



HAL
open science

Transport d'un micro-organisme en milieu poreux saturé : cas d'un colloïde biologique

Xavier Marly

► **To cite this version:**

Xavier Marly. Transport d'un micro-organisme en milieu poreux saturé : cas d'un colloïde biologique : cryptosporidium parvum. Sciences de l'ingénieur [physics]. INPL - Institut National Polytechnique de Lorraine, 2001. Français. NNT : 2001INPL589N . tel-02007514

HAL Id: tel-02007514

<https://hal.univ-lorraine.fr/tel-02007514>

Submitted on 5 Feb 2019

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

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



AVERTISSEMENT

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

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

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

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

LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10

http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php

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

[G] 2001 MARLY, X.

INSTITUT NATIONAL POLYTECHNIQUE DE LORRAINE
École Nationale Supérieure de Géologie de Nancy
Laboratoire Environnement, Géomécanique & Ouvrages

École Doctorale RP2E

THÈSE

Présentée en vue de l'obtention du grade de :

DOCTEUR DE L'I.N.P.L.

Spécialité :

Génie civil – Hydrosystèmes – Géotechnique

Par :

Xavier Marly

Service Commun de la Documentation
INPL
Nancy-Brabois

TRANSPORT D'UN MICRO-ORGANISME EN MILIEU POREUX SATURÉ – CAS D'UN COLLOÏDE BIOLOGIQUE : *CRYPTOSPORIDIUM PARVUM*

Soutenue le 21 décembre 2001 devant la Commission d'Examen

Membres du jury :

HARF-MONTEIL Colette
MUDRY Jacques
ZILLIOX Lothaire

Rapporteur
Rapporteur
Rapporteur

GARNIER Patricia
WEINGERTNER Patrick

Examineur
Examineur

BUÈS Michel
CHEVALIER-OUARDA Sylvie
SCHWARTZBROD Janine

Directeur de thèse
Co-directeur de thèse
Co-directeur de thèse

QUALITÉ ET SPÉCIALITÉ DES MEMBRES DU JURY DE THÈSE

- Mme HARF-MONTEIL Colette**
Rapporteur
Maître de Conférences ULP
Institut de bactériologie – LTAB UPERS EA 1318
3 rue Koeberlé, 67000 STRASBOURG
(Spécialité : Parasitologie)
- M. MUDRY Jacques**
Rapporteur
Professeur des Universités
UFR Sciences et Techniques – Département de Géosciences
Route du Gray-La Bouloie, 25030 BESANÇON Cedex
(Spécialité : Hydrogéologie)
- M. ZILLIOX Lothaire**
Rapporteur
Directeur de Recherche CNRS
IFARE – Campus du CNRS
23 rue du Loess, 67037 STRASBOURG Cedex
(Spécialité : Mécanique des pollutions)
- Mme GARNIER Patricia**
Examineur
Chargée de Recherche INRA
INRA – Agronomie
Rue Fernand-Christ, 02007 LAON Cedex
(Spécialité : Sciences du sol)
- M. WEINGERTNER Patrick**
Examineur
Ingénieur de l'Agence de l'Eau Rhin-Meuse
Rozérieulles, B.P. 30019, 57161 MOULINS-Lès-METZ
(Spécialité : Eau – Milieu naturel)
- M. BUÈS Michel A.**
Directeur de thèse
Professeur INPL
LAEGO – ENSG
Rue du Doyen Marcel Roubault, Bât. E, B.P. 40,
54501 VANDOEUVRE-Lès-NANCY Cedex
(Spécialité : Mécanique des fluides)
- Mme CHEVALIER-OUARDA Sylvie**
Co-Directeur de thèse
Maître de Conférences INPL
LAEGO – ENSG
Rue du Doyen Marcel Roubault, Bât. E, B.P.40,
54501 VANDOEUVRE-Lès-NANCY Cedex
(Spécialité : Mécanique des fluides)
- Mme SCHWARTZBROD Janine**
Co-Directeur de thèse
Professeur des Universités
Faculté de Pharmacie
Laboratoire de Bactériologie-Parasitologie
5 rue Albert Lebrun, B.P.403, 54001 NANCY Cedex
(Spécialité : Parasitologie)

AVANT-PROPOS

Ce mémoire contient des encadrés dans lesquels sont : (i) détaillées des informations jugées classiques ou (ii) présentées des informations complémentaires. Cette présentation a été choisie afin d'augmenter la convivialité de ce mémoire quelle que soit la sensibilité du lecteur. Des renvois lient les encadrés au texte. Dans un même objectif, un glossaire, ainsi que la liste des symboles utilisés, se trouvent à la fin de ce mémoire. Les mots définis dans le glossaire sont indiqués dans le texte par le symbole : [Ⓜ].

REMERCIEMENTS

Ma reconnaissance s'adresse particulièrement à mon directeur de thèse, Monsieur Michel BUÈS, Professeur à l'INPL, pour la confiance qu'il m'a accordé tout au long de ce travail et sa disponibilité sans faille. Je remercie également mes co-directeurs de thèse, Madame Janine SCHWARTZBROD, Professeur des Universités à la Faculté de Pharmacie de Nancy, pour ses conseils précieux en parasitologie et Madame Sylvie CHEVALIER-OUARDA, Maître de Conférences à l'INPL, pour son aide et son soutien indéfectible.

J'adresse mes plus vifs remerciements à Madame Colette HARF-MONTEIL, Maître de Conférences à l'ULP, à Monsieur Jacques MUDRY, Professeur des Universités à l'UFR Sciences et Techniques de Besançon et à Monsieur Lothaire ZILLIOX, Directeur de Recherche CNRS et Directeur de IFARE, qui ont accepté d'être les rapporteurs de ce travail de thèse.

Mes remerciements vont également à Madame Patricia GARNIER, Chargée de Recherche à l'INRA, et à Monsieur Patrick WEINGERTNER, Ingénieur de l'Agence de l'Eau Rhin-Meuse, qui m'honorent de leur présence en tant que membre du jury.

Je tiens à vivement remercier pour son indispensable aide Monsieur Thierry CHESNOT.

À tous ceux qui m'ont soutenu, mes amis et ma famille, j'adresse toute ma gratitude.

Ce travail a été financé en partie par le Ministère de l'Aménagement du Territoire et de l'Environnement (Programme « Environnement et Santé »).

Enfin, au moment de l'achèvement de ce travail, j'ai une pensée pour ces millions d'oocystes tombés pour la recherche...

RÉSUMÉ

TRANSPORT D'UN MICRO-ORGANISME EN MILIEU POREUX SATURÉ – CAS D'UN COLLOÏDE BIOLOGIQUE : *CRYPTOSPORIDIUM PARVUM*

L'objectif de notre travail est d'étudier le transport d'un micro-organisme pathogène, *Cryptosporidium parvum*, en milieu poreux saturé à l'aide d'essais en laboratoire. Ce travail se positionne dans une thématique de protection efficace des ressources en eau vis-à-vis de la contamination par des oocystes de *C. parvum*. En effet, ce parasite, qui infecte les mammifères, présente une résistance élevée à la plupart des désinfectants classiquement utilisés dans le traitement de l'eau. Il est rencontré dans les eaux souterraines et responsable de plusieurs épidémies d'origine hydrique. Tout d'abord, nous avons dû développer une technique de titrage adaptée à nos besoins, notamment en terme de précision. Ensuite, nous avons réalisé un premier type d'expérimentations en milieu saturé et sans écoulement, des essais batch, qui ne nous ont pas permis de mettre en évidence de phénomène d'adsorption sur tous les substrats testés (silice, calcaire, feldspaths, argiles ou alumine). Puis, nous avons mené un second type d'expérimentations, en milieu saturé et avec écoulement, des essais en colonne. Afin de travailler avec de faibles volumes de solution dopée en micro-organismes et, donc, de limiter les risques de contaminations, nous avons développé un essai en colonne à circulation fermée : le flux massique sortant de la colonne est injecté en entrée de colonne. Pour interpréter les résultats de cet essai, nous avons créé un modèle numérique en considérant *C. parvum* comme un colloïde biologique. Les résultats ont montré que le débit volumique et la granulométrie modifient la rétention, mais d'autres paramètres, probablement d'origines biologiques, semblent également avoir une influence.

Mots clés : *Cryptosporidium parvum* ; Colloïde biologique ; Immunofluorescence ; Essai en colonne à circulation fermée ; Filtration ; Adsorption ; Marche au hasard ; Simulation numérique.

ABSTRACT

TRANSPORT OF A MICROORGANISM THROUGH A POROUS MEDIUM – CASE OF A BIOLOGICAL COLLOID: *CRYPTOSPORIDIUM PARVUM*

The objective of our work is to study the transport of a pathogenic microorganism, *Cryptosporidium parvum*, in saturated porous medium with laboratory experiments. This work is situated in a thematic of effective protection of water resources for the contamination by *C. parvum* oocysts. Indeed, an important resistance to the majority of disinfectants classically used in water treatments characterized this parasite, which infects the mammals. It is present in the groundwater and responsible of many waterborne outbreaks. First of all, we had to develop a technique of titration adapted to our needs, in particular in term of precision. Next, we carried out a first type of experiments in saturated medium and without flow, batch assays, which did not enable us to highlight a phenomenon of adsorption with all the substrates tested (silica, calcite, feldspar, clay, or alumina). Then, we performed a second type of experiments, in saturated medium and with flow, column assays. In order to use low volumes of solution and, therefore to allow small amounts of *C. parvum* oocysts to be manipulated, providing as much protection as possible from the risks of contamination, we developed a continuously recirculating column assay: the mass outflow of the column is injected in input of column. To interpret the results of these assays, we created a numerical model considering the *C. parvum* oocysts as biological colloids. The results showed that the flow rate and granulometry modify the retention, but other parameters, probably biological, also seem to have an influence.

Keywords: *Cryptosporidium parvum*; biological colloid; Immunofluorescence assay; Continuously recirculating column; Filtration; Adsorption; Random walk; Numerical simulation.

SOMMAIRE

TABLE DES MATIÈRES

INTRODUCTION GÉNÉRALE	1
CHAPITRE 0	
<i>CRYPTOSPORIDIUM PARVUM</i> : UN PROBLÈME DE SANTÉ PUBLIQUE	7
0~1 - INTRODUCTION.....	8
0~2 - <i>CRYPTOSPORIDIUM PARVUM</i> : HISTORIQUE.....	8
0~3 - <i>CRYPTOSPORIDIUM PARVUM</i> : UN PARASITE	8
0~3.1 - Taxinomie	9
0~3.2 - Cycle de développement.....	10
0~3.3 - Structure et dimension des oocystes	12
0~3.4 - Tableau clinique.....	13
a) Chez le sujet immunocompétent	13
b) Chez le sujet immunodéprimé.....	13
0~3.5 - Traitement et prophylaxie.....	13
0~4 - <i>CRYPTOSPORIDIUM PARVUM</i> : LES TROIS FACTEURS FAVORISANT SA TRANSMISSION	14
0~4.1 - Dose minimale infectante	14
0~4.2 - Résistance des oocystes de <i>Cryptosporidium parvum</i>	14
a) Effet des désinfectants classiques	14
b) Effet d'autres désinfectants gazeux	15
c) Effet de la température	16
0~4.3 - Cinétique d'excrétion et présence dans l'environnement	16
a) Contamination des eaux naturelles	17
b) Contamination des animaux domestiques	18
0~5 - <i>CRYPTOSPORIDIUM PARVUM</i> : ÉPIDÉMIOLOGIE.....	19
0~6 - DE LA PROTECTION DES RESSOURCES EN EAU AUX ESSAIS EN LABORATOIRE.....	22
0~7 - CONCLUSION.....	26
CHAPITRE 1	
TECHNIQUES DE PURIFICATION ET DE TITRAGE : CHOIX ET DÉVELOPPEMENT DE PROTOCOLES ADAPTÉS	27
1~1 - INTRODUCTION.....	28
1~2 - TECHNIQUE DE PURIFICATION DES FÈCES	28
1~2.1 - Obtention des fèces.....	28
1~2.2 - Protocole de « gradient / flottation » utilisé.....	28
1~3 - DÉVELOPPEMENT DE LA TECHNIQUE DE TITRAGE DES SUSPENSIONS.....	30
1~3.1 - Choix de la technique de titrage	30
1~3.2 - Description du protocole d'immunofluorescence modifié	31
a) Choix du matériel	31

b) Marquage fluorescent.....	33
c) Filtration et montage de la lame.....	33
d) Comptage au microscope.....	34
1~3.3 - Évaluation du protocole d'immunofluorescence modifié.....	35
a) Reproductibilité des dénombrements.....	35
b) Robustesse.....	37
c) Rendement.....	38
d) « Extension » du domaine d'application.....	38
1~4 - CONCLUSION.....	40
CHAPITRE 2	
ESSAIS BATCH : ÉTUDE DE L'ADSORPTION.....	41
2~1 - INTRODUCTION.....	42
2~2 - MÉCANISMES DE L'ADSORPTION DES OOCYSTES.....	42
2~2.1 - Échelle métrique : analyse mécaniste.....	43
2~2.2 - Échelle millimétrique : analyse physico-chimique.....	44
2~2.3 - Échelle micrométrique : analyse microbiologique.....	45
2~2.4 - Échelle nanométrique : analyse thermodynamique.....	47
2~3 - SUBSTRATS UTILISÉS.....	48
2~3.1 - Composition.....	48
2~3.2 - Description minéralogique.....	48
a) Argiles.....	48
b) Autres minéraux des substrats utilisés.....	51
2~3.3 - Granulométrie des sables.....	52
2~4 - DÉVELOPPEMENT DU PROTOCOLE EXPÉRIMENTAL.....	53
2~4.1 - Choix du protocole.....	54
a) Choix de la concentration de la suspension en oocystes.....	54
b) Choix du volume de suspension et de la masse de matrice solide introduits dans les tubes.....	54
c) Choix du volume des prélèvements.....	55
d) Choix de la vitesse de rotation.....	56
2~4.2 - Mise en œuvre du protocole.....	56
2~4.3 - Détermination de la variation de la concentration en oocystes significative.....	56
2~5 - RÉSULTATS ET INTERPRÉTATIONS DES ESSAIS.....	57
2~5.1 - Essais batch avec les trois types de sables.....	57
a) Sable siliceux traité.....	58
b) Sable siliceux naturel.....	58
c) Sable calcaire naturel.....	59
2~5.2 - Interprétation des essais batch avec les trois types de sables.....	59
a) Physico-chimie des eaux avec la silice.....	60
b) Physico-chimie des eaux avec la calcite.....	61
c) Conséquences de la physico-chimie.....	61
2~5.3 - Autres essais batch.....	62
a) Ajout de Ca^{2+}	62
b) Essai avec de la bauxite.....	62
c) Essai avec de l'illite.....	63
d) Essai avec de la montmorillonite.....	64
2~6 - CONCLUSION.....	65

