-267.

Ogorzaly, L., Bertrand, I., Paris, M., Maul, A., Gantzer, C., 2010. Occurrence, survival, and persistence of human adenoviruses and F-specific RNA phages in raw groundwater. *Applied and Environmental Microbiology* 76, 8019-8025.

Ogorzaly, L., Tissier, A., Bertrand, I., Maul, A., Gantzer, C., 2009. Relationship between F-specific RNA phage genogroups, faecal pollution indicators and human adenoviruses in river water. *Water Research* 43, 1257-1264.

OIE, 2005. «Cryptosporidiose » chapitre. 2.10.9 Manuel terrestre de l'OIE.

Oishi, I., Yamazaki, K., Kimoto, T., Minekawa, Y., Utagawa, E., Yamazaki, S., Inouye, S., Grohmann, G. S., Monroe, S. S., Stine, S. E., Carcamo, C., Ando, T., Glass, R. I., 1994. A large outbreak of acute gastroenteritis associated with astrovirus among students and teachers in Osaka, Japan. *Journal of Infectious Diseases* 170, 439-443.

Okhuysen, P. C., Chappell, C. L., 2002. *Cryptosporidium* virulence determinants-are we there yet? *International Journal of Parasitology* 32, 517-525.

- Okhuysen, P. C., Chappell, C. L., Crabb, J. H., Sterling, C. R., DuPont, H. L.,** 1999. Virulence of three distinct *Cryptosporidium parvum* isolates for healthy adults. *Journal of Infectious Diseases* 180, 1275-1281.
- Oliver, J. D.,** 2000. The public health significance of viable but nonculturable bacteria, p. 277-299. In R.R. Colwell and D.J. Grimes (eds.), *Nonculturable Microorganisms in the Environment*. American Society for Microbiology Press, Washington, D.C.
- Oliver, J. D.,** 2005. The viable but nonculturable state in bacteria. *Journal of Microbiology* 43, 93-100.
- Oliver, J. D., Dagher, M., Linden, K.,** 2005. Induction of *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium* into the viable but nonculturable state following chlorination of wastewater. *Journal of Water and Health* (in press).
- On, S. L.,** 2001. Taxonomy of *Campylobacter*, *Arcobacter*, *Helicobacter* and related bacteria: current status, future prospects and immediate concerns. Symposium series (Society for Applied Microbiology), 1S-15S.
- On, S. L. W.,** 1996. Identification methods for campylobacters, helicobacters, and related organisms. *Clinical Microbiology Reviews* 9, 405-422.
- Owen, R. J., Hernandez, J.,** 1993. Ribotyping and arbitrary primer PCR fingerprinting of campylobacters. *Society for Applied Microbiology Symposium Series* 31, 265-285.
- Oyofe, B. A., Rollins, D. M.,** 1993. Efficacy of filter types for detecting *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* in environmental water samples by polymerase chain reaction. *Applied and Environmental Microbiology* 59, 4090-4095.
- Papapetropoulou, M., Vantarakis, A. C.,** 1998. Detection of adenovirus outbreak at a municipal swimming pool by nested PCR amplification. *Journal of Infection* 36, 101-103.
- Park, S. H., Kim, E. J., Yun, T. H., Lee, J. H., Kim, C. K., Seo, Y. H., Oh, S. A., Choi, S. S., Cho, S. J., Kim, M. S., Han, G. Y., Kim, M. Y., Jeong, H. S., Cheon, D. S., Kim, H. S.,** 2010. Human enteric viruses in groundwater. *Food and Environmental Virology* 2, 69-73.
- Parkhill, J., Wren, B. W., Mungall, K., Ketley, J. M., Churcher, C., Basham, D., Chillingworth, T., Davies, R. M., Feltwell, T., Holroyd, S., Jagels, K., Kartyshev, A. V., Moule, S., Pallen, M. J., Penn, C. W., Quail, M. A., Rajandream, M. A., Rutherford, K. M., Van Vliet, A. H. M., Whitehead, S., Barrell, B. G.,** 2000. The genome sequence of the food-borne pathogen *Campylobacter jejuni* reveals hypervariable sequences. *Nature* 403, 665-668.
- Parr, J. B., Sevilleja, J. E., Amidou, S., Alcantara, C., Stroup, S. E., Kohli, A., Fayer, R., Lima, A. A. M., Houpt, E. R., Guerrant, R. L.,** 2007. Detection and quantification of *Cryptosporidium* in HCT-8 cells and human fecal specimens using real-time polymerase chain reaction. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 76, 938-942.