CHAPITRE 3

ESSAI EN COLONNE À CIRCULATION FERMÉE : DÉVELOPPEMENT NOVATEUR ET SIMULATIONS	68
3~1 - INTRODUCTION.....	69
3~2 - CONSÉQUENCES D'UNE CIRCULATION FERMÉE.....	69
3~2.1 - Choix d'une zone de prélèvements	70
3~2.2 - Nécessité d'un modèle numérique.....	70
3~3 - MODÈLE NUMÉRIQUE DE L'ESSAI EN COLONNE À CIRCULATION FERMÉE.....	71
3~3.1 - Modélisation du déplacement dans la colonne seule : technique de marche au hasard.....	71
3~3.2 - Modélisation des termes « puits/source » dans la colonne seule.....	75
a) <i>Sédimentation</i>	75
b) <i>Dégradation</i>	76
c) <i>Filtration</i>	76
3~3.3 - Modélisation de la colonne seule : bilan du déplacement et de la rétention.....	78
3~3.4 - Modélisation du réservoir : mélangeur idéal	80
3~3.5 - Modélisation de la colonne à circulation fermée : sommation des réponses à des Dirac élémentaires	83
3~3.6 - Algorithme et programmation	83
3~4 - ESTIMATION DES PARAMÈTRES HYDRODYNAMIQUES	85
3~4.1 - Paramètres hydrodynamiques influents	85
3~4.2 - Technique d'ajustement du débit volumique et de la porosité cinématique.....	87
3~5 - VALIDATION DU MODÈLE NUMÉRIQUE.....	88
3~5.1 - Colonne seule : solution théorique.....	88
3~5.2 - Réservoir seul : solution théorique et traçage expérimental au chlorure de sodium	90
3~5.3 - Colonne à circulation fermée : traçage au chlorure de sodium.....	93
3~6 - CONCLUSION.....	94

CHAPITRE 4

ESSAIS EN COLONNE À CIRCULATION FERMÉE : ÉTUDE DE LA FILTRATION.....	96
4~1 - INTRODUCTION.....	97
4~2 - DÉVELOPPEMENT DU PROTOCOLE EXPÉRIMENTAL	97
4~2.1 - Choix du protocole.....	97
a) <i>Choix du volume du réservoir</i>	98
b) <i>Choix du volume des prélèvements</i>	98
c) <i>Choix des tuyaux du circuit</i>	98
d) <i>Choix de la concentration de la suspension en oocystes</i>	99
4~2.2 - Mise en œuvre du protocole.....	99
a) <i>Montage du dispositif</i>	99
b) <i>Traçage au NaCl</i>	100
c) <i>Essai avec oocystes</i>	101
4~2.3 - Détermination de la rétention significative.....	101
4~3 - RÉSULTATS ET INTERPRÉTATIONS DES ESSAIS	103
4~3.1 - Première série d'essais.....	103
a) <i>Essai à faible débit</i>	103
b) <i>Essai à fort débit</i>	105
c) <i>Essai à fort débit et granulométrie « homogène »</i>	106
d) <i>Interprétations des résultats de la première série d'essais</i>	107

4~3.2 - Deuxième série d'essais.....	108
a) Essais avec des oocystes âgés de plus de 4 mois.....	108
b) Essais avec des oocystes âgés de plus de 4 mois issus d'une autre suspension stock...	110
c) Interprétations des résultats de la deuxième série d'essais.....	111
4~3.3 - Troisième série d'essais.....	112
a) Essais avec des oocystes stockés plus de 4 mois issus d'un autre lot d'oocystes.....	112
b) Interprétations des résultats de la troisième série d'essais.....	114
4~4 - CONCLUSION.....	116
CONCLUSIONS GÉNÉRALES ET PERSPECTIVES	118
GLOSSAIRE.....	122
LISTE DES SYMBOLES	130
RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	134
PRODUCTION SCIENTIFIQUE	144

TABLE DES ILLUSTRATIONS

INTRODUCTION

Figure 1 : Périmètres de protection autour du captage d'une source.....	3
---	---

CHAPITRE 0

Figure 0~1 : Taxinomie simplifiée de <i>Cryptosporidium</i> (d'après LEVINE, 1984).....	9
Figure 0~2 : Cycle de développement de <i>Cryptosporidium parvum</i> (d'après BADENOCH, 1990)	11
Figure 0~3 : Oocystes de <i>Cryptosporidium parvum</i> observés au microscope électronique à balayage (M.E.B.) (d'après KARAMAN <i>et al.</i> , 1999).....	12
Tableau 0~I : Espèces de <i>Cryptosporidium</i> (d'après FAYER <i>et al.</i> , 2000).....	9
Tableau 0~II : Génotypes de <i>Cryptosporidium parvum</i> (d'après FAYER <i>et al.</i> , 2000).....	10
Tableau 0~III : Concentration et temps d'exposition pour 90 % d'inactivation de <i>Cryptosporidium parvum</i> par différents agents désinfectants (d'après ROT - DE HEAULME, 1988 et KORICH <i>et al.</i> , 1990).....	15
Tableau 0~IV : Influence de certains gaz désinfectants sur la viabilité de <i>Cryptosporidium parvum</i> (d'après FAYER <i>et al.</i> , 1996).....	15
Tableau 0~V : Influence des basses températures sur la viabilité de <i>Cryptosporidium parvum</i> (d'après FAYER & NERAD, 1996)	16
Tableau 0~VI : Études sur la contamination des eaux naturelles par <i>Cryptosporidium</i>	17
Tableau 0~VII : Contamination des eaux souterraines par <i>Cryptosporidium parvum</i> (d'après HANCOCK <i>et al.</i> , 1998).....	18

Tableau 0~VIII : Cas d'infection de bovins par <i>Cryptosporidium parvum</i> par région (d'après LEFAY <i>et al.</i> 2000)	19
Tableau 0~IX : Cas d'infection de bovins par <i>Cryptosporidium parvum</i> par département (d'après LEFAY <i>et al.</i> 2000)	19
Tableau 0~X : Principales épidémies de cryptosporidiose liées à la consommation d'eau potable issues d'eaux souterraines.....	20
Tableau 0~XI : Principales épidémies de cryptosporidiose liées à la consommation d'eau potable issues d'eaux de surface.....	21

CHAPITRE 1

Figure 1~1 : Technique de purification par gradient/flottation (d'après WEBER <i>et al.</i> , 1992)	29
Figure 1~2 : Photo du matériel de l'unité de filtration sous-vide	32
Figure 1~3 : Aspect des membranes de filtration en M.E.B.....	32
Figure 1~4 : Marquage fluorescent (liaison anticorps – oocystes)	33
Figure 1~5 : Schéma de la filtration sous-vide	34
Figure 1~6 : Oocystes marqués par immunofluorescence	35
Figure 1~7 : Coefficient de variation et divergence par rapport à la moyenne des 5 groupes de dénombrements en fonction de la concentration moyenne.....	36
Figure 1~8 : Comparaison entre la concentration moyenne des groupes de 5 dénombrements obtenus par les deux opérateurs.....	37
Figure 1~9 : Concentration de la suspension stock initiale et coefficient de variation en fonction de la concentration moyenne des suspensions diluées et du facteur de dilution	40
Tableau 1~I : Avantages et inconvénients des trois techniques de titrages de <i>Cryptosporidium parvum</i> (d'après VESEY <i>et al.</i> , 1991 ; VESEY <i>et al.</i> , 1993 ; JOHNSON <i>et al.</i> ,1995).....	31
Tableau 1~II : Importance du temps d'incubation à 37,0 °C.....	33
Tableau 1~III : Résultats des dénombrements des 12 échantillons EasySeed.....	38

CHAPITRE 2

Figure 2~1 : Diagramme d'un tétraèdre et d'une couche tétraédrique	49
Figure 2~2 : Diagramme d'un octaèdre et d'une couche octaédrique	49
Figure 2~3 : Représentation schématique de la structure de la kaolinite.....	50
Figure 2~4 : Représentation schématique de la structure de l'illite.....	50
Figure 2~5 : Représentation schématique de la structure de la montmorillonite.....	51
Figure 2~6 : Courbe granulométrique type des sables utilisés	53
Figure 2~7 : Essai batch - Schéma de l'expérience	54
Figure 2~8 : Résultats de l'essai batch avec le sable siliceux traité	58
Figure 2~9 : Résultats de l'essai batch avec le sable siliceux naturel.....	59
Figure 2~10 : Résultats de l'essai batch avec le sable calcaire naturel.....	59
Figure 2~11 : Schéma de prédominance des formes de la silice et de la calcite en fonction du pH	61
Figure 2~12 : Résultats de l'essai batch avec de la bauxite.....	63
Figure 2~13 : Résultats de l'essai batch avec de l'illite.....	64
Figure 2~14 : Résultats de l'essai batch avec de la montmorillonite.....	65

Tableau 2~I : Composition des sables d'étude	48
Tableau 2~II : Récapitulation des caractéristiques des principaux minéraux argileux.....	50
Tableau 2~III : Échantillonnage - Importance du volume de prélèvement	55

CHAPITRE 3

Figure 3~1 : Schéma du dispositif de l'essai en colonne à circulation fermée.....	69
Figure 3~2 : Schéma explicatif du phénomène stochastique considéré (d'après KINZELBACH, 1986).....	73
Figure 3~3 : Évolution de la concentration réduite dans le réservoir - Influence du coefficient de filtration colloïdale sur les résultats des simulations numériques.....	79
Figure 3~4 : Représentation de la fonction « créneau » $V_R(t)$	81
Figure 3~5 : Détail de l'algorithme - Calcul de la concentration de sortie de réservoir.....	82
Figure 3~6 : Schéma explicatif - Sommation des réponses à des Dirac élémentaires dans le cas d'une injection variable à chaque pas de temps élémentaire.....	83
Figure 3~7 : Algorithme sommaire du programme de l'essai en colonne à circulation fermée.....	84
Figure 3~8 : Évolution de la concentration réduite dans le réservoir et en sortie de colonne - Influence du coefficient de dispersivité longitudinale sur les résultats des simulations numériques	86
Figure 3~9 : Évolution de la concentration réduite en sortie de colonne - Influence du débit volumique et de la porosité cinématique sur les simulations numériques.....	87
Figure 3~10 : Schéma du dispositif de l'essai en colonne ouverte.....	89
Figure 3~11 : Comparaison entre les courbes obtenues en sortie de colonne ouverte avec la méthode de résolution par marche au hasard et la solution analytique	89
Figure 3~12 : Comparaison entre les courbes de mélange dans le réservoir sans prélèvement obtenues par la solution théorique et le modèle numérique.....	90
Figure 3~13 : Comparaison entre les courbes de mélange dans le réservoir avec prélèvements obtenues par la solution analytique et le modèle numérique.....	91
Figure 3~14 : Protocole de l'essai de validation de la modélisation du réservoir	92
Figure 3~15 : Comparaison entre les courbes de mélange dans le réservoir obtenues par le modèle numérique et les points expérimentaux.....	92
Figure 3~16 : Évolution de la concentration réduite en sortie de colonne - Comparaison entre la courbe numérique et les points expérimentaux	93
Tableau 3~I : Résultats du modèle de dégradation des oocystes de <i>Cryptosporidium parvum</i> (d'après WALKER & STEDINGER, 1999)	76
Tableau 3~II : Influence des paramètres hydrodynamiques sur la détermination du coefficient de filtration colloïdale par rapport à une simulation de référence	86

CHAPITRE 4

Figure 4~1 : Schéma du dispositif expérimental de l'essai en colonne à circulation fermée	97
Figure 4~2 : Photo du dispositif expérimental de l'essai en colonne à circulation fermée	100
Figure 4~3 : Évolution de la concentration réduite dans le réservoir pour un essai en colonne à circulation fermée sans sable	102
Figure 4~4 : Résultat au niveau du réservoir d'un essai en colonne à circulation fermée à faible débit avec le sable siliceux traité (0,495-1,250 mm)	103

Figure 4~5 : Évolution de la concentration réduite dans le réservoir et en sortie de colonne - Effets des interférences sur la mesure de la conductivité électrique	104
Figure 4~6 : Résultat au niveau du réservoir d'un essai en colonne à circulation fermée à fort débit avec le sable siliceux traité (0,495-1,250 mm)	105
Figure 4~7 : Résultat au niveau du réservoir d'un essai en colonne à circulation fermée à fort débit avec le sable siliceux traité (0,630-0,701 mm)	107
Figure 4~8 : Résultat au niveau du réservoir d'un essai en colonne à circulation fermée avec le sable siliceux traité (0,630-0,701 mm)	109
Figure 4~9 : Résultat au niveau du réservoir d'un essai en colonne à circulation fermée avec le sable siliceux traité (0,630-0,701 mm)	110
Figure 4~10 : Résultat au niveau du réservoir d'un essai en colonne à circulation fermée avec le sable siliceux traité (0,630-0,701 mm)	111
Figure 4~11 : Résultat au niveau du réservoir d'un essai en colonne à circulation fermée avec le sable siliceux traité (0,630-0,701 mm)	113
Figure 4~12 : Résultat au niveau du réservoir d'un essai en colonne à circulation fermée avec le sable siliceux traité (0,630-0,701 mm)	113
Figure 4~13 : Résultat au niveau du réservoir d'un essai en colonne à circulation fermée avec le sable siliceux traité (0,630-0,701 mm)	114

TABLE DES ENCADRÉS

Encadré 1 : La définition d'un colloïde	42
Encadré 2 : Les lois de partage	43
Encadré 3 : Le potentiel zêta	46
Encadré 4 : Les forces d'interactions colloïdales.....	47
Encadré 5 : L'advection et la dispersion hydrodynamique.....	72
Encadré 6 : Les régimes de dispersion.....	74
Encadré 7 : La filtration colloïdale	77

INTRODUCTION GÉNÉRALE

**Ce qui m'intéresse vraiment c'est de savoir
si Dieu avait un quelconque choix en créant le monde.**

Albert EINSTEIN (1879-1955),
physicien allemand, naturalisé américain en 1940
(Prix NOBEL de physique en 1921).

En France, 60 % de l'eau potable provient des eaux souterraines et les 40 % restants ont pour origine des eaux de surface (rivières, lacs, fleuves). Ces dernières sont prélevées par simple pompage alors que les eaux souterraines sont captées par l'intermédiaire d'ouvrages plus complexe : (i) chambre de captage pour les sources ou les résurgences et (ii) puits et forage pour les nappes libres et captives respectivement. Le rôle des chaînes de traitement mises en œuvre par les sociétés de service de l'eau et de l'assainissement est de rendre l'eau brute conforme aux normes de qualité. Ces traitements sont souvent sophistiqués. Ils doivent être adaptés à chaque qualité d'eau brute. Ils intègrent des systèmes de secours en cas de panne des installations, de façon à assurer la continuité de la distribution d'eau. Ils doivent être évolutifs pour suivre les éventuels changements des caractéristiques de la ressource en eau ou le renforcement de l'exigence des normes encadrant la qualité de l'eau distribuée. L'ensemble doit bien sûr être réalisé à un coût optimal.

Ainsi, l'eau qui coule à nos robinets est un produit élaboré, qui a fait l'objet de nombreux traitements et contrôles. L'eau potable n'existe pratiquement plus à l'état naturel. En France, l'eau « propre à la consommation humaine » doit remplir 63 critères définis dans la loi sur l'eau du 3 janvier 1992, qui reflètent deux préoccupations permanentes :

- en priorité, celle de la santé publique : fournir au consommateur une eau sûre, garantie contre tous les risques immédiats ou à long terme, réels, potentiels, ou même simplement supposés,
- ensuite, celle du confort et du plaisir : offrir une eau agréable à boire, claire, inodore et équilibrée en sels minéraux.

Les caractéristiques des eaux brutes sont extrêmement variées. Il existe un certain nombre de procédés élémentaires destinés à les traiter. Les traitements actuels sont d'une remarquable efficacité. On sait aujourd'hui transformer en eau potable presque n'importe quelle eau brute. Pourtant, selon un bilan réalisé en 1995 sur les réseaux les plus importants concernant les $\frac{3}{4}$ des français, 55 % de la population a reçu, au moins une fois dans l'année, une eau qui ne respectait pas une des normes de potabilité [IFEN, 1999]. Pour 13 %, le non-respect des normes dépassait 30 jours par an et la bactériologie représente toujours le risque sanitaire le plus répandu.

En effet, de tout temps, les rejets provenant de l'intestin des animaux et de l'homme ont été évacués dans le sol ou déversés dans les cours d'eau. Ils y subissent une épuration naturelle. Mais s'ils parviennent trop rapidement à une ressource en eau, ils peuvent provoquer une pollution microbiologique. De nos jours, la désinfection systématique des eaux dans les pays industrialisés a pratiquement éliminé les incidences de la pollution microbiologique sur la santé. Cependant, les techniques de désinfections employées ne sont pas toujours efficaces pour l'ensemble des pathogènes, alors que la législation française impose l'absence de tout pathogène dans l'eau potable. Mais, ce domaine scientifique est évolutif et l'état des connaissances progresse régulièrement. On ne peut exclure que, demain, de nouvelles dispositions soient prises pour diminuer encore ces risques. C'est l'objectif principal des traitements appliqués à l'eau auxquels les entreprises spécialisées assurant le service des eaux portent une vigilance de tous les instants. Ainsi, des traitements encore plus sophistiqués et encore plus efficaces seront mis au point. Néanmoins ces traitements coûtent cher,

en raison de leur complexité. Traiter l'eau deviendra de plus en plus onéreux si un effort n'est pas consenti par tous pour préserver la ressource en eau.

En France, la loi sur l'eau du 3 janvier 1992 fait obligation aux communes de protéger les captages à l'aide de périmètres de protection situés autour des points de prélèvement des eaux superficielles ou souterraines. Les périmètres de protection (Figure 1), établis par un hydrogéologue agréé, sont définis dans l'article 21 du décret n°89-3 du 3 janvier 1989 relatif aux eaux destinées à la consommation humaine à l'exclusion des eaux minérales naturelles : « [...] Les limites du périmètre de protection immédiate sont établies afin de prévenir toute introduction directe de substances polluantes dans les ouvrages. Les terrains compris dans ce périmètre sont clôturés [...], et sont régulièrement entretenus. Toutes activités, installations et dépôts y sont interdits [...]. À l'intérieur du périmètre de protection rapprochée sont interdits les activités, installations et dépôts susceptibles d'entraîner une pollution de nature à rendre l'eau impropre à la consommation humaine. Les autres activités, installations et dépôts peuvent faire l'objet de prescriptions et sont soumis à une surveillance particulière [...]. À l'intérieur du périmètre de protection éloignée peuvent être réglementés les activités, installations et dépôts qui, compte tenu de la nature des terrains, présentent un danger de pollution pour les eaux prélevées ou transportées, du fait de la nature et de la quantité de produits polluants liés à ces activités, installations et dépôts ou de l'étendue des surfaces que ceux-ci occupent. »

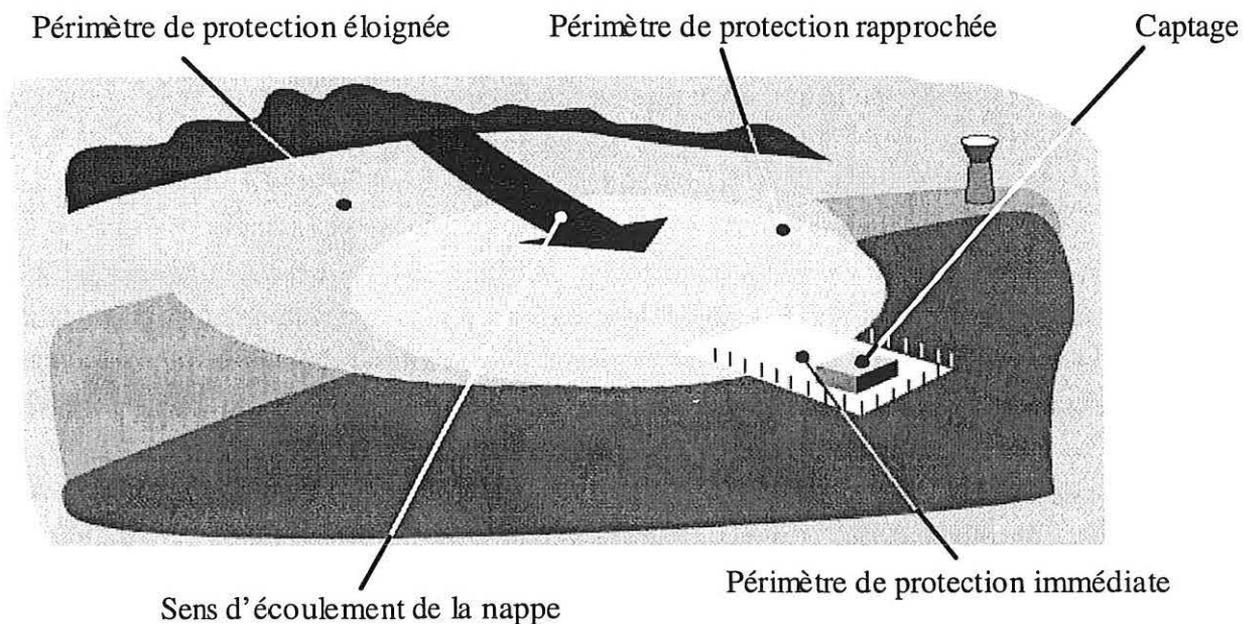


Figure 1 : Périmètres de protection autour du captage d'une source

Aussi, la difficulté majeure est de déterminer correctement les périmètres de protection, *i.e.* : de les dimensionner de façon à minimiser les risques de détérioration de la ressource en eau sans surestimer les coûts. La délimitation théorique des périmètres de protection se base sur quatre critères :

- la durée et la vitesse de transfert de l'eau entre les points d'émission de pollutions possibles et le point de prélèvement dans la nappe, *i.e.* : le temps de transfert de polluants spécifiques,

- le pouvoir de fixation, de dégradation et de dispersion du sol et du sous-sol vis-à-vis des polluants, *i.e.* : le pouvoir d'auto-épuration du sol,
- les caractéristiques de pompage (débit, profondeur) et le rabattement de la nappe,
- la distance et les limites du bassin versant hydrogéologique.

Dans la pratique, pour délimiter les périmètres de protection, l'hydrogéologue agréé se base sur le contexte géologique, hydrogéologique et hydrologique et sur des études de terrain qui permettent d'obtenir l'ordre de grandeur des temps de transfert. La plus grande difficulté est liée à l'hétérogénéité des formations géologiques, surtout pour des captages d'eaux souterraines. En outre, concernant les études de terrain pour un captage d'eau souterraine, deux types d'essais sont utilisés pour obtenir des renseignements sur les temps de transfert :

- des pompages d'essais, qui fournissent le coefficient d'emménagement et la transmissivité de l'aquifère,
- des traçages (notamment à la fluorescéine), qui fournissent le temps de transfert entre le point d'injection et le point de prélèvements et la porosité de l'aquifère.

Évidemment, il n'est pas possible de déterminer précisément *in situ* le temps de transfert pour un polluant, car il faudrait injecter ce polluant dans la ressource en eau ! Pour cette même raison, il n'est pas possible de déterminer le pouvoir d'auto-épuration du sol *in situ* pour un polluant. Dans ce contexte, des études en laboratoire sont alors nécessaires. Cependant, ce type d'études s'est essentiellement focalisé sur une meilleure détermination des paramètres physiques, plutôt que biologiques, du transfert des polluants. Bien que de nombreux travaux existent sur les virus et les bactéries, peu présentent une application directe à l'étude du transfert. A notre connaissance, un nombre limité de travaux existe sur la détermination des caractéristiques de transport d'un protozoaire^m pathogène au sein d'un aquifère. La méconnaissance des phénomènes de transport des micro-organismes induit que parmi les modèles numériques les caractéristiques des polluants microbiologiques sont rarement pris en compte. Certes, des témoins de contamination fécale comme les coliformes et les streptocoques sont intégrés dans les normes relatives aux eaux potables. Néanmoins, des micro-organismes pathogènes peuvent être présents malgré l'absence de ces témoins.

Parmi les micro-organismes pathogènes, BARER & WRIGHT (1990) ont rapporté que *Cryptosporidium parvum* constituait la 4^{ème} cause de diarrhées confirmées en laboratoire en Angleterre et Pays de Galles. En effet, les caractéristiques biologiques de ce protozoaire en font un contaminant dangereux des eaux. Ainsi, la forme de dissémination de *C. parvum* est un kyste^m, l'oocyste, qui lui assure une survie dans des conditions environnementales défavorables à la plupart des micro-organismes. Cette particularité est retrouvée chez d'autres protozoaires pathogènes (*e.g.* : *Giardia lamblia*). En outre, aucun traitement spécifique n'existe pour traiter la cryptosporidiose, pathologie à pronostic sombre lorsqu'elle se développe chez des personnes immunodéprimées. Plusieurs études montrent une présence importante de *C. parvum* dans les eaux de surface, mais aussi dans les eaux souterraines [LECHEVALLIER *et al.*, 1991 ; HANSEN & ONGERTH, 1991 ; KETELAARS *et al.*, 1995 ; ROSE 1997 ; HANCOCK *et al.*, 1998 ; ROUQUET *et al.*, 2000 ; SKERRETT & HOLLAND, 2000]. De nombreuses épidémies d'origine hydrique liées à la consommation d'eau ont été rapportées au cours de ces 20 dernières années et le risque de nouvelles épidémies est encore présent. En effet, récem-

ment, durant les mois d'avril et de mai 2001 dans la ville de North Battleford dans la province canadienne du Saskatchewan, la contamination de l'eau potable par *C. parvum* a été responsable du décès de 3 personnes et 44 cas d'infection confirmés dans les hôpitaux [VENTER, 2001].

Aussi, pour protéger efficacement les ressources en eau de ce parasite, il est important de déterminer les caractéristiques du transport des oocystes de *C. parvum* dans les aquifères, ce qu'il est possible de faire à l'aide d'essais en laboratoire. Il faut cependant garder à l'esprit que les résultats des essais en laboratoire ne peuvent pas être directement utilisables *in situ* du fait de la différence d'échelle. Mais, ils permettent de comprendre, ou au moins de qualifier, les phénomènes qui régissent le transport des oocystes au sein des aquifères.

De par la pluridisciplinarité scientifique du problème, l'étude du transport des oocystes de *C. parvum* dans un milieu poreux saturé nécessite plusieurs approches :

- Une approche microbiologique dont le but est de modifier les techniques employant des suspensions en oocystes afin que celles-ci soient en accord avec les impératifs de l'étude, notamment titrer avec une précision convenable les suspensions en oocystes. Cette approche est développée dans le chapitre 1.
- Une approche physico-chimique permettant de déterminer les interactions entre les oocystes et le milieu poreux, *i.e.* : les mécanismes d'adsorption. Cette approche est développée dans le chapitre 2.
- Une approche numérique dont le but est de simuler le transport des oocystes dans un milieu poreux saturé à l'échelle du laboratoire, afin de fournir un outil pour l'interprétation des résultats des essais. Cette approche est développée dans le chapitre 3.
- Une approche mécaniste afin d'évaluer les paramètres du transport des oocystes dans un milieu poreux saturé à l'échelle du laboratoire, en s'appuyant sur les résultats des approches précédentes. Cette approche est développée dans le chapitre 4.

Ce mémoire débutera par une synthèse bibliographique sur *C. parvum*, mettant l'accent sur le problème de santé publique qu'il pose (chapitre 0).

CHAPITRE 0

***CRYPTOSPORIDIUM PARVUM* : UN PROBLÈME DE SANTÉ PUBLIQUE**

RÉSUMÉ

Cryptosporidium, parasite protozoaire, a été décrit pour la première fois il y a plus de 90 ans. Cependant, bien que très souvent rencontré lors d'épidémies bovines ou ovines, sa pathogénicité chez l'homme a été prouvée il y a 25 ans. L'espèce *Cryptosporidium parvum*, seule pathogène pour l'homme, entraîne une cryptosporidiose dont le symptôme principal est une diarrhée profuse et aqueuse. Tout à fait bénigne chez une personne immunocompétente, elle peut se révéler fatale chez les sujets immunodéprimés. La transmission de *C. parvum* se fait par l'ingestion de la forme de résistance, l'oocyste. Trois facteurs favorisent la transmission de ce parasite par l'eau : une dose minimale infectante très faible, une résistance élevée à des conditions habituellement létales pour d'autres micro-organismes et une cinétique d'excrétion importante. Plusieurs études montrent une présence importante de ce parasite dans les eaux de surface et les eaux souterraines. De nombreuses épidémies ont été recensées dans le monde et elles sont, le plus souvent, provoquées par la contamination de l'eau de boisson. Ces épidémies montrent également l'importance de ne pas seulement se focaliser sur les techniques de désinfection, mais aussi de protéger les ressources en eau. Il est donc fondamental de correctement délimiter les périmètres de protection autour des ouvrages de captages, ce qui exige la recherche en laboratoire des phénomènes du transport des oocystes dans les aquifères.

**Il y a beaucoup de mystère dans le choix
de ce qui nous paraît digne d'être noté.**

Jean ROSTAND (1894-1977),
biologiste et écrivain français.

Extrait de *Carnet d'un biologiste* (1959).

0~1 - INTRODUCTION

Cryptosporidium est un micro-organisme qui est très peu connu en France par le grand public. Cette méconnaissance est peut être due au fait que sa découverte est récente. Pourtant, en tant que parasite de l'homme, il induit la cryptosporidiose, pathologie à pronostic sombre lorsqu'elle se développe chez des personnes immunodéprimées, d'autant plus qu'aucun traitement spécifique n'existe. De plus, certaines des caractéristiques de ce micro-organisme favorisent sa transmission par l'eau, ce qui en fait un contaminant dangereux des eaux. D'ailleurs, des études récentes montrent la présence de ce parasite dans l'environnement de plusieurs pays, y compris la France. De nombreuses épidémies ont été recensées dans le monde, mais aucune en France, ce qui finalement peut expliquer sa méconnaissance dans notre pays. Ces épidémies étant le plus souvent liées à la consommation d'eau potable, il est donc primordial de maintenir la qualité de cette dernière. Ceci peut se faire à deux niveaux, en aval par des techniques de traitements des eaux si celles-ci sont efficaces, ce qui n'est pas le cas concernant *Cryptosporidium*, et en amont par la protection des ressources en eau. C'est ce dernier point qui nous a incité à développer notre sujet de recherche.