- 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. *Canadian Journal of Microbiology* 46, 565-576.
- Payment, P., Franco, E., Shay Fout, G.,** 1994. Incidence of Norwalk virus infections during a prospective epidemiological study of drinking water related gastrointestinal illness. *Canadian Journal of Microbiology* 40, 805-809.
- Payment, P., Trudel, M., Plante, R.,** 1985. Elimination of viruses and indicator bacteria at each step of treatment during preparation of drinking water at seven water treatment plants. *Applied Environmental Microbiology* 49, 1418-1428.
- Pedley, S., Yates, M., Schijven, J.F., West, J., Howard, G., Barrett, M.,** 2006. "Pathogens: health relevance, transport, and attenuation." In: *Protecting groundwater for health: managing the quality of drinking water sources*. O. Schmoll, G. Howard, J. Chilton, and I. Chorus, eds. IWA Publishing, London.
- Peeters, J. E., Mazas, E. A., Masschelein, W. J., Villacorta Martinez de Maturana, I., Debacker, E.,** 1989. Effect of disinfection of drinking water with ozone or chlorine dioxide on survival of *Cryptosporidium parvum* oocysts. *Applied and Environmental Microbiology* 55, 1519-1522.
- Pelly, H., Cormican, M., O'Donovan, D., Chalmers, R., Hanahoe, B., Cloughley, R., McKeown, P., Corbett-Feeney, G.,** 2007. A large outbreak of cryptosporidiosis in western Ireland linked to public water supply: a preliminary report. *Euro Surveillance* 12, E070503.3.
- Pianetti, A., Baffone, W., Citterio, B., Casaroli, A., Bruscolini, F., Salvaggio, L.,** 2000. Presence of enteroviruses and reoviruses in the waters of the Italian coast of the Adriatic Sea. *Epidemiology and Infection* 125, 455-462.
- Pieniazek, N. J., Bornay-Llinares, F. J., Slemenda, S. B., Da Silva, A. J., Moura, I. N. S., Arrowood, M. J., Ditrich, O., Addiss, D. G.,** 1999. New *Cryptosporidium* genotypes in HIV-infected persons. *Emerging Infectious Diseases* 5, 444-449.
- Pina, S., Buti, M., Jardí, R., Clemente-Casares, P., Jofre, J., Girones, R.,** 2001. Genetic analysis of hepatitis A virus strains recovered from the environment and from patients with acute hepatitis. *Journal of General Virology* 82, 2955-2963.
- Pina, S., Puig, M., Lucena, F., Jofre, J., Girones, R.,** 1998. Viral pollution in the environment and in shellfish: Human adenovirus detection by PCR as an index of human viruses. *Applied and Environmental Microbiology* 64, 3376-3382.
- Pinto, R. M., Gajardo, R., Abad, F. X., Bosch, A.,** 1995. Detection of fastidious infectious enteric viruses in water. *Environmental Science and Technology* 29, 2636-2638.

**Plutzer, J., Karanis, P., Domokos, K., Torokne, A., Marialigeti, K.,** 2008. Detection and characterisation of *Giardia* and *Cryptosporidium* in Hungarian raw, surface and sewage water samples by IFT, PCR and sequence analysis of the SSUrRNA and GDH genes. *International Journal of Hygiene and Environmental Health* 211, 524–533.

**Pokorný, J.,** 1990. To the problem of *Campylobacter jejuni* detectability in water. *Journal of Hygiene Epidemiology Microbiology and Immunology* 34, 57-61.

**Polaczyk, A. L., Narayanan, J., Cromeans, T. L., Hahn, D., Roberts, J. M., Amburgey, J. E., Hill, V. R.,** 2008. Ultrafiltration-based techniques for rapid and simultaneous concentration of multiple microbe classes from 100-L tap water samples. *Journal of Microbiological Methods* 73, 92-99.

**Polaczyk, A. L., Roberts, J. M., Hill, V. R.,** 2007. Evaluation of 1MDS electropositive microfilters for simultaneous recovery of multiple microbe classes from tap water. *Journal of Microbiological Methods* 68, 260-266.

**Rab, M. A., Bile, M. K., Mubarik, M. M., Asghar, H., Sami, Z., Siddiqi, S., Dil, A. S., Barzgar, M. A., Chaudhry, M. A., Burney, M. I.,** 1997. Water-borne hepatitis E virus epidemic in Islamabad, Pakistan: A common source outbreak traced to the malfunction of a modern water treatment plant. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 57, 151-157.

**Reinoso, R., Becares, E., Smith, H. V.,** 2008. Effect of various environmental factors on the viability of *Cryptosporidium parvum* oocysts. *Journal of Applied Microbiology* 104, 980-986.

**Rennecker, J. L., Marias, B. J., Owens, J. H., Rice, E. W.,** 1999. Inactivation of *Cryptosporidium parvum* oocysts with ozone. *Water Research* 33, 2481-2488.

**Reynolds, K. A.,** 2004. Integrated cell culture/PCR for detection of enteric viruses in environmental samples. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)* 268, 69-78.

**Reynolds, K. A., Gerba, C. P., Abbaszadegan, M., Pepper, I. L.,** 2001. ICC/PCR detection of enteroviruses and hepatitis A virus in environmental samples. *Canadian Journal of Microbiology* 47, 153-157.

**Richardson, G., Thomas, D. R., Smith, R. M., Nehaul, L., Ribeiro, C. D., Brown, A. G., Salmon, R. L.,** 2007. A community outbreak of *Campylobacter jejuni* infection from a chlorinated public water supply. *Epidemiology and Infection* 135, 1151-1158.

**Rigotto, C., Hanley, K., Rochelle, P. A., De Leon, R., Barardi, C. R. M., Yates, M. V.,** 2011. Survival of Adenovirus Types 2 and 41 in surface and ground waters measured by a plaque assay. *Environmental Science and Technology* 45, 4145-4150.

**Rigotto, C., Kolesnikovas, C. K., Moresco, V., Simões, C. M. O., Barardi, C. R. M.,** 2009. Evaluation of HA negatively charged membranes in the recovery of human adenoviruses and hepatitis A virus in different water matrices. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz* 104, 970-974.

- Robertson, L. J., Campbell, A. T., Smith, H. V.,** 1992. Survival of *Cryptosporidium parvum* oocysts under various environmental pressures. *Applied and Environmental Microbiology* 58, 3494-3500.
- Robertson, L. J., Campbell, A. T., Smith, H. V., Jenkins, M. B., Ghiorse, W. C., Anguish, L. J., Bowman, D. D., Walker, M. J.,** 1998. Viability of *Cryptosporidium parvum* oocysts: Assessment by the dye permeability assay (multiple letters). *Applied and Environmental Microbiology* 64, 3544-3545.
- Rochelle, P. A., Marshall, M. M., Mead, J. R., Johnson, A. M., Korich, D. G., Rosen, J. S., De Leon, R.,** 2002. Comparison of in vitro cell culture and a mouse assay for measuring infectivity of *Cryptosporidium parvum*. *Applied and Environmental Microbiology* 68, 3809-3817.
- Rodriguez-Salinas, P. E., Aragon Pena, A. J., Allue, T. M., Lopaz Perez, M. A., Jimenez, M. M., Dominguez Rodriguez, M. J.,** 2000. Outbreak of cryptosporidiosis in Guadarrama (Autonomous Community of Madrid) [In Spanish]. *Revista Española de Salud Pública* 74, 527-536.
- Rodríguez, S., Araujo, R.,** 2010. Occurrence of thermotolerant *Campylobacter* species in surface waters of a Mediterranean area and in its prevailing pollution sources. *Journal of Applied Microbiology* 109, 1027-1034.
- Rollins, D. M., Colwell, R. R.,** 1986. Viable but nonculturable stage of *Campylobacter jejuni* and its role in survival in the natural aquatic environment. *Applied and Environmental Microbiology* 52, 531-538.
- Rosales, M. J., Cifuentes, J., Mascaro, C.,** 1993. *Cryptosporidium parvum*: Culture in MDCK cells. *Experimental Parasitology* 76, 209-212.
- Rose, J. B., Gerba, C. P.,** 1991. Use of risk assessment for development of microbial standards. *Water Science and Technology* 24, 29-34.
- Rosef, O., Rettedal, G., Lågeide, L.,** 2001. Thermophilic campylobacters in surface water: A potential risk of campylobacteriosis. *International Journal of Environmental Health Research* 11, 321-327.
- Rudi, K., Moen, B., Dromtorp, S. M., Holck, A. L.,** 2005. Use of ethidium monoazide and PCR in combination for quantification of viable and dead cells in complex samples. *Applied and Environmental Microbiology* 71, 1018-1024.
- Rueckert, A., Morgan, H. W.,** 2007. Removal of contaminating DNA from polymerase chain reaction using ethidium monoazide. *Journal of Microbiological Methods* 68, 596-600.
- Rueckert, R. R.,** 1996. Picornaviridae: the viruses and their replication. In *Fundamental virology*, third edition. Fields, B.N., Knipe, D.M., Howley, R.M., et al. eds. Philadelphia, Lipincott-Raven publishers. pp 609-654.
- Russell, W. C.,** 2000. Update on adenovirus and its vectors. *Journal of General Virology* 81, 2573-2604.

- Sailaja, B., Murhekar, M. V., Hutin, Y. J., Kuruva, S., Murthy, S. P., Reddy, K. S. J., Rao, G. M., Gupte, M. D.,** 2009. Outbreak of waterborne hepatitis E in Hyderabad, India, 2005. *Epidemiology and Infection* 137, 234-240.
- Sails, A. D., Bolton, F. J., Fox, A. J., Wareing, D. R. A., Greenway, D. L. A.,** 1998. A reverse transcriptase polymerase chain reaction assay for the detection of thermophilic *Campylobacter* spp. *Molecular and Cellular Probes* 12, 317-322.
- Sails, A. D., Bolton, F. J., Fox, A. J., Wareing, D. R. A., Greenway, D. L. A.,** 2002. Detection of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* in environmental waters by PCR enzyme-linked immunosorbent assay. *Applied and Environmental Microbiology* 68, 1319-1324.
- Sails, A. D., Fox, A. J., Bolton, F. J., Wareing, D. R. A., Greenway, D. L. A.,** 2003. A real-time PCR assay for the detection of *Campylobacter jejuni* in foods after enrichment culture. *Applied and Environmental Microbiology* 69, 1383- 1390.
- Savill, M. G., Hudson, J. A., Ball, A., Klena, J. D., Scholes, P., Whyte, R. J., McCormick, R. E., Jankovic, D.,** 2001. Enumeration of *Campylobacter* in New Zealand recreational and drinking waters. *Journal of Applied Microbiology* 91, 38-46.
- Schets, F. M., van Wijnen, J. H., Schijven, J. F., Schoon, H., de Roda Husman, A. M.,** 2008. Monitoring of waterborne pathogens in surface waters in amsterdam, the Netherlands, and the potential health risk associated with exposure to Cryptosporidium and giardia in these waters. *Applied and Environmental Microbiology* 74, 2069-2078.
- Schonberg-Norio, D., Takkinen, J., Hannien, M. L., Katila, M. L., Kaukoranta, S. S., Mattila, L., Rautelin, H.,** 2004. Swimming and campylobacter infections. *Emerging Infectious Disease* 10, 1474-1477.
- Schubert, J.,** 2002. Water quality improvements with riverbank filtration at Düsseldorf waterworks in Germany. In: Ray, C., Melin, G., Linsky, R. B. (eds) *Riverbank filtration: improving source water quality*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, pp 267-280.
- Schvoerer, E., Bonnet, F., Dubois, V., Cazaux, G., Serceau, R., Fleury, H. J. A., Lafon, M. E.,** 2000. PCR detection of human enteric viruses in bathing areas, waste waters and human stools in southwestern France. *Research in Microbiology* 151, 693-701.
- Schwab, K. J., De Leon, R., Sobsey, M. D.,** 1995. Concentration and purification of beef extract mock eluates from water samples for the detection of enteroviruses, hepatitis A virus, and Norwalk virus by reverse transcription-PCR. *Applied and Environmental Microbiology* 61, 531-537.
- Schwartzbrod, L.,** 2000. Virus humains et santé publique: conséquences de l'utilisation des eaux usées et des boues en agriculture et conchyliculture. Centre collaborateur OMS pour les micro-organismes dans les eaux usées, Université de Nancy, France, 292 pages.
- Schwartzbrod, L., Bosch, A.,** 1991. Principes généraux de mise en évidence des virus du milieu hydrique in "Virologie des milieux hydriques". Schwartzbrod L. ed. Tec. et Doc. Lavoisier, Paris.