0~2 - CRYPTOSPORIDIUM PARVUM : HISTORIQUE

La première description du genre *Cryptosporidium* a été réalisée par TYZZER en 1907. Trois ans plus tard, TYZZER a isolé ce protozoaire à partir de la glande gastrique d'une souris de laboratoire et il l'a nommé *Cryptosporidium muris* [TYZZER, 1910]. Deux ans plus tard, TYZZER a identifié une autre espèce isolée dans le petit intestin d'une souris : *Cryptosporidium parvum* [TYZZER, 1912]. C'est seulement en 1955 que le caractère pathogène de ce parasite a été démontré, d'abord chez la dinde avec la découverte d'une nouvelle espèce (*Cryptosporidium meleagridis*) [SLAVIN, 1955], puis, plus tard, chez le veau [PANCIERA *et al.*, 1971]. Depuis, *Cryptosporidium* est fréquemment rencontré chez cet animal.

Le premier cas de cryptosporidiose humaine a été rapporté en 1976, chez un enfant de moins de 3 ans vivant dans une ferme [NIME *et al.*, 1976]. La même année, un autre cas a été signalé chez un patient immunodéprimé [MEISEL *et al.*, 1976]. La première épidémie de cryptosporidiose d'origine hydrique a été rapportée en 1985 au Texas, touchant une communauté de 6 000 personnes [D'ANTONIO *et al.*, 1985]. Depuis lors, 69 épidémies ont été recensées jusqu'en septembre 1999, infectant un nombre estimé de 461 200 personnes. La plus importante a eu lieu au printemps de l'année 1993 à Milwaukee (USA), avec un nombre de malades évalué à 403 000 contaminés par des oocystes de *C. parvum* qui sont passés à travers le système de filtration d'une des stations de traitement d'eau de la ville [MAC KENZIE *et al.*, 1994].

0~3 - CRYPTOSPORIDIUM PARVUM : UN PARASITE

La cryptosporidiose est une anthroponose^m cosmopolite^m. La taxinomie^m de *Cryptosporidium*, décrite par LEVINE en 1984, s'est affinée par la suite avec la notion de géotypes^m, mettant en

évidence les espèces et/ou génotypes parasites de l'homme. Le tableau clinique est le même quel que soit l'âge ou le sexe, mais son intensité varie notablement avec le statut immunitaire des hôtes.

0~3.1 - Taxinomie

C. parvum est un protozoaire parasite de la classe des sporozoaires^{sa} (Figure 0~1).

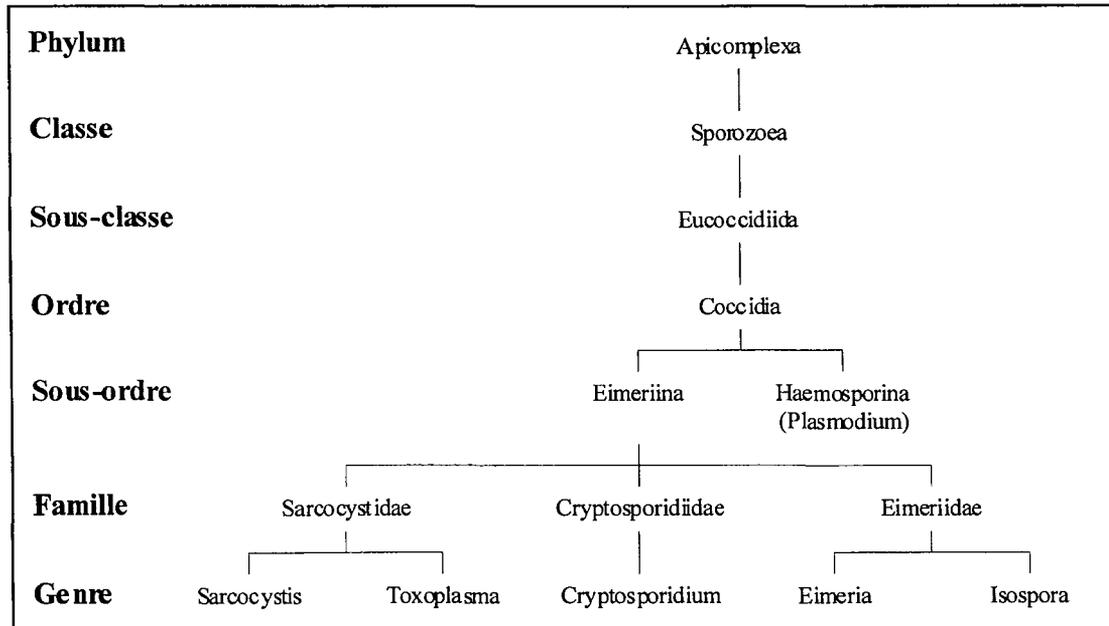


Figure 0~1 : Taxinomie simplifiée de *Cryptosporidium*
(d'après LEVINE, 1984)

Cryptosporidium infecte les mammifères, les oiseaux, les reptiles et les poissons. Dans l'ensemble des études réalisées, on peut noter 22 espèces parmi le genre *Cryptosporidium* [MORGAN *et al.*, 1999]. Cependant FAYER *et al.* (2000) indiquent dix espèces validées (Tableau 0~I).

Tableau 0~I : Espèces de *Cryptosporidium*
(d'après FAYER *et al.*, 2000)

Espèce	Hôte type
<i>C. andersoni</i>	<i>Bos taurus</i> (bœuf)
<i>C. baileyi</i>	<i>Gallus gallus</i> (poule)
<i>C. felis</i>	<i>Felis catis</i> (chat)
<i>C. meleagridis</i>	<i>Meleagris gallopavo</i> (dinde)
<i>C. muris</i>	<i>Mus musculus</i> (souris)
<i>C. nasorum</i>	<i>Naso lituratus</i> (poisson)
<i>C. parvum</i>	<i>Mus musculus</i> (souris)
<i>C. saurophilum</i>	<i>Eumeces schneideri</i> (lézard)
<i>C. serpentis</i>	Plusieurs espèces de reptiles
<i>C. wrairi</i>	<i>Cavia porcellus</i> (cobaye)

Seul *C. parvum* infecte l'homme, mais il est également retrouvé chez d'autres mammifères comme les animaux d'élevages (moutons, vaches, ...), les animaux domestiques (chiens, chats, ...) et les animaux sauvages (cerfs, rongeurs, ...). FAYER *et al.* (2000) rapportent 152 espèces différentes de mammifères infectées par *C. parvum*.

Des études génétiques indiquent qu'au moins deux génotypes de *C. parvum* (1 et 2), infectent l'homme. Le génotype 1 serait strictement humain, il a seulement été possible de le transmettre expérimentalement à un primate captif. Le génotype 2 a aussi été trouvé chez les animaux (bovins, moutons, chèvre, ...) [BONNIN *et al.*, 1996]. Ces études génétiques récentes sont très importantes car elles infirment les théories classiques sur les modes de contaminations. En effet, la principale source d'oocystes dans les eaux potables était traditionnellement attribuée à la contamination des eaux par le ruissellement des sols agricoles. Cette hypothèse implique donc que la majorité des cas de contamination humaine soient associés au génotype 2, le type qui est perpétué par les animaux. Or, des études montrent que la majorité des infections humaines libère des oocystes de génotype 1 [WIDMER *et al.*, 1998 ; MCLAUCHLIN *et al.*, 2000]. Les contaminations des eaux seraient donc plutôt dues à des eaux usées qu'au lessivage de sols agricoles.

La recherche des génotypes de *C. parvum* est actuellement en plein essor. Ainsi, d'autres génotypes ont été identifiés [FAYER *et al.*, 2000] (Tableau 0~II).

**Tableau 0~II : Génotypes de *Cryptosporidium parvum*
(d'après FAYER *et al.*, 2000)**

Génotype	Hôtes immunocompétents
'Cattle'	Artiodactyles, animaux domestiques, homme
'Human/Monkey'	Homme, dugong
'Mouse'	Souris, chauve souris
'Pig'	Porc
'Marsupial'	Koala, kangourou
'Dog'	Chien
'Ferret'	Furet

0~3.2 - Cycle de développement

Cryptosporidium a un cycle de développement complexe mais qui ne compte qu'un hôte. On peut distinguer six phases au cours du cycle de développement de *C. parvum* (Figure 0~2) :

- l'ingestion et le dékystement : libération des sporozoïtes infectants à partir de l'oocyste [A],
- l'invasion d'une cellule hôte par les sporozoïtes [B-C],
- la mérogonèse : réplication asexuée [D-E-F],
- la gamétogenèse : formation des gamètes [H-G],
- la fécondation : fusion des gamètes [I],
- l'enkystement : formation des oocystes [J-K],
- la sporogenèse : libération des oocystes [L].

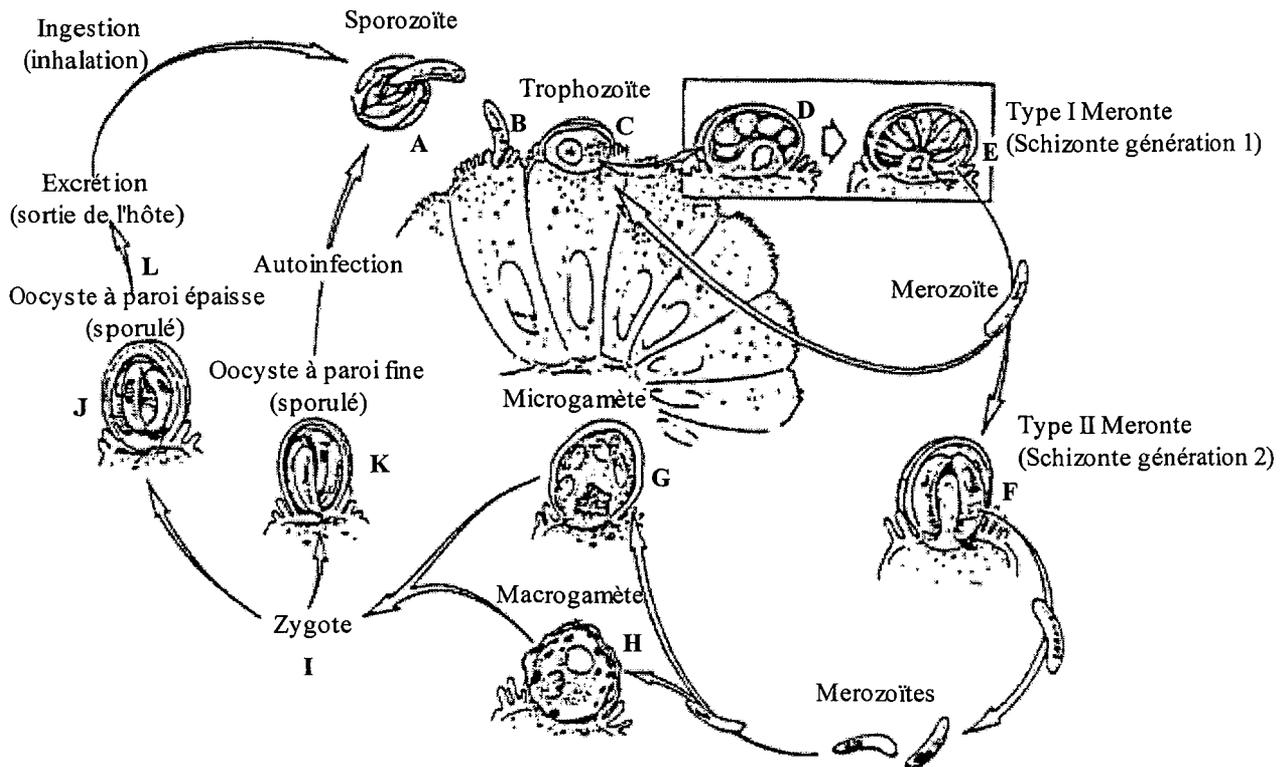


Figure 0-2 : Cycle de développement de *Cryptosporidium parvum* (d'après BADENOCH, 1990)

Ces phases ont été amplement étudiées ; elles sont reprises par PETERSEN (1993) dans sa description de *Cryptosporidium*.

Le dékystement [A] a lieu au niveau de la lumière du tractus digestif. Une fois les ocystes ingérés, les enzymes protéolytiques^m et les sels biliaires altèrent la perméabilité de la membrane. Ensuite, les sporozoïtes sont libérés dans la lumière du tube digestif par action des enzymes pancréatiques et/ou des sels biliaires.

Les sporozoïtes se fixent sur les cellules épithéliales^m de l'appareil digestif [B]. Ils pénètrent dans les entérocytes^m mais restent en position extracytoplasmique^m. Ils sont alors appelés trophozoïtes [C]. D'autres organes peuvent être touchés comme la vésicule biliaire [PITLIK *et al.*, 1983] ou les poumons [ROUSSEL *et al.*, 1995].

La mérogenèse correspond à la phase de réplique asexuée. Par division méiotique^m [D], les sporozoïtes développent des mérozoïtes haploïdes^m qui envahissent rapidement les cellules voisines (auto-infection). Le mérozoïte unicellulaire, qui se forme en position intra-entérocytaire mais extracellulaire, migre à la périphérie de la cellule. Deux éventualités se présentent alors [CURRENT & HAYNES, 1984] :

- En 12 heures, des mérozoïtes de type I apparaissent (six ou huit par schizonte). Ils sont alors « recyclés », car invasifs pour les cellules épithéliales voisines [E].
- En 24 heures, des mérozoïtes de type II apparaissent (quatre par schizonte). Ils se développent alors en gamètes [F].

En 48 heures, les mérozoïtes de type II évoluent vers une phase sexuée. Ils se développent alors en seize gamètes « femelles » (microgamètes) [G] ou en gamètes « mâles » (macrogamètes) [H] non flagellés en forme de boule [CURRENT & HAYNES, 1984]. La fusion des gamètes [I] n'a jamais été observée.

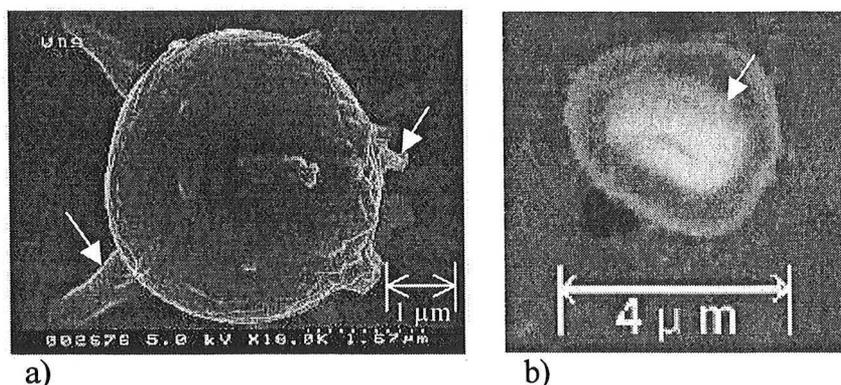
La cellule formée par fécondation se divise en quatre cellules mobiles appelées sporozoïtes par mitose^m qui ensuite s'enkystent, *i.e.* : s'entourent d'une paroi. Deux types d'oocystes sont différenciés en fonction de la structure de cette paroi :

- 80 % des oocystes formés sont à enveloppe épaisse [J],
- 20 % des oocystes formés sont à enveloppe mince [K].