- Sellwood, J., Dadswell, J. V., Slade, J. S.,** 1981. Viruses in sewage as an indicator of their presence in the community. *Journal of Hygiene* 86, 217-225.
- Shamrukh, M., Abdel-Wahab, A.,** 2008. Riverbank filtration for sustainable water supply: application to a large-scale facility on the Nile River. *Clean Technologies and Environmental Policy* 10.
- Sharp, D. G., Young, D. C., Floyd, R., Johnson, J. D.,** 1980. Effect of ionic environment on the inactivation of poliovirus in water by chlorine. *Applied and Environmental Microbiology* 39, 530-534.
- Shaw, N. J., Villegas, L. F., Eldred, B. J., Gaynor, D. H., Warden, P. S., Pepich, B. V.,** 2008. Modification to EPA Method 1623 to address a unique seasonal matrix effect encountered in some U.S. source waters. *Journal of Microbiological Methods* 75, 445-448.
- Shepherd, K. M., Wyn-Jones, A. P.,** 1995. Evaluation of different filtration techniques for the concentration of *Cryptosporidium* oocysts from water. *Water Science and Technology* 31, 425-429.
- Shepherd, K. M., Wyn-Jones, A. P.,** 1996. An evaluation of methods for the simultaneous detection of *Cryptosporidium* oocysts and *Giardia* cysts from water. *Applied and Environmental Microbiology* 62, 1317-1322.
- Shields, J. M., Hill, V. R., Arrowood, M. J., Beach, M. J.,** 2008. Inactivation of *Cryptosporidium parvum* under chlorinated recreational water conditions. *Journal of Water and Health* 6, 513-520.
- Shin, G. A., Sobsey, M. D.,** 2003. Reduction of Norwalk virus, poliovirus 1, and bacteriophage MS2 by ozone disinfection of water. *Applied and Environmental Microbiology* 69, 3975-3978.
- Shin, G. A., Sobsey, M. D.,** 2008. Inactivation of norovirus by chlorine disinfection of water. *Water Research* 42, 4562-4568.
- Silva, A. M. V., Leite, E. G., Assis, R. M. S., Majerowicz, S., Leite, J. P. G.,** 2001. An outbreak of gastroenteritis associated with Astrovirus serotype 1 in a day care center, in Rio de Janeiro, Brazil. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz* 96, 1069-1073.
- Silva, J., Leite, D., Fernandes, M., Mena, C., Gibbs, P. A., Teixeira, P.,** 2011. *Campylobacter* spp. as a foodborne pathogen: a review. *Frontiers in Microbiology* 2, 200.
- Simkova, A., Cervenka, J.,** 1981. Coliphages as ecological indicators of Enteroviruses in various water systems. *Bulletin of the World Health Organization* 59, 611-618.
- Simmons III, O. D., Sobsey, M. D., Heaney, C. D., Schaefer III, F. W., Francy, D. S.,** 2001. Concentration and detection of *Cryptosporidium* oocysts in surface water samples by method 1622 using ultrafiltration and capsule filtration. *Applied and Environmental Microbiology* 67, 1123-1127.
- Skirrow, M. B., Jones, D. M., Sutcliffe, E., Benjamin, J.,** 1993. *Campylobacter* bacteraemia in England and Wales, 1981-91. *Epidemiology and Infection* 110, 567-573.

- Skraber, S.**, 2003. Intérêt des bactériophages en tant que témoin de contamination fécale et de présence de virus entériques pathogènes dans les eaux de la rivière Moselle. Thèse d'Université, Université Henri Poincaré Nancy I, Nancy, France.
- Skraber, S., Gantzer, C., Helmi, K., Hoffmann, L., Cauchie, H. M.**, 2009. Simultaneous concentration of enteric viruses and protozoan parasites: a protocol based on tangential flow filtration and adapted to large volumes of surface and drinking waters. *Food and Environmental Virology* 1, 66-76.
- Slifko, T. R., Huffman, D. E., Dussert, B., Owens, J. H., Jakubowski, W., Haas, C. N., Rose, J. B.**, 2002. Comparison of tissue culture and animal models for assessment of *Cryptosporidium parvum* infection. *Experimental Parasitology* 101, 97-106.
- Smeets, P. W. M. H., van der Helm, A. W. C., Dullemont, Y. J., Rietveld, L. C., van Dijk, J. C., Medema, G. J.**, 2006. Inactivation of *Escherichia coli* by ozone under bench-scale plug flow and full-scale hydraulic conditions. *Water Research* 40, 3239-3248.
- Smith, H. V., Nichols, R. A. B.**, 2007. *Cryptosporidium*. (Chapter 9). In: Simjee, S. (Ed.), *Foodborne Diseases*. Humana Press, Totowa, NJ, USA, pp. 233-276.
- Smith, H. V., Nichols, R. A. B., Grimason, A. M.**, 2005. *Cryptosporidium* excystation and invasion: getting to the guts of the matter. *Trends in Parasitology* 21, 133-142.
- Smith, H. V., Patterson, W. J., Hardie, R., Greene, L. A., C., B., Tulloch, W., Gilmour, R. A., Girdwood, R. W. A., Sharp, J. C. M., Forbes, G. I.**, 1989. An outbreak of waterborne cryptosporidiosis caused by posttreatment contamination. *Epidemiology and Infection* 103, 703-715.
- Smith, J. J., Gunasekera, T. S., Barardi, C. R. M., Veal, D., Vesey, G.**, 2004. Determination of *Cryptosporidium parvum* oocyst viability by fluorescence in situ hybridization using a ribosomal RNA-directed probe. *Journal of Applied Microbiology* 96, 409-417.
- Snelling, W. J., McKenna, J. P., Lecky, D. M., Dooley, J. S. G.**, 2005. Survival of *Campylobacter jejuni* in waterborne protozoa. *Applied and Environmental Microbiology* 71, 5560-5571.
- Sobsey, M. D., Battigelli, D. A., Shin, G. A., Newland, S.**, 1998. RT-PCR amplification detects inactivated viruses in water and wastewater. *Water Science and Technology* 38, 91-94.
- Sobsey, M. D., Glass, J. S.**, 1984. Influence of water quality on enteric virus concentration by microporous filter methods. *Applied and Environmental Microbiology* 47, 956-960.
- Sobsey, M. D., Jones, B. L.**, 1979. Concentration of poliovirus from tap water using positively charged microporous filters. *Applied and Environmental Microbiology* 37, 588-595.
- Soule, H., Genoulaz, O., Gratacap-Cavallier, B., Chevallier, P., Liu, J. X., Seigneurin, J. M.**, 2000. Ultrafiltration and reverse transcription-polymerase chain reaction: An efficient process for poliovirus, rotavirus and hepatitis A virus detection in water. *Water Research* 34, 1063-1067.

- Spinner, M. L., Di Giovanni, G. D.,** 2001. Detection and identification of mammalian reoviruses in surface water by combined cell culture and reverse transcription-PCR. *Applied and Environmental Microbiology* 67, 3016-3020.
- Stanley, K., Cunningham, R., Jones, K.,** 1998. Isolation of *Campylobacter jejuni* from groundwater. *Journal of Applied Microbiology* 85, 187-191.
- Steele, T. W., McDermott, S.,** 1978. *Campylobacter* enteritis in South Australia. *Medical Journal of Australia* 2, 404-406.
- Stelzer, W., Mochmann, H., Richter, U., Dobberkau, H. J.,** 1989. A study of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* in a river system. *Zentralblatt für Hygiene und Umweltmedizin* 189, 20-28.
- Stinear, T., Matusan, A., Hines, K., Sandery, M.,** 1996. Detection of a single viable *Cryptosporidium parvum* oocyst in environmental water concentrates by reverse transcription-PCR. *Applied and Environmental Microbiology* 62, 3385-3390.
- Sundram, A., Donnelly, A., Ehlers, M. M., Vrey, A., Grabow, W., Bailey, I. W.,** 2002. Evaluation of F-RNA coliphages as indicators of viruses and the source of faecal pollution. *Water SA Special Edition* 86-91.
- Talibart, R., Denis, M., Castillo, A., Cappelier, J. M., Ermel, G.,** 2000. Survival and recovery of viable but noncultivable forms of *Campylobacter* in aqueous microcosm. *International Journal of Food Microbiology* 55, 263-267.
- Tani, N., Dohi, Y., Kurumatani, N., Yonemasu, K.,** 1995. Seasonal distribution of Adenoviruses, Enteroviruses and Reoviruses in urban river water. *Microbiology and Immunology* 39, 577-580.
- Tatchou-Nyamsi-König, J. A., Moreau, A., Fédérighi, M., Block, J. C.,** 2007. Behaviour of *Campylobacter jejuni* in experimentally contaminated bottled natural mineral water. *Journal of Applied Microbiology* 103, 280-288.
- Teunis, P. F. M., van den Brandhof, W., Nauta, M., Wagenaar, J., van den Kerkhof, H., van Pelt, W.,** 2005. A reconsideration of the campylobacter dose - Response relation. *Epidemiology and Infection* 133, 583-592.
- Tholozan, J. L., Cappelier, J. M., Tissier, J. P., Delattre, G., Federighi, M.,** 1999. Physiological characterization of viable-but-nonculturable *Campylobacter jejuni* cells. *Applied and Environmental Microbiology* 65, 1110-1116.
- Thomas, C., Hill, D. J., Mabey, M.,** 1999. Evaluation of the effect of temperature and nutrients on the survival of *Campylobacter* spp. in water microcosms. *Journal of Applied Microbiology* 86, 1024-1032.
- Thomas, C., Hill, D., Mabey, M.,** 2002. Culturability, injury and morphological dynamics of thermophilic *Campylobacter* spp. within a laboratory-based aquatic model system. *Journal of Applied Microbiology* 92, 433-442.