La simple membrane des oocystes à enveloppe mince se casse facilement dès que les oocystes quittent les cellules hôtes. Les sporozoïtes libérés pénètrent alors les cellules épithéliales adjacentes en réalisant un cycle endogène [CURRENT, 1987]. Les oocystes à enveloppe épaisse sont évacués de l'hôte dans les fèces [L]. Ils correspondent donc à la forme de dissémination.

0~3.3 - Structure et dimension des oocystes

L'oocyste sert donc de protection pour quatre sporozoïtes et possède une paroi épaisse présentant des aspérités [KARAMAN *et al.*, 1999 ; CONSIDINE *et al.*, 2000] (Figure 0~3). Une observation au microscope des oocystes révèle parfois un pli dans la paroi de l'oocyste [ROSE *et al.*, 1989]. Ce pli a été décrit comme étant une suture, correspondant ainsi à la zone qui céderait lors du dékystement. Pour ROBERTSON *et al.* (1993), ce pli indique en fait la position des sporozoïtes à l'intérieur des oocystes, ce qui explique qu'il est possible d'observer parfois plusieurs plis dans la paroi. Ils ont conclu aussi que cette particularité indique un degré de flexibilité de la paroi de l'oocyste. MEDEMA *et al.* (1998) ont déterminé que la masse volumique des oocystes de *C. parvum* est de 1 045,4 kg/m³. CURRENT (1987) décrit les oocystes de *C. parvum* comme les plus petits protozoaires de leur classe. Ils ont une taille de 4 à 6 µm et une forme ovoïde (Figure 0~3).



a) → « excroissances » sur la paroi ; b) → amas au centre qui correspond aux quatre sporozoïtes

**Figure 0~3 : Oocystes de *Cryptosporidium parvum* observés au microscope électronique à balayage (M.E.B.)
(d'après KARAMAN *et al.*, 1999)**

0~3.4 - Tableau clinique

Il faut distinguer en terme d'évolution la cryptosporidiose du sujet immunocompétent de celle du sujet immunodéprimé.

a) Chez le sujet immunocompétent

L'incubation varie de 2 à 12 jours. Le tableau clinique caractérisé par une diarrhée hydrique avec 5 à 10 selles quotidiennes, des vomissements et douleurs abdominales, parfois accompagnées d'un cortège de manifestations non spécifiques : fièvre (inférieure à 39°C), céphalées^m, asthénie^m, anorexie, sueurs [BONNIN & CAMERLYNCK, 1989]. La conséquence peut être une perte de poids et une déshydratation. La période d'excrétion dans les selles débute environ 8 à 14 jours après l'infestation, à des concentrations de 10^8 à 10^{10} oocystes par jour. La maladie évolue généralement favorablement en quelques semaines (1 à 3 semaines, jusqu'à 6 éventuellement). Ce sont en particulier les vétérinaires et les éleveurs, professionnellement exposés, qui sont les plus sensibles aux infections à *Cryptosporidium*. L'excrétion des oocystes se poursuit généralement pendant 2 à 3 semaines et exceptionnellement sur de plus longues périodes, après cessation des symptômes. Ce phénomène a de nombreuses implications notamment au niveau de la transmission de l'infection par des individus asymptomatiques.

b) Chez le sujet immunodéprimé

Les populations cibles sont les patients sidéens, les individus souffrant de malnutrition, d'hypogammaglobulinémies, de traitements immunosuppresseurs (par exemple lors de transplantation ou de greffe), de corticothérapie, d'hémopathies malignes, de traitements antimitotiques et également les jeunes enfants (de 6 mois à 3 ans) et les personnes âgées puisque leur système immunitaire n'est pas optimal. Chez ces patients, la cryptosporidiose intestinale provoque des diarrhées profuses rarement sanglantes allant jusqu'à 15 litres par jour chez des patients sidéens, ce qui ressemble à une diarrhée cholériforme. La dénutrition est alors majeure. Il peut exister des localisations extra-intestinales : respiratoires [ROUSSEL *et al.*, 1995], biliaires (cholécystite, hépatite) ou pancréatiques [PITLIK *et al.*, 1983]. Il n'y a pas de guérison spontanée chez ces individus. La maladie peut alors être fatale. De nos jours, avec les tri-thérapies effectuées sur les malades atteints du syndrome de l'immunodéficience acquise (SIDA), la mortalité par cryptosporidiose a considérablement diminué.

0~3.5 - Traitement et prophylaxie

Les sujets immunocompétents ne sont habituellement pas traités. L'excrétion des oocystes est spontanément régressive. Chez les sujets immunodéprimés, seuls les traitements symptomatiques sont actuellement proposés, comme le rétablissement de l'équilibre hydro-électrolytique et la nutrition parentérale^m. Il n'existe pas de traitement parfait, aussi bien en médecine vétérinaire qu'en médecine humaine, mais des résultats encourageants ont été trouvés avec l'association de deux antibiotiques, de la paramomycine et l'azithromycine [MAGGI *et al.*, 2000].

0~4 - *CRYPTOSPORIDIUM PARVUM* : LES TROIS FACTEURS FAVORISANT SA TRANSMISSION

La transmission de *C. parvum* se fait par l'ingestion de la forme enkystée. Les principaux vecteurs de contamination sont :

- l'eau,
- toute nourriture pouvant être contaminée, soit par l'eau de lavage contaminée ou le fumier, soit parce que provenant d'animaux contaminés,
- tout objet souillé par des fèces d'individus ou d'animaux contaminés.

Les oocystes sont caractérisés par trois facteurs favorisant particulièrement cette transmission par l'eau : leur dose minimale infectante, leur résistance et leur cinétique d'excrétion.

0~4.1 - Dose minimale infectante

Si un faible nombre d'oocystes semble capable d'induire la maladie chez l'homme, la dose minimale infectante n'est cependant pas connue avec précision.

FINCH *et al.* (1993) ont estimé que la dose nécessaire pour infecter 50 % d'une population de souris est de 79 oocystes. Ils ont également observé que 7 jours après l'inoculation orale de 23 oocystes, 2 souris sur 25 étaient infectées. Tous les animaux sont infectés si la dose dépasse 300 oocystes par animal.

DUPONT *et al.* (1995) ont déterminé la dose moyenne infectante chez des hommes adultes sains à partir d'une étude réalisée sur 29 volontaires qui ont ingéré une dose de 30 oocystes à 1 million d'oocystes. Sur les 5 individus qui ont ingéré une dose de 30 oocystes, un seul (20 %) a été infecté. Avec une dose de 300 oocystes ou plus, 14 sur 16 sujets (88 %) ont été infectés et pour une dose de 1000 oocystes ou plus, 7 des 7 sujets (100%) ont été infectés. Ils ont donc estimé, par régression linéaire, la dose moyenne infectante (ID₅₀) à 132 oocystes. La détermination de la dose moyenne infectante s'est compliquée avec les travaux de OKHUYSEN *et al.* (1999) qui ont mis en évidence une variabilité de la dose moyenne infectante en fonction du type d'isolats. Avec trois isolats différents, ils ont trouvé des ID₅₀ de 87 oocystes, 1042 oocystes et 9 oocystes respectivement.

0~4.2 - Résistance des oocystes de *Cryptosporidium parvum*

De nombreux auteurs ont étudié la résistance des oocystes de *C. parvum*, aux désinfectants classiques utilisés pour le traitement de l'eau, à d'autres désinfectants gazeux, aux températures (basses et hautes) et à la dessiccation.

a) Effet des désinfectants classiques

Les oocystes de *C. parvum* présentent une résistance élevée à la plupart des désinfectants classiquement utilisés dans le traitement de l'eau (Tableau 0~III). KORICH *et al.* (1990) ont montré que la

valeur du Ct (la concentration multipliée par le temps en minutes) pour obtenir 99 % d'inactivation des oocystes de *C. parvum* avec de l'ozone est 30 fois plus grande que pour les kystes de *Giardia lamblia* et celle pour obtenir 90 % d'inactivation avec du dioxyde de chlore est 14 fois plus grande.

Tableau 0-III : Concentration et temps d'exposition pour 90 % d'inactivation de *Cryptosporidium parvum* par différents agents désinfectants (d'après ROT - DE HEAULME, 1988 et KORICH *et al.*, 1990)

Agents désinfectants	Concentration	Temps d'exposition	Dose classiquement employée en désinfection
Ozone	1 mg/l	5 min	0,4 mg/l
Dioxyde de chlore	1,3 mg/l	60 min	0,2 mg/l
Monochloramine	80 mg/l	90 min	
Chlore	80 mg/l	90 min	0,5 mg/l

Récemment, de nombreuses études cherchent à inactiver les oocystes de *C. parvum* en associant plusieurs désinfectants dans des conditions déterminées de température et de pH, tel que de l'ozone et du chlore [DRIEDGER *et al.*, 2000a ; RENNECKER *et al.* 2000], ou de l'ozone et de la monochloramine [DRIEDGER *et al.*, 2000b ; RENNECKER *et al.* 2000], avec des résultats prometteurs.

b) Effet d'autres désinfectants gazeux

FAYER *et al.* (1996) ont testé l'efficacité de certains gaz en vue d'une utilisation pour désinfecter des salles, des bâtiments, des outils ou des instruments (Tableau 0-IV). Seul un traitement de longue durée par certains gaz comme le bromométhane, l'oxyde d'éthylène ou l'ammoniac est efficace pour détruire totalement les oocystes (pour l'ammoniac il faudrait traiter pendant 18 h). Cependant, la majorité de ces gaz ne peut pas être utilisée dans une filière de traitement des eaux classique en raison de leur toxicité.

Tableau 0-IV : Influence de certains gaz désinfectants sur la viabilité de *Cryptosporidium parvum* (d'après FAYER *et al.*, 1996)

Traitement	Usage habituel / origine	Taux de viabilité*
Monoxyde de carbone	Gaz toxique provenant d'une combustion incomplète	100 % (6)
Oxyde d'éthylène	Agent stérilisant ; fongicide ; désinfectant pour textiles	0 % (6)
Bromométhane	Désinfectant pour textile et sols des entrepôts	0 % (5)
Ammoniac	Très irritant et très toxique (3 M/l)	0 % (5)
Formaldéhyde		60 % (10)
« anoxie »		100 % (3)

* : la valeur entre parenthèse indique le nombre d'échantillons testés

c) Effet de la température

Différents auteurs ont étudié l'impact des températures (basses et hautes) ainsi que celui de la dessiccation.

• Basses températures

ROBERTSON *et al.* (1992) ont montré qu'une congélation rapide (immersion dans de l'azote liquide, *i.e.* : -173°C) tue 100 % des oocystes. Par contre, en congélation lente à -22°C, 33 % des oocystes sont viables après 21 heures, et même si ce taux diminue jusqu'à 7,9 % après 152 heures, une partie des oocystes est toujours viable après 750 heures (1,8 %).

FAYER & NERAD (1996) ont étudié la résistance des oocystes de *C. parvum* en fonction du temps de séjour à des basses températures (Tableau 0~V). Ils trouvent, eux aussi, que les oocystes résistent bien et longtemps aux températures négatives obtenues progressivement, bien que cette résistance soit dans cette étude plus faible.

Tableau 0~V : Influence des basses températures sur la viabilité de *Cryptosporidium parvum* (d'après FAYER & NERAD, 1996)

Temps	Taux de viabilité*				
	à -70°C	à -20°C	à -15°C	à -10°C	à -5°C
1 h	0 % (6)	100 % (6)			
3 h		100 % (6)			
5 h		100 % (6)			
8 h	0 % (6)	17 % (6)	100 % (12)	100 % (12)	
24 h	0 % (6)	0 % (17)	100 % (12)	92 % (12)	
168 h (soit 7 j)		0 % (6)	0 % (12)	100 % (12)	100 % (6)

* : la valeur entre parenthèse indique le nombre d'échantillons testés

• Hautes températures

FAYER (1994) a montré que les oocystes peuvent rester infectieux après passage à des températures élevées (moins de la moitié des oocystes est détruite à 67,5°C pendant 1 minute). Par contre, une température de 64,2°C pendant 2 minutes, ou bien une température de 72,4°C pendant 1 minute tue 100 % des oocystes.

• Dessiccation

Pour étudier l'effet de la dessiccation, ROBERTSON *et al.* (1992) ont placé une suspension en oocystes de 50 µl sur lame de verre, qui est ensuite soumise à un air chaud (entre 18°C et 20°C). Après seulement 2 heures, 3 % des oocystes sont toujours viables, mais au bout de 4 heures 100 % des oocystes sont morts.

0~4.3 - Cinétique d'excrétion et présence dans l'environnement

La présence dans l'environnement de *C. parvum* est en partie liée à la cinétique d'excrétion. En effet, plus cette cinétique est importante, plus la quantité libérée dans l'environnement est grande. Or, un malade atteint de cryptosporidiose excrète dans ses selles de 10^8 à 10^{10} oocystes par jour

pendant 12 jours en moyenne, avec des extrêmes de 3 à 30 jours. Chez les animaux, la cinétique d'excrétion est identique à celle décrite chez l'homme. On est donc en présence d'un réservoir important d'oocystes, structures résistantes susceptibles de contaminer l'environnement.

De façon générale, on peut diviser en deux groupes les études qui indiquent la présence des oocystes de *C. parvum* dans l'environnement :

- les études concernant directement la contamination des eaux naturelles,
- les études concernant la contamination des animaux domestiques, puisque les animaux contaminés constituent une source d'oocystes qui sont libérés dans l'environnement.

a) Contamination des eaux naturelles

Il existe quelques études sur ce sujet (Tableau 0~VI).

Tableau 0~VI : Études sur la contamination des eaux naturelles par *Cryptosporidium*

Localisation	Type d'eau	Taux d'échantillons positifs ¹	Concentration		
			Minimale en oocystes/l	Moyenne en oocystes/l	Maximale en oocystes/l
Amérique du nord [LECHEVALLIER <i>et al.</i> , 1991]	Eaux brutes de 66 stations de traitement d'eaux de surface	87 % (85)	0,07	2,70	484
Washington (USA) [HANSEN & ONGERTH, 1991]	4 sites localisés sur 2 rivières	97 % (35)	0,15	5,8	63,5
Pays-Bas [KETElaARS <i>et al.</i> , 1995]	La Meuse (rivière)	11,5 % (52)	0,002	0,01	0,018
USA [HANCOCK <i>et al.</i> , 1998]	199 sites d'eaux souterraines	12,5 % (463)	0,2	19	528
France [ROUQUET <i>et al.</i> , 2000]	Station de traitement de Choisy-le-Roi sur la Seine	nd ²	0,2	2	32
France (ROUQUET <i>et al.</i> , 2000)	Station de traitement de Neuilly-sur-Marne sur la Marne	nd ²	0,2	2	12
Irlande [SKERRETT & HOLLAND, 2000]	5 sites d'eau de surface	40,6 % (69)	0,5	1,3	6

1 : la valeur entre parenthèse indique le nombre d'échantillons analysés

2 : non donné (nd)

De façon générale, les quantités d'oocystes trouvées sont faibles, mais pas nulles. ROSE (1997) a retrouvé des oocystes de *C. parvum* à des concentrations de 0,001 à 107 oocystes par litre dans les eaux de surface et de 0,004 à 0,922 oocyste par litre dans les eaux souterraines. Tous les types d'eau peuvent donc être contaminés, même les eaux souterraines. BOUCHIER (1998) a rapporté neuf

contaminations suspectées des eaux souterraines par *Cryptosporidium* en Angleterre et aux Pays de Galles entre 1990 et 1997.