- Thulin, R.**, 1991. Contamination of tap water in Jongkoping in summer 1991. [In Swedish]. Rapport Jongkoping Community, Sweden.
- Thurston-Enriquez, J. A., Haas, C. N., Jacangelo, J., Gerba, C. P.**, 2003. Chlorine inactivation of adenovirus type 40 and feline calicivirus. *Applied and Environmental Microbiology* 69, 3979-3985.
- Thurston-Enriquez, J. A., Haas, C. N., Jacangelo, J., Gerba, C. P.**, 2005. Inactivation of enteric adenovirus and feline calicivirus by ozone. *Water Research* 39, 3650-3656.
- Tissier, A., Denis, M., Hartemann, P., Gassilloud, B.**, 2012. Development of a rapid and sensitive method combining a cellulose ester microfilter and a real-time qPCR assay to detect *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* in 20 liters of drinking water or low turbidity waters. *Applied and Environmental Microbiology* 78, 839-845.
- Touron, A., Berthe, T., Gargala, G., Fournier, M., Ratajczak, M., Servais, P., Petit, F.**, 2007. Assessment of faecal contamination and the relationship between pathogens and faecal bacterial indicators in an estuarine environment (Seine, France). *Marine Pollution Bulletin* 54, 1441-1450.
- Trachoo, N., Frank, J. F., Stern, N. J.**, 2002. Survival of *Campylobacter jejuni* in biofilms isolated from chicken houses. *Journal of Food Protection* 65, 1110-1116.
- Tsushima, Y., Karanis, P., Kamada, T., Nagasawa, H., Xuan, X., Igarashi, I., Fujisaki, K., Takahashi, E., Mikami, T.**, 2001. Detection of *Cryptosporidium parvum* oocysts in environmental water in Hokkaido, Japan. *Journal of Veterinary Medical Science* 63, 233-236.
- Turner, M., Istre, G. R., Beauchamp, H., Baum, M., Arnold, S.**, 1987. Community outbreak of adenovirus type 7a infections associated with a swimming pool. *Southern Medical Journal* 80, 712-715.
- Tyrrell, S. A., Rippey, S. R., Watkins, W. D.**, 1995. Inactivation of bacterial and viral indicators in secondary sewage effluents, using chlorine and ozone. *Water Research* 29, 2483-2490.
- Upton, S. J., Tilley, M., Brillhart, D. B.**, 1994. Comparative development of *Cryptosporidium parvum* (Apicomplexa) in 11 continuous host cell lines. *FEMS Microbiology Letters* 118, 233-236.
- Van den Kerkhof, H., van den Brandhof, W., Ruhaak, L.**, 2002. A field trip to the farm: school children sick from unpasteurised milk. [in Dutch]. *Infectieziekten-Bulletin* 13, 223-224.
- Van Heerden, J., Ehlers, M. M., Heim, A., Grabow, W. O. K.**, 2005. Prevalence, quantification and typing of adenoviruses detected in river and treated drinking water in South Africa. *Journal of Applied Microbiology* 99, 234-242.
- van Heerden, J., Ehlers, M. M., van Zyl, W. B., Grabow, W. O. K.**, 2004. Prevalence of human adenoviruses in raw and treated water. *Water Science and Technology* 50, 39-43.

- Vandamme, P., Dewhirst, F. E., Paster, B. J., On, S. L. W.,** 2005. Genus I. Campylobacteraceae Sebald and Veron 1963, 907,AL emend. Vandamme, Falsen, Rossau, Hoste, Segers, Tytgat and De Ley 1991a, 98, p. 1147-1160. In D. J. Brenner, N. R. Krieg, and J. T. Staley (ed.), *Bergey's manual of systematic bacteriology*, 2nd ed., vol. 2, part C. Springer, New York, NY.
- Vaughn, J. M., Chen, Y. S., Novotny, J. F., Strout, D.,** 1990. Effects of ozone treatment on the infectivity of hepatitis A virus. *Canadian Journal of Microbiology* 36, 557-560.
- Véron, M., Chatelain, R.,** 1973. Taxonomic Study of the Genus *Campylobacter* Sebald and Véron and Designation of the Neotype Strain for the Type Species, *Campylobacter fetus* (Smith and Taylor) Sebald and Véron. *International Journal Systematic Bacteriology* 23, 122-134.
- Vesey, G., Hutton, P., Champion, A., Ashbolt, N., Williams, K. L., Warton, A., Veal, D.,** 1994. Application of flow cytometric methods for the routine detection of *Cryptosporidium* and *Giardia* in water. *Cytometry* 16, 1-6.
- Vesey, G., Slade, J. S., Byrne, M., Shepherd, K., Fricker, C. R.,** 1993. A new method for the concentration of *Cryptosporidium* oocysts from water. *Journal of Applied Bacteriology* 75, 82-86.
- Vilaginès, P., Sarrette, B., Husson, G., Vilaginès, R.,** 1993. Glass wool for virus concentration at ambient water pH level. *Water Science and Technology* 27, 299-306.
- Vilagines, P., Sarrette, B., Le Guyader, M., Cun, C., Vilagines, R.,** 1997. Relationship between cultivable viruses, Fspecific RNA phages and the principal fecal bacterial indicators in raw waters, treated wastewaters and surface water. *European journal of water quality* 28, 201-222.
- Vinje, J., Koopmans, M. P. G.,** 2000. Simultaneous detection and genotyping of 'Norwalk-like viruses' by oligonucleotide array in a reverse line blot hybridization format. *Journal of Clinical Microbiology* 38, 2595-2601.
- Virto, R., Manas, P., Alvarez, I., Condon, S., Raso, J.,** 2005. Membrane damage and microbial inactivation by chlorine in the absence and presence of a chlorine-demanding substrate. *Applied and Environmental Microbiology* 71, 5022-5028.
- Vogt, R. L., Sours, H. E., Barrett, T.,** 1982. Campylobacter enteritis associated with contaminated water. *Annals of Internal Medicine* 96, 292-296.
- Waage, A. S., Vardund, T., Lund, V., Kapperud, G.,** 1999. Detection of small numbers of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* cells in environmental water, sewage, and food samples by a seminested PCR assay. *Applied and Environmental Microbiology* 65, 1636-1643.
- Wait, D. A., Sobsey, M. D.,** 2001. Comparative survival of enteric viruses and bacteria in Atlantic Ocean seawater. *Water Science and Technology* 43, 139-142.

- Walters, S. P., Gannon, V. P. J., Field, K. G.,** 2007. Detection of Bacteroidales fecal indicators and the zoonotic pathogens *E. coli* 0157:H7, *Salmonella*, and *Campylobacter* in river water. *Environmental Science and Technology* 41, 1856-1862.
- Ward, R. L., Bernstein, D. I., Young, E. C.,** 1986. Human rotavirus studies in volunteers: Determination of infectious dose and serological response to infection. *Journal of Infectious Diseases* 154, 871-880.
- Ward, R. L., Knowlton, D. R., Pierce, M. J.,** 1984. Efficiency of human rotavirus propagation in cell culture. *Journal of Clinical Microbiology* 19, 748-753.
- Ware, M. W., Wymer, L., Lindquist, H. D. A., Schaefer, F. W.,** 2003. Evaluation of an alternative IMS dissociation procedure for use with Method 1622: detection of *Cryptosporidium* in water. *Journal of Microbiological Methods* 55, 575-583.
- Wassenaar, T. M., Newell, D. G.,** 2000. Genotyping of *Campylobacter* spp. *Applied and Environmental Microbiology* 66, 1-9.
- Watt, P. M., Johnson, D. C., Gerba, C. P.,** 2002. Improved method for concentration of *Giardia*, *Cryptosporidium*, and poliovirus from water. *Journal of Environmental Science and Health - Part A Toxic/Hazardous Substances and Environmental Engineering* 37, 321-330.
- Wegmüller, B., Luthy, J., Candrian, U.,** 1993. Direct PCR detection of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* in raw milk and dairy products. *Applied and Environmental Microbiology* 59, 2161-2165.
- Weichert, D., Oliver, J. D., Kjelleberg, S.,** 1992. Low temperature induced non-culturability and killing of *Vibrio vulnificus*. *FEMS Microbiol Reviews* 100, 205-210.
- Weir, E.,** 2001. The cryptic nature of cryptosporidiosis. *CMAJ* 164, 1743.
- Westrell, T., Teunis, P., van den Berg, H., Lodder, W., Ketelaars, H., Stenstrom, T. A., de Roda Husman, A. M.,** 2006. Short- and long-term variations of norovirus concentrations in the Meuse river during a 2-year study period. *Water Research* 40, 2613-2620.
- WHO, 2004.** *Water Treatment and Pathogen Control: Process Efficiency in Achieving Safe Drinking Water*. Edited by Mark W LeChevallier and Kwok-Keung Au. ISBN: 1 84339 069 8. Published by IWA Publishing, London, UK.
- WHO, 2006.** *Guidelines for Drinking-water Quality-Incorporating First Addendum to Third Edition - Volume 1: Recommendations*
- WHO, 2011.** *Weekly epidemiological record. Relevé épidémiologique hebdomadaire*. 29 APRIL 2011, 86th year / 29 AVRIL 2011, 86e année, No. 18, 2011, 86, 173-176.

- Widmer, G., Orbacz, E. A., Tzipori, S.,** 1999.  $\beta$ -Tubulin mRNA as a marker of *Cryptosporidium parvum* oocyst viability. Applied and Environmental Microbiology 65, 1584-1588.
- Willcocks, M. M., Brown, T. D. K., Madeley, C. R., Carter, M. J.,** 1994. The complete sequence of a human astrovirus. Journal of General Virology 75, 1785-1788.
- Williams, T. P. E., Kasorndorkbua, C., Halbur, P. G., Haqshenas, G., Guenette, D. K., Toth, T. E., Meng, X. J.,** 2001. Evidence of extrahepatic sites of replication of the hepatitis E virus in a swine model. Journal of Clinical Microbiology 39, 3040-3046.
- Wilson, I. G.,** 1997. Minireview: Inhibition and facilitation of nucleic acid amplification. Applied Environmental Microbiology 63, 3741-3751.
- Winters, D. K., Slavik, M. F.,** 2000. Multiplex PCR detection of *Campylobacter jejuni* and *Arcobacter butzleri* in food product. Molecular and Cellular Probes 14, 95- 99.
- 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. Applied and Environmental Microbiology 70, 2318-2322.
- Wolfe, R. L., Ward, N. R., Olson, B. H.,** 1984. Inorganic chloramines as drinking water disinfectants: a review. American Water Works Association Journal 86, 74-88.
- Worm, H. C., Van der Poel, W. H. M., Brandstätter, G.,** 2002. Hepatitis E: An overview. Microbes and Infection 4, 657-666.
- Xiao, L., Bern, C., Limor, J., Sulaiman, I., Roberts, J., Checkley, W., Cabrera, L., Gilman, R. H., Lal, A. A.,** 2001. Identification of 5 types of *Cryptosporidium* parasites in children in Lima, Peru. Journal of Infectious Diseases 183, 492-497.
- Xiao, L., Cama, V.,** 2006. *Cryptosporidium* and cryptosporidiosis. In: Ortega, Y.R., Doyle, M.P. (Eds.), Foodborne Parasites. Springer-Verlag New York, LLC, pp. 57-108.
- Xiao, L., Morgan, U. M., Fayer, R., Thompson, R. C. A., Lal, A. A.,** 2000. *Cryptosporidium* systematics and implications for public health. Parasitology Today 16, 287-292.
- Xu, P., Widmer, G., Wang, Y., Ozaki, L. S., Alves, J. M., Serrano, M. G., Puiu, D., Manque, P., Akiyoshi, D., Mackey, A. J., Pearson, W. R., Dear, P. H., Bankier, A. T., Peterson, D. L., Abrahamsen, M. S., Kapur, V., Tzipori, S., Buck, G. A.,** 2004. The genome of *Cryptosporidium hominis*. Nature 431, 1107-1112.
- Yang, C., Jiang, Y., Huang, K., Zhu, C., Yin, Y.,** 2003. Application of real-time PCR for quantitative detection of *Campylobacter jejuni* in poultry, milk and environmental water. FEMS Immunology and Medical Microbiology 38, 265-271.