Les quatre sites de l'étude de HANSEN & ONGERTH (1991) (Tableau 0~VI) sont dans des bassins versants très différents : zone forestière à vocation récréative, forêt de montagne, espace agricole et forêt de montagne protégée (toute activité humaine y est interdite). Les plus fortes concentrations (10 à 60 oocystes par litre) ont été trouvées en aval de la zone agricole. Les plus faibles concentrations (0,15 à 0,45 oocystes par litre) ont été détectées dans la zone protégée.

Les 199 sites d'eaux souterraines de l'étude de HANCOCK *et al.* (1998) (Tableau 0~VI) réunissent plusieurs type d'eaux souterraines (Tableau 0~VII).

Tableau 0~VII : Contamination des eaux souterraines par *Cryptosporidium parvum* (d'après HANCOCK *et al.*, 1998)

Type d'eaux souterraines	Nombre total de sites	Nombres de sites contaminés
Puits vertical	149	7 (4,7 %)
Galerie d'infiltration	4	2 (50,0 %)
Résurgence	35	7 (20,0 %)
Puits horizontal	11	5 (45,5 %)

Dans leur étude, ROUQUET *et al.* (2000) (Tableau 0~VI) précisent que pour 60% des prélèvements, la concentration est inférieure à la limite de détection (1 oocyste/l) et seuls 2 échantillons ont des concentrations supérieures à 5 oocystes/l.

Sur les cinq sites suivis par SKERRETT & HOLLAND (2000) (Tableau 0~VI), un correspond à des eaux brutes dans une station de traitement. Le maximum d'échantillons positifs a été trouvé sur ce site, avec 69,2 % d'échantillons positifs et une concentration maximale de 6 oocystes/l.

b) Contamination des animaux domestiques

DIDELOT (1991), dans une enquête auprès des laboratoires vétérinaires dans le département de la Meurthe-et-Moselle sur la présence de *C. parvum*, a montré qu'environ 20 % des selles d'animaux diarrhéiques contenaient des oocystes de *C. parvum*.

LEFAY *et al.* (2000) ont rapporté deux enquêtes réalisées sur les infections par *C. parvum* de bovins en France. La première a été réalisée au niveau régional dans 6 marchés aux bestiaux d'octobre 1995 à septembre 1996 (Tableau 0~VIII) et la seconde au niveau départemental dans des fermes par les Laboratoires Départementaux Vétérinaires de novembre 1995 à mai 1996 (Tableau 0~IX). Ces deux enquêtes montrent une présence non négligeable des oocystes de *C. parvum* chez les bovins sur l'ensemble des régions de l'étude, avec une distribution homogène et une moyenne de 17,9 % de cas positifs. Par contre, la distribution est différente au niveau des fermes, avec un maximum de 70,4 % dans le Cantal et un minimum de 17,9 % dans le Maine-et-Loire. En outre, la valeur moyenne est plus importante, 43,4 % de cas positifs.

**Tableau 0~VIII : Cas d'infection de bovins par *Cryptosporidium parvum* par région
(d'après LEFAY *et al.* 2000)**

Régions	Nombre de bovins positifs	Nombre total de bovins testés	Cas positifs (%)
Aquitaine	45	220	20,5 %
Bretagne	32	240	13,3 %
Franche-Comté	60	237	25,3 %
Lorraine	43	235	18,3 %
Nord	33	218	15,1 %
Normandie	33	240	13,8 %
Pays de Loire	46	238	19,3 %
TOTAL	292	1628	17,9 %

**Tableau 0~IX : Cas d'infection de bovins par *Cryptosporidium parvum* par département
(d'après LEFAY *et al.* 2000)**

Départements	Nombre de bovins positifs	Nombre total de bovins testés	Cas positifs (%)
Allier	14	38	36,8 %
Cantal	38	54	70,4 %
Creuse	46	98	46,9 %
Doubs	21	41	51,2 %
Ille-et-Vilaine	10	21	47,6 %
Maine-et-Loire	7	39	17,9 %
Manche	7	35	20,0 %
Pas-de-Calais	21	42	50,0 %
Saône-et-Loire	15	22	68,2 %
Vendée	12	49	24,5 %
TOTAL	191	440	43,4 %

0~5 - CRYPTOSPORIDIUM PARVUM : ÉPIDÉMIOLOGIE

En France, la recherche des oocystes de *C. parvum* n'est pas systématiquement réalisée. Jusqu'en 1978, avant le développement de méthodes coprologiques^m, le diagnostic de cryptosporidiose intestinale était porté à l'examen biologique de biopsies intestinales. De plus, les symptômes de la cryptosporidiose ressemblant à ceux d'une gastro-entérite, seule leur persistance conduit à effectuer les analyses de détection des oocystes de *C. parvum*. On trouve, malgré tout, quelques études françaises. Entre avril et mai 1987, durant une épidémie de gastro-entérite dans une garderie d'enfant d'un hôpital parisien, l'analyse des selles de 53 enfants âgés de 18 à 36 mois a révélé la présence d'oocystes de *C. parvum* chez 11 d'entre eux (21 %) [BRETAGNE *et al.*, 1990]. VILLARD *et al.* (1992) ont déterminé la présence de *C. parvum* chez 235 enfants (133 de moins de 5 ans et 102 de 5 à 10 ans) à l'hôpital de Strasbourg (d'octobre 1989 à janvier 1990), soit une incidence de la cryptosporidiose dans la population pédiatrique étudiée de 2,1 %, soit 5 enfants dont deux âgés de 5 mois, un de 1 an, un de 3 ans et le dernier de 7 ans.

Le mode de contamination le plus fréquent est lié à l'ingestion d'eau de boisson ou de baignade. MINNIEFIELD (1997) estime que 43 millions des américains (*i.e.* : plus de 15 % de la population)

boivent de l'eau qui contient au moins à un moment de l'année des oocystes de *C. parvum* et que 60 000 à 1,5 millions d'américains (soit moins de 0,5 % de la population) sont victimes de la cryptosporidiose d'origine hydrique chaque année. D'autres modes de transmission plus marginaux ont été décrits. En effet, quelques épidémies non directement reliées à l'eau ont été rapportées. Deux épidémies de cryptosporidiose ont été observées en 1996 aux États-Unis, liées à la consommation de cidre non pasteurisé [Anonyme, 1997b]. En 1997 à l'hôpital de Spokane (Washington, USA), il a été identifié des oocystes de *C. parvum* sur 8 des 10 selles analysées chez un groupe de personnes ayant dîné 10 jours auparavant dans un restaurant. Dans ce cas, la contamination était due à la nourriture [Anonyme, 1998a]. En 1995, une épidémie de cryptosporidiose a touché 43 enfants et 4 encadrants après une semaine de vacances dans une ferme en Angleterre [EVANS & GARDNER, 1996].

De nombreuses épidémies d'origine hydrique liées à des activités récréatives ont également été rapportées. Ces activités regroupent la fréquentation de piscines, de parcs d'attraction aquatique, de lacs, de rivières, ... KRAMMER *et al.* (1998) ont rapporté la première épidémie importante de cryptosporidiose associée à des activités récréatives au niveau d'un lac du New-Jersey durant l'été 1994. Ils ont identifié des oocystes de *C. parvum* chez 38 des 185 personnes surveillées. L'épidémie a duré 4 semaines et a infecté un nombre estimé de 2 070 personnes. FAYER *et al.* (2000) ont dénombré 29 épidémies de cryptosporidiose liées à des activités récréatives jusqu'en 1999, ayant, au total, infecté un nombre estimé d'environ 10 180 personnes. Mais, la majorité des épidémies rapportées est d'origine hydrique liée à l'eau de boisson. Le Tableau 0~X et le Tableau 0~XI récapitulent les principales épidémies rapportées de 1985 à 1999.

Tableau 0~X : Principales épidémies de cryptosporidiose liées à la consommation d'eau potable issues d'eaux souterraines

Année	Localisation	Traitement de l'eau	Origine de la contamination	Population exposée / Infectée
1984	Braun Station, Texas (USA) [D'ANTONIO <i>et al.</i> , 1985]	Chloration	Infiltration d'eaux usées	5 900 / 47 (0,8 %)
1986	Sheffield (GB) [RUSH <i>et al.</i> , 1987]	Chloration	Fortes pluies, glissement de terrain	? / 104
1991	Berks Country, Pennsylvania (USA) [MOORE <i>et al.</i> , 1993]	?	Défaillances du traitement des eaux d'un puits	? / 551
1992-1993	Warrington (GB) [BRIGMAN <i>et al.</i> , 1995]	?	Forte pluie exceptionnelle, infiltration d'oocystes de fèces de bétail dans la nappe	? / 44
1994	Walla Walla Country, Washington (USA) [DWORKIN <i>et al.</i> , 1996]	Chloration	Rupture d'une canalisation d'eaux usées	227 / 116 (51 %)
1996	Ogose (Japon) [Anonyme, 1996a]	?	Contamination d'eau souterraine non-filtrée	? / > 9 000
1997	Nord de la Tamise (GB) [Anonyme, 1997a]	Filtration	Contamination d'un forage	? / 345

Tableau 0~XI : Principales épidémies de cryptosporidiose liées à la consommation d'eau potable issues d'eaux de surface

Année	Localisation	Traitement de l'eau	Origine de la contamination	Population exposée / Infectée
1987	Carrolton, Georgia (USA) [HAYES <i>et al.</i> , 1989]	Floculation, filtration sur sable, chloration	Procédures défectueuses de floculation et de nettoyage des filtres	64 900 / 12 960 (20 %)
1988	Ayshire (GB) [SMITH <i>et al.</i> , 1989]	Filtration, chloration	Infiltrations d'eaux usées	24 000 / 27 (0,1 %)
1989	Swindon/Oxfordshire (GB) [RICHARDSON <i>et al.</i> , 1991]	Floculation, filtration, chloration	Fortes pluies, débordement de la capacité de traitement de la station (?)	741 092 / 516 (0,07 %) (majorité d'enfants)
1990	Loch Lomond (GB) [BARER & WRIGHT, 1990]	?	Défaillances du traitement des eaux du Loch	? / 442
1989 1990	Île de Thanet (GB) [JOSEPH <i>et al.</i> , 1991]	Floculation, filtration, chloration	Fortes pluies, panne mécanique dans la station de traitement	177 300 / 65 (0,04 %)(1989) 177 300 / 77 (0,04 %)(1990)
1991	Sud de Londres (GB) [MAGUIRE <i>et al.</i> , 1995]	?	Aucune défaillance du système de traitement n'a été observée	? / 44
1992	Jackson Country, Oregon (USA) [LELAND <i>et al.</i> , 1993]	Filtration	Défaillances du traitement	? / 15 000
1992	Bradfort (GB) [ATHERTON <i>et al.</i> , 1995]	?	Fortes pluies	? / 125
1993	Milwaukee, Wisconsin (USA) [MAC KENZIE <i>et al.</i> , 1994]	Floculation, filtration sur sable, chloration	Contamination du lac Michigan : fortes pluies, fonte des neiges, eaux usées, bétail (?)	1 610 000 / 403 000 (25 %) (104 morts)
1994	Las Vegas, Nevada (USA) [ROEFER <i>et al.</i> , 1996]	Floculation, filtration, chloration	Aucune défaillance du système de traitement n'a été observée	? / 100 (19 morts)
1994	Kanagawa (Japon) [KUROKI <i>et al.</i> , 1996]	?	Défaillance accidentelle du système de drainage des eaux usées	? / 461
1995	Nord de l'Italie [Anonyme, 1998b]	?	Contamination des réservoirs d'eau potables	? / 294
1996	Kelowna, Colombie-Britannique (Canada) [Anonyme, 1996b]	?	Contamination de l'eau non-filtrée d'un lac	? / ~ 14 500
1996	Cranbrook, Colombie-Britannique (Canada) [Anonyme, 1996c]	?	Contamination de l'eau non-filtrée d'un réservoir	? / ~ 9 000
1999	Nord-Est de l'Angleterre (GB) [Anonyme, 1999]	?	Contamination d'eau de surface non-filtrée	? / ~ 360

La population infectée lors des épidémies de Milwaukee et de Las Vegas est égale à 403 000 et 100 personnes respectivement. En effet la concentration en oocystes était plus importante lors de l'épidémie de Milwaukee et, plus la concentration est importante, plus le pourcentage de population infectée est élevé. Pourtant, le taux de mortalité des personnes infectées a été plus important à Las Vegas avec 19 %, pour seulement 0,025 % lors de l'épidémie de Milwaukee. Or, du fait de la faible concentration en oocystes, c'est essentiellement la population la plus sensible (*i.e.*, les individus immunodéprimés) qui a développé la maladie lors de l'épidémie de Las Vegas, avec donc un risque de mortalité plus important. En effet, ROSE (1997) a montré que l'épidémie provoquée par *C. parvum* à Las Vegas a entraîné une mortalité chez les personnes immunodéprimées infectées équivalente à celle de Milwaukee, égale à 68 % et 52 % respectivement.

Sur l'ensemble des épidémies recensées (Tableau 0~X et Tableau 0~XI), sept ont été associées à une défaillance du traitement des eaux. Ceci met en évidence que la potabilité de l'eau ne peut pas être assurée en permanence par des techniques de désinfection, mêmes si celles-ci sont efficaces. En effet, une défaillance accidentelle est toujours possible, malgré les sécurités qui peuvent exister. Il est donc d'autant plus important de se placer en amont et de protéger la ressource en eau de toute contamination, ce qui est l'objectif des périmètres de protection.

En outre, la source en oocystes responsable de la contamination des eaux a été déterminée pour cinq épidémies (3 liées aux eaux souterraines et 2 liées aux eaux de surface) et pour quatre d'entre-elles, la source provenait d'eaux usées. Cette observation corrobore celle sur les génotypes (§ 0~3.1), à savoir que la majorité des infections humaines libère des oocystes de génotype 1, strictement humain [WIDMER *et al.*, 1998 ; MCLAUHLIN *et al.*, 2000]. Mais elle montre aussi l'importance d'une délimitation correcte des périmètres de protection afin de minimiser les risques de contamination par des oocystes de *C. parvum* et donc de protéger de façon optimale la ressource en eau.

0~6 - DE LA PROTECTION DES RESSOURCES EN EAU AUX ESSAIS EN LABORATOIRE

Il apparaît donc que pour protéger au mieux les ressources en eau, il est fondamental de délimiter correctement les périmètres de protection. Par conséquent, il est donc important de déterminer les caractéristiques du transport des oocystes de *C. parvum* dans les aquifères. On trouve différents essais correspondants à cet objectif dans la littérature.