- Yang, W., Gu, A. Z., Zeng, S., Li, D., He, M., Shi, H.,** 2011. Development of a combined immunomagnetic separation and quantitative reverse transcription-PCR assay for sensitive detection of infectious rotavirus in water samples. *Journal of Microbiological Methods* 84, 447-453.
- Yates, M. V., Gerba, C. P., Kelley, L. M.,** 1985. Virus persistence in groundwater. *Applied and Environmental Microbiology* 49, 778-781.
- Yates, M. V., Stetzenbach, L. D., Gerba, C. P., Sinclair, N. A.,** 1989. The effect of indigenous bacteria on virus survival in ground water. *Journal of Environmental Science and Engineering* 25, 81-100.
- Young, C. R., Harvey, R. B., Anderson, R. C., Nisbet, D., Stanker, L. H.,** 2000. Enteric colonisation following natural exposure to *Campylobacter* in pigs. *Research in Veterinary Science* 68, 75-78.
- Young, D. C., Sharp, D. G.,** 1985. Virion conformational forms and the complex inactivation kinetics of echovirus by chlorine in water. *Applied and Environmental Microbiology* 49, 359-364.
- Yu, J. R., Choi, S. D., Kim, Y. W.,** 2000. In vitro infection of *Cryptosporidium parvum* to four different cell lines. *Korean Journal of Parasitology* 38, 59-64.
- Zhang, X. J., Chen, C., Wang, Y.,** 2007. Synergetic Inactivation of microorganisms in drinking water by short-term free chlorination and subsequent monochloramination. *Biomedical and Environmental Sciences* 20, 373-380.
- Zhang, C., Wang, X., Liu, Y., Peng, D.,** 2010. Simultaneous detection of enteroviruses from surface waters by real-time RT-PCR with universal primers. *Journal of Environmental Sciences* 22, 1261-1266.
- Zhao, T., Doyle, M. P., Zhao, P., Blake, P., Wu, F. M.,** 2001. Chlorine Inactivation of *Escherichia coli* O157:H7 in Water. *Journal of Food Protection* 64, 1607-1609.
- Zhou, H., Smith, D. W.,** 1994. Kinetics of ozone disinfection in completely mixed system. *Journal of Environmental Engineering* 120, 841-858.
- Zimmerman, R., Iturriaga, R., Becker-Birck, J.,** 1978. Simultaneous determination of the total number of aquatic bacteria and the number thereof involved in respiration. *Applied and Environmental Microbiology* 36, 926-939.
- 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. *Journal of Applied Microbiology* 86, 955-961.



## PUBLICATIONS ET COMMUNICATIONS

### Publications

- **Tissier, A., Denis, M., Hartemann, P., Gassilloud, B., 2012.** Development of a rapid and sensitive method combining a cellulose ester microfilter and a real-time qPCR assay to detect *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* in 20 liters of drinking water or low turbidity waters. *Applied and Environmental Microbiology* 78, 839-845.
- Deux autres publications sont en cours de rédaction
  - **Tissier, A., Hartemann, P., Gassilloud, B.**  
Occurrence of *Campylobacter* in surface water, well water and drinking water.  
Publication à soumettre dans le journal *Water Research*
  - **Tissier, A., Hartemann, P., Gassilloud, B.**  
Discrimination of viable and dead *Cryptosporidium* oocysts using an EMA-qPCR method.  
Publication à soumettre dans le journal *Water Science and Technologie*

### Communications orales

- Tissier A., Hartemann P., Gassilloud B.  
Evaluation of the viability or infectious state of human pathogenic agents (virus: *Adenovirus*; bacterium: *Campylobacter* and parasite: *Cryptosporidium*) detected in samples of waters intended for food.  
First workshop of European PhD students, Water and Health, Cannes (France), 2009.
- Tissier A., Hartemann P., Gassilloud B.  
Occurrence de *Campylobacter jejuni* et *Campylobacter coli* dans l'eau de la Moselle et différentes nappes alluviales employées pour la production d'eau d'alimentation.  
Journée *Campylobacter*: Actualité de *Campylobacter* de la fourche à la fourchette, Ploufragan (France), 2011.

### Communications affichées

- Tissier A., Denis M., Hartemann P., Gassilloud B.  
Mise au point d'un protocole de détection des *Campylobacter* présents dans des échantillons d'eaux de 1 à 20L destinées à des fins alimentaires.  
Congrès de la Société Française de Microbiologie, Marseille (France), 2010.
- Tissier A., Hartemann P., Bertrand I., Gassilloud B.  
Mise au point d'une méthode de mise en évidence de la viabilité de *Cryptosporidium*  
Congrès de la Société Française de Microbiologie, Marseille (France), 2010.

- Tissier A, Hartemann P, Bertrand I, et Gassilloud B.  
Discrimination of viable and dead *Cryptosporidium* oocysts using an EMA-qPCR method.  
16<sup>th</sup> international symposium on health-related water microbiology, IWA, Rotura (Nouvelle-Zélande), 2011.