La démarche logique consisterait à déterminer ces caractéristiques *in situ*, afin de se placer dans les conditions réelles. Il est cependant difficilement envisageable d'injecter des oocystes viables dans les aquifères. Il est par contre possible de les injecter morts. WALKER & MONTEMAGNO (1999) ont, cependant, montré que, concernant l'adsorption, les oocystes morts ne se comportent pas comme les oocystes viables. Une seconde solution est de remplacer les oocystes par d'autres particules.

GOLLNITZ *et al.* (1997) ont réalisé une étude hydrogéologique locale sur un champ captant en se focalisant sur son pouvoir de filtration. Au vu de leurs similitudes géométriques (forme, taille, ...), ils ont choisi d'assimiler le comportement des oocystes de *C. parvum* à celui de certaines algues unicellulaires. Ils ont alors déterminé le pouvoir filtrant de l'aquifère en comparant la concentration de ces algues dans l'eau de surface et dans le captage. Ils ont alors conclu sur le traitement à appliquer à l'eau issue de cet aquifère, en fonction de l'importance du pouvoir filtrant ainsi déterminé. Leurs conclusions nous semblent néanmoins discutables, étant donné que ces algues ne peuvent pas avoir les mêmes caractéristiques que les oocystes, notamment en ce qui concerne le pouvoir de déformabilité ou la charge de surface qui régit la répulsion électrostatique.

HARVEY *et al.* (1995) ont injecté au niveau d'un puits d'un champ captant des protozoaires flagellés et des microsphères carboxylées de tailles similaires. Ils ont conclu qu'il y avait des similitudes sur le comportement en terme de transport entre les flagellés et les microsphères. Ils ont alors supposé que l'utilisation de microsphères carboxylées est pertinente pour l'étude du transport de kystes de protozoaires, puisqu'ils ne présentent pas de mobilité propre. Cependant, MINNIEFIELD (1997) a comparé le comportement, lors d'essais en colonne, d'oocystes et de microsphères (chargées ou non chargées). Les microsphères chargées présentaient des caractéristiques assez similaires aux oocystes (hydrophobicité, potentiel de membrane). Ces essais en colonne (14 cm de longueur et 5 cm de diamètre), réalisés avec différents sables aux granulométries proches de 1 mm, ont montré que les microsphères ont le même comportement que les oocystes dans un milieu homogène tel qu'un sable siliceux. Mais, dès que l'essai est réalisé avec des sables hétérogènes tant sur leur nature que sur leur granulométrie, les résultats sont moins probants. Il a avancé l'hypothèse de propriétés de surface extracellulaires des oocystes qui favorisent la rétention des oocystes en milieux riches en minéraux.

Un aquifère étant hétérogène, aussi bien au niveau de la lithologie^m que de la granulométrie, l'utilisation de microsphères pour étudier le comportement des oocystes *in situ* ne semble pas, par conséquent, pertinente. On peut de même critiquer l'assimilation du comportement des oocystes de *C. parvum* à d'autres micro-organismes non pathogènes, les caractéristiques de ces derniers pouvant être similaires à celles des oocystes, mais pas identiques.

Il semble donc préférable de déterminer les caractéristiques du transport des oocystes de *C. parvum* à l'aide d'essais en laboratoire. Bien que les résultats obtenus ne puissent pas être identiques à ceux *in situ* du fait des problèmes d'échelle, ils permettent néanmoins de comprendre, ou au moins de qualifier, les phénomènes du transport. Ainsi, WALKER & STEDINGER (1999) ont réalisé un modèle spécifique aux eaux de surfaces sur le bassin versant d'un réservoir en eau potable, en se basant sur des résultats d'essais en laboratoire concernant par exemple la lixiviation des fèces, la dégradation naturelle des oocystes, ... De plus, un autre avantage des études en laboratoire est qu'elles permettent de reproduire des situations exceptionnelles. En effet, il apparaît parmi les épidémies recensées au paragraphe précédent (§ 0~5, Tableau 0~X et Tableau 0~XI), que six épidémies sont liées à de fortes pluies, donc à des conditions particulières d'écoulement des eaux. Ces conditions peuvent être simulées avec un modèle comme celui de WALKER & STEDINGER (1999) en particulier.

Dans la bibliographie, des essais divers et variés sont proposés pour l'étude du transport des micro-organismes dans les milieux poreux. Cependant, la plupart concernent les bactéries ou les virus et peu se sont intéressés aux protozoaires. Il convient donc de faire un choix sur le type d'essais à mener, en fonction notamment des objectifs fixés, en s'appuyant sur les travaux déjà réalisés sur le transport des oocystes de *C. parvum*.

MAWDSLEY *et al.* (1996a) ont réalisé une étude sur le transport vertical des oocystes de *C. parvum* au sein de trois types de sol (un sol sableux, un sol limoneux et un sol argileux) en utilisant un simulateur de pluie. Les échantillons utilisés sont des cylindres (35 cm de long et 15 cm de diamètre) de sol non remanié avec la végétation intacte. L'expérience a duré 21 jours après l'inoculation de 10^8 oocystes à la surface des cylindres. Des oocystes sont détectés, bien qu'en faible quantité, dans la solution en bout de cylindre avec des sols argileux et limoneux, mais pas avec un sol sableux. L'hypothèse avancée est la présence de macropores dans les sols argileux et limoneux favorisant l'écoulement de la suspension en oocystes à travers le milieu. A la fin de l'essai, les cylindres ont été détruits pour établir la localisation des oocystes. La distribution des oocystes retrouvés dans les colonnes est similaire dans les trois cylindres. La majorité (environ 73 %) est située dans les deux premiers centimètres, puis la quantité décroît lorsque la profondeur augmente : environ 13 % à 10 cm de profondeur, environ 8, % à 20 cm de profondeur et environ 5 % à 30 cm de profondeur. Néanmoins, ils retrouvent 3 à 9 fois plus d'oocystes dans le sol limoneux. Les hypothèses alors avancées sont une destruction possible des oocystes au sein des sols grâce à des mécanismes de prédation ou de dégradation, ou à une différence de pouvoir d'adsorption (les limons sembleraient adsorber plus).

ALBRECHT (1996) a réalisé des essais sur des blocs de sols (180 cm de haut, 175 cm de longueur et 80 cm de largeur) avec un simulateur de pluie. Deux types de sols ont été utilisés : un sol limono-argileux et un sol contenant du sable fin. Plus la percolation d'eau a été élevée, plus les oocystes se sont infiltrés. Il a trouvé que 100 fois plus d'oocystes étaient retenus dans la colonne sableuse que dans la colonne limono-argileuse. Dans ce cas aussi l'hypothèse avancée est celle de la présence de macropores (en l'occurrence des galeries de lombrics). Il a également réalisé ses essais avec le sol sableux remanié, à savoir pulvérisé et recompacté. Il a récupéré en bout de colonne 26 % d'oocystes en plus que dans le cas de la colonne de sol sableux intact.

MAWDSLEY *et al.* (1996b) ont aussi étudié le comportement de *C. parvum* dans des conditions dynamiques bi-dimensionnelles à l'aide d'une table vibrante. Les essais ont été effectués sur trois blocs de sol (80 cm de long, 56 cm de large et 20 cm de profondeur) avec la végétation intacte et inclinés à 7,5 %. La composition du sol est la suivante : 12,3 % de sable, 54,5 % de limon et 33,2 % d'argile. Ils ont inoculé 5×10^9 oocystes sur le côté le plus élevé, puis ils ont simulé une irrigation pendant 70 jours. Les oocystes ont été recherchés dans les eaux de ruissellement, de percolation et dans les sols. Des oocystes ont été trouvés dans les eaux de ruissellement pendant au moins 21 jours et dans un cas après 70 jours. De même, des oocystes ont été retrouvés dans les eaux de percolation pendant les 70 jours de l'expérience sur les trois blocs, avec des valeurs moyennes d'environ 8×10^6 oocystes le premier jour jusqu'à environ 2×10^4 oocystes à la fin de l'expérience. L'essai terminé, les blocs ont été détruits pour établir la localisation des oocystes. La majorité est située

dans les six premiers centimètres de profondeur. Aucun oocyste n'a été retrouvé dans le sol au-delà d'une distance de 70 cm par rapport au point d'inoculation.

MINNIEFIELD (1997) a effectué des essais en colonne (14 cm de longueur et 5 cm de diamètre) avec des vitesses d'écoulement différentes et avec deux types de sols sableux dont la granulométrie est comprise entre 0,5 et 0,71 mm : un sable composé de quartz (sable Illinois) et des sédiments composés d'un mélange de minéraux (sable Kildare). Il a utilisé ces derniers sous deux formes : traité (*i.e.* : dont on a supprimé les oxydes de fer et la matière organique) et non traité. Il a trouvé que le taux de récupération des oocystes en bout de colonne était plus important avec le sable Kildare traité qu'avec ce même sable non traité (respectivement 8 % et 2 % pour une vitesse de 37,7 m/j). Cependant, la majorité des oocystes était retenue dans la colonne dans les deux cas. Ce résultat montre l'importance des sites potentiels de fixation, le sable non-traité retenant davantage d'oocystes. Il n'a obtenu qu'une très faible rétention (il a retrouvé plus de 80% en sortie de colonne avec une vitesse de 8 m/j) avec le sable siliceux de l'Illinois. Ce résultat montre l'importance de la présence de minéraux, puisque la rétention dans le sable Kildare, riche en minéraux, est plus importante que dans le sable Illinois, composé de quartz. En outre, il a constaté une baisse de la rétention quand la vitesse d'écoulement augmente.

À la vue de ces études, il apparaît préférable de travailler avec des sols remaniés. En effet, l'interprétation des résultats obtenus avec des sols non remaniés est très délicate, notamment à cause de la méconnaissance de la structure du sol. Ainsi, dans les essais réalisés par MAWDSLEY *et al.* (1996a) et ALBRECHT (1996), les oocystes sont davantage retenus dans des sols sableux que dans des sols argileux, alors que les sables sont beaucoup plus perméables que les argiles. Cette contradiction a été expliquée dans ces études par la présence supposée de macropores, dues, par exemple, à des galeries de lombrics.

Avec des sols remaniés, l'étude de la percolation avec un simulateur de pluie ou du ruissellement sur une table vibrante ne semble pas pertinente. En effet, les mécanismes d'infiltration dépendent fortement de la structure des sols. Par conséquent, nous avons choisi d'étudier le transport des oocystes en milieu poreux saturé, ce qui correspond à l'étude du transport dans les eaux souterraines. On se place alors dans la situation où les oocystes sont déjà présents dans les aquifères, en excluant la recherche des mécanismes de leur infiltration à travers les sols. Cette position est vraisemblable puisque des études ont montré la présence d'oocystes dans les eaux souterraines (§ 0~4.3a). Dans ce cas, l'essai qui semble le plus adapté à l'étude du transport dans un milieu poreux remanié et saturé est l'essai en colonne.

Cependant, ce type d'essai ne permet pas de différencier les différents phénomènes de rétention, notamment les effets de l'adsorption et de la filtration. C'est pourquoi il nous a semblé pertinent de réaliser préalablement aux essais en colonne une étude spécifique des mécanismes de l'adsorption des oocystes. Cette recherche peut être réalisée avec des essais en réacteurs fermés, type essai batch, *i.e.* : en condition statique. C'est ce type d'essai que MEDEMA *et al.* (1998) ont utilisé pour adsorber les oocystes de *C. parvum* (§ 2~2.1).

Notre recherche des phénomènes de transport des oocystes de *C. parvum* se déroulera donc en deux phases : l'étude des mécanismes d'adsorption en condition statique avec des essais batch, puis l'étude des processus généraux du transport en condition dynamique dans un milieu poreux remanié et saturé avec des essais en colonne. Ces derniers bénéficieront alors des résultats des essais batch afin de différencier, éventuellement, les phénomènes de rétention.

0~7 - CONCLUSION

C. parvum, parasite très résistant, à faible dose minimale infectante et qui présente une forte cinétique d'excrétion, induit chez l'homme la cryptosporidiose, pathologie à pronostic sombre lorsqu'elle se développe chez des personnes immunodéprimées. Ce parasite est couramment présent dans les eaux de surface. Par infiltration dans les nappes et/ou par les fréquents échanges entre les nappes et les rivières, il se retrouve aussi dans les eaux souterraines. Les épidémies de cryptosporidiose montrent que leur origine est le plus souvent liées à la contamination de la ressource en eau potable. En outre, face aux exigences de Santé Publique, il ne doit y avoir aucun micro-organisme pathogène dans l'eau de consommation humaine. Concernant les oocystes de *C. parvum*, cet impératif ne peut pas être assuré par des techniques de traitements des eaux, celles-ci n'étant pas efficaces et, de toute façon, sujettes à la défaillance accidentelle. Il est donc important de se placer en amont et de protéger la ressource en eau. En France, la législation impose la délimitation de périmètres de protection autour des ressources en eau potable afin d'interdire toute contamination. Or, la difficulté majeure est de déterminer correctement ces périmètres, *i.e.* : de les dimensionner de façon à minimiser les risques de détérioration de la ressource sans surestimer les coûts. Il est donc important de comprendre les phénomènes de transport de ce micro-organisme dans les aquifères, ce qu'il est préférable de faire au laboratoire, étant donné, en particulier, son caractère pathogène. Ainsi, la première tâche consiste en la mise au point des techniques qui emploient les suspensions en oocystes afin qu'elles soient en accord avec les impératifs de notre étude, notamment titrer avec une précision convenable les suspensions en oocystes.

CHAPITRE 1

TECHNIQUES DE PURIFICATION ET DE TITRAGE : CHOIX ET DÉVELOPPEMENT DE PROTOCOLES ADAPTÉS

RÉSUMÉ

Les oocystes de *C. parvum* étant contenus dans les fèces, il importe donc de les isoler des autres substances, afin de limiter les interférences possibles lors des essais en laboratoire : c'est l'étape de purification. L'autre étape importante est celle de la détermination des concentrations des suspensions en oocystes, qui doit être adaptée à nos besoins, notamment en terme de précision : c'est l'étape de titrage. Concernant la purification, les fèces, conservées dans une solution de bichromate de potassium, sont envoyées par l'INRA de Tours au laboratoire de Bactériologie-Parasitologie de la Faculté de Pharmacie de Nancy qui réalise la purification. La technique que nous avons choisie est celle dite de « gradient / flottation ». Parmi les protocoles disponibles, nous en avons sélectionné un simple à mettre en œuvre et qui présente une efficacité convenable. Concernant le titrage, en fonction des impératifs de notre étude, cette technique doit principalement être précise et simple d'utilisation. Nous avons alors modifié le protocole classique d'immunofluorescence, afin qu'il corresponde à nos exigences. Nous avons pu ainsi mettre en évidence une grande reproductibilité des numérations, ainsi qu'un rendement important et la robustesse de notre protocole d'immunofluorescence.

**C'est avec la logique que nous prouvons
et avec l'intuition que nous trouvons.**

Henri POINCARÉ (1854-1912),
mathématicien français.

1~1 - INTRODUCTION

La réalisation d'essais en laboratoire, pour l'étude du transport des oocystes de *C. parvum* au sein d'un milieu poreux saturé, exige le choix judicieux des techniques expérimentales durant lesquelles les suspensions en oocystes sont utilisées. En effet, ces techniques doivent être en accord avec les impératifs de ce type d'étude. Les suspensions en oocystes sont employées uniquement lors des dilutions, des concentrations, des purifications et des titrages. Concernant les dilutions et les concentrations, il n'y a pas de choix particulier à faire ; elles exigent seulement l'utilisation convenable d'appareils pour mesurer précisément les volumes (*e.g.* : micropipettes, fioles jaugées, ...), pour homogénéiser les solutions (*e.g.* : agitateur secoueur de type Vortex, table à agitation rotative, ...) et pour centrifuger. Par contre, il y a un choix à faire concernant la purification, dont dépend la turbidité de la suspension en oocystes, donc les interférences possibles lors des essais en laboratoire. En effet, certains éléments pourraient modifier le comportement des oocystes au sein du milieu poreux. Le choix le plus capital concerne la technique de titrage des suspensions en oocystes. Les résultats des essais en laboratoire ne sont rien d'autre que les titrages des échantillons prélevés et c'est donc à partir des résultats de ces titrages que les essais seront interprétés. Par conséquent, les conclusions de notre étude dépendant étroitement de la technique de titrage, cette dernière doit être judicieusement choisie.

1~2 - TECHNIQUE DE PURIFICATION DES FÈCES

Le but de la purification est d'obtenir à partir de fèces une suspension enrichie en oocystes. Il existe plusieurs techniques de purification (*e.g.* : la séparation immunomagnétique). La plus adaptée à partir d'échantillons de fèces est la technique de « gradient / flottation ».

1~2.1 - Obtention des fèces

Les fèces contenant des oocystes de *C. parvum* proviennent de veaux nouveau-nés qui sont artificiellement contaminés via l'administration d'oocystes avec le lait. La souche d'oocystes utilisée pour cette contamination artificielle a été récupérée à partir de selles humaines (en 1982) et est régulièrement entretenue par des passages successifs sur des jeunes veaux. Les fèces sont ensuite diluées avec de l'eau désionisée et homogénéisées, puis tamisées plusieurs fois afin d'éliminer toutes les particules ayant un diamètre supérieur à 125 μm . La suspension alors obtenue est centrifugée et le culot est remis en suspension dans une solution à 2,5 % de bichromate de potassium, ce dernier servant d'oxydant. Toutes ces étapes sont réalisées à l'INRA de Tours.

1~2.2 - Protocole de « gradient / flottation » utilisé

C'est le laboratoire de Bactériologie-Parasitologie de la Faculté de Pharmacie de Nancy qui réalise la purification. Parmi les protocoles de « gradient / flottation » disponibles appliqués aux oo-

cystes de *C. parvum*, nous avons sélectionné celui décrit par WEBER *et al.* (1992) (Figure 1~1). Il s'avère, en effet, qu'il est simple à mettre en œuvre et présente une efficacité convenable.

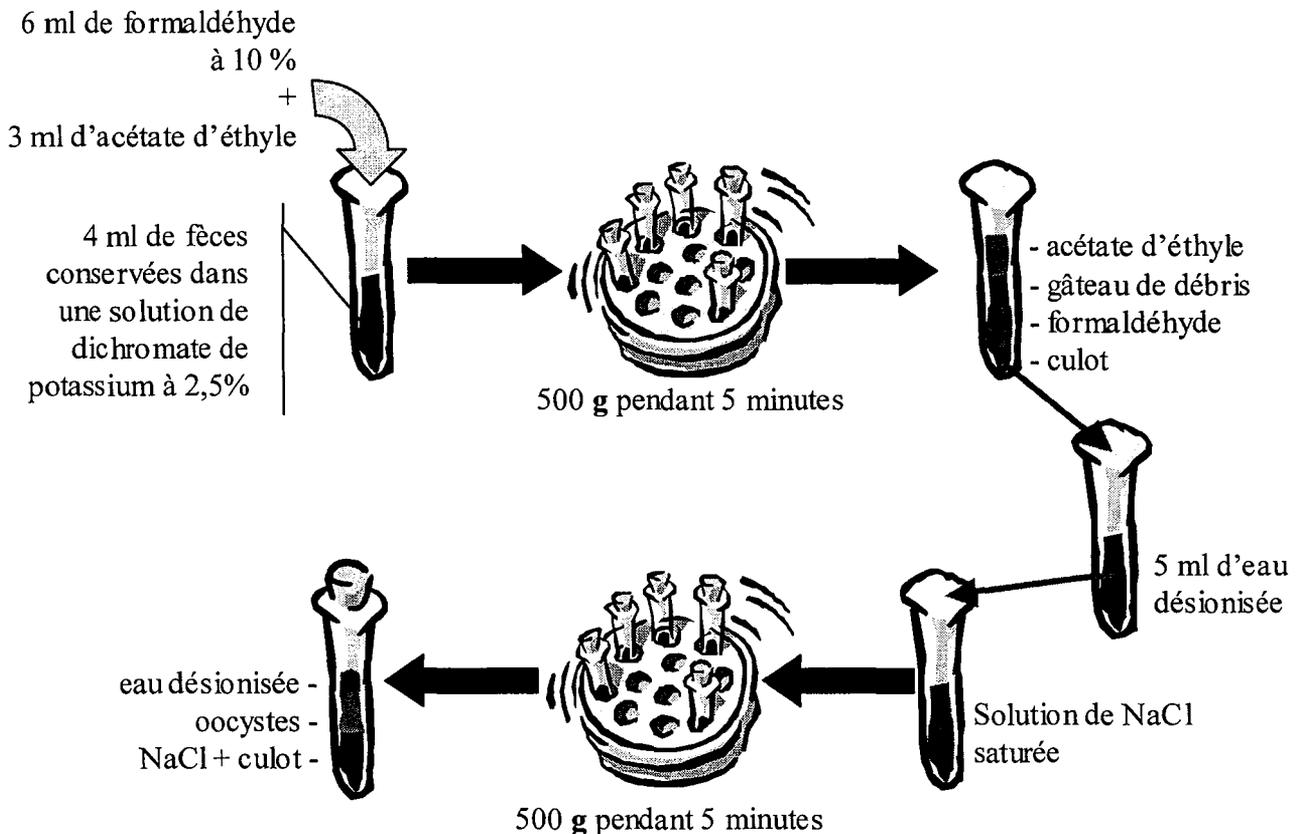


Figure 1~1 : Technique de purification par gradient/flottation (d'après WEBER *et al.*, 1992)

La première étape du protocole de WEBER *et al.* (1992) consiste à séparer les différents composants en fonction de leurs caractères hydrophiles et hydrophobes. Ainsi, dans un tube de 15 ml, on réalise une solution contenant 4 ml de fèces conservées dans une solution de bichromate de potassium à 2,5 %, 6 ml de formaldéhyde à 10 % et 3 ml d'acétate d'éthyle. La solution est vortexée vigoureusement pendant 30 s, puis centrifugée à 500 g pendant 5 min. On obtient alors deux phases (Figure 1~1) :

- dans la partie supérieure du tube, l'acétate d'éthyle avec les composés hydrophobes formant un gâteau de débris à la base de cette phase,
- dans la partie inférieure du tube, le formaldéhyde avec les composés hydrophiles formant le culot.

Les oocystes étant présents dans le culot, les trois couches supérieures sont supprimées par aspiration.

La deuxième étape du protocole de WEBER *et al.* (1992) consiste à isoler les oocystes avec une flottation au NaCl. Ainsi, le culot est remis en suspension dans 5 ml d'eau désionisée, puis cette suspension est déposée très délicatement à la surface d'une solution de NaCl saturée (densité = 1,2).

Enfin, la solution est centrifugée à 500 g pendant 10 minutes. On observe alors trois couches (Figure 1~1) :

- l'eau désionisée avec des débris,
- l'interface avec les oocystes,
- le chlorure de sodium avec le culot.

Pour récupérer les oocystes, 4 ml du surnageant sont éliminés, puis un volume de 0,5 à 1 ml qui correspond à l'interface est récupéré ainsi que 0,5 ml de la solution de NaCl (juste en dessous de l'interface).

La troisième étape du protocole de WEBER *et al.* (1992) consiste à laver les oocystes avec de l'eau désionisée pour éliminer le chlorure de sodium. Ainsi, la suspension précédemment collectionnée dans un tube de 15 ml est lavée avec environ 13 ml d'eau désionisée puis centrifugée à 500 g pendant 10 minutes. Les oocystes sont alors récupérés dans le culot.

1~3 - DÉVELOPPEMENT DE LA TECHNIQUE DE TITRAGE DES SUSPENSIONS

Dans l'optique d'une modélisation, l'étude du transport de *C. parvum* nécessite la détermination précise de la concentration en oocystes. En outre, la technique de mesure doit être simple à utiliser (même par un non-microbiologiste).

1~3.1 - Choix de la technique de titrage

Les trois principales techniques de mesure sont l'immunofluorescence, la cytométrie en flux et la PCR (Polymerase Chain Reaction) :

- L'immunofluorescence (IFA) consiste à fixer sur la paroi des oocystes des anticorps^m préalablement marqués. Le dénombrement se réalise ensuite par microscope optique.
- La cytométrie en flux permet la mesure en ligne d'une concentration. Les caractéristiques de la cellule à rechercher sont préenregistrées. La solution à titrer passe devant un laser qui décompte les particules au fur et à mesure [COMPAGNON *et al.* 1997 ; BENNETT *et al.*, 1999].
- La PCR utilise les connaissances du génie génétique. Cette méthode est basée sur la détection de l'acide nucléique par des techniques d'hybridation et d'amplification [JOHNSON *et al.*, 1995].

Ces trois méthodes présentent des avantages et des inconvénients résumés dans le Tableau 1~I.

Concernant l'immunofluorescence, les deux critiques essentielles sont la longue durée de l'analyse et la faible précision du titrage. Cependant, cette technique est celle préconisée par les différentes normes [Environmental Protection Agency, 1995 ; AFNOR (NF T90-455), 2001]. En outre, le temps d'analyse peut être réduit par l'utilisation d'un laser (ChemScan) ou d'un analyseur d'images.

Tableau 1~I : Avantages et inconvénients des trois techniques de titrages de *Cryptosporidium parvum*
(d'après VESEY *et al.*, 1991 ; VESEY *et al.*, 1993 ; JOHNSON *et al.*, 1995)

	Coût	Durée	Précision	Technicité	Simplicité
Immunofluorescence	Économique	Longue et laborieuse	Peu précise	Matériel commun	Très simple
Cytométrie en flux	Très onéreuse	Rapide	Précise	Exige un très bonne définition des paramètres de la cellule recherchée	Simple dans sa mise en œuvre
PCR	Cher	Rapide	Précise et spécifique	Exige des compétences en génie génétique	Délicate

Concernant la cytométrie en flux, l'étalonnage de l'appareil est délicat. Ainsi, une contamination des eaux potables par *C. parvum* a été déclarée à Sydney en Australie en 1998 [CLANCY, 2001]. Il s'est en fait avéré qu'il n'y avait pas de contamination, mais seulement une erreur d'étalonnage du cytomètre en flux. Le titrage avait donc pris en compte des particules qui n'étaient pas des oocystes de *C. parvum*. Il est d'ailleurs grandement recommandé de réaliser une confirmation visuelle par IFA suite à un titrage par cytométrie en flux, afin de vérifier que les particules comptées sont bien des oocystes de *C. parvum*.

Concernant la PCR, la PCR quantitative n'est pas encore parfaitement au point. En outre, elle est excessivement délicate à mettre en œuvre.

Par conséquent, la technique de mesures retenue est l'immunofluorescence car c'est celle qui s'adapte le mieux aux exigences des expériences menées. Économique et simple d'utilisation, l'immunofluorescence a tout de même pour défaut principal sa faible précision. C'est pourquoi, notre objectif a été de développer un protocole d'immunofluorescence visant à améliorer la précision du titrage pour des solutions dopées en oocystes.

1~3.2 - Description du protocole d'immunofluorescence modifié

En se basant sur le protocole classique d'immunofluorescence, nous avons listé toutes les étapes susceptibles d'avoir une influence sur la précision du titrage. Ensuite, nous avons cherché à améliorer ces points afin d'augmenter la précision. La mise au point de ce protocole ainsi que son évaluation (§ 1~3.3) ont été réalisées en collaboration avec le Laboratoire de Bactériologie - Parasitologie de la Faculté de Pharmacie de Nancy [CHESNOT *et al.*, soumis].

a) Choix du matériel

Nous avons choisi d'utiliser des membranes de filtration associées à une filtration sous vide.

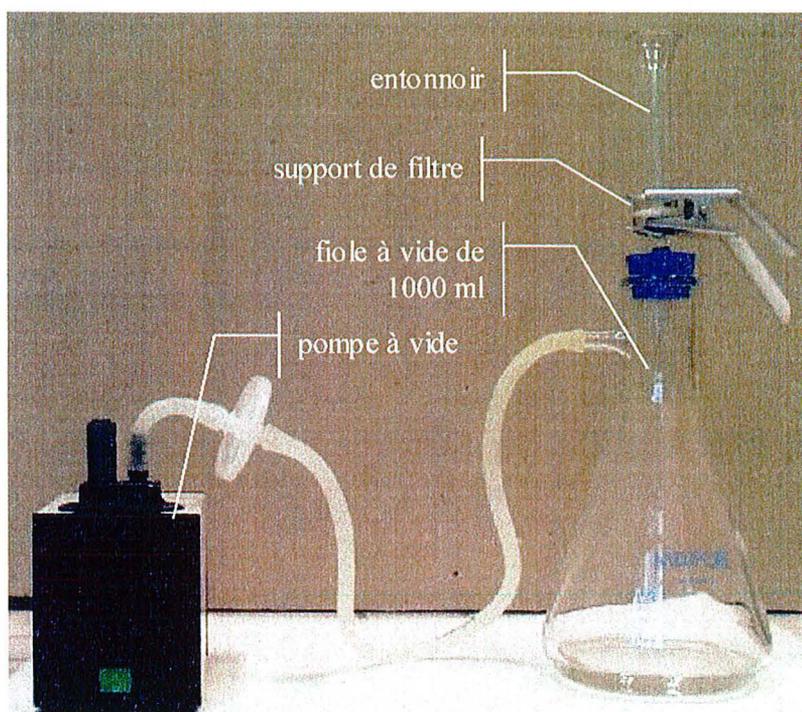


Figure 1~2 : Photo du matériel de l'unité de filtration sous-vide

Notre unité de filtration sous vide se compose de (Figure 1~2) :

- une fiolle à vide de 1000 ml (Millipore Corp., Bedford, UK),
- un entonnoir et un support de filtre pour filtration sous-vide en verre fritté pour filtre de diamètre 26 mm (Millipore Corp., Bedford, UK),
- une pompe à vide Millivac (Millipore Corp., Bedford, UK),

Le choix des membranes de filtration est évidemment fondamental. La filtration est réalisée à travers une membrane en polycarbonate de $0,8 \mu\text{m}$ de diamètre de pore (Osmonics Inc., Minnesota, USA) (Figure 1~3a). En effet, il a été observé que les oocystes de *C. parvum* possèdent un haut pouvoir de déformabilité (§ 0~3.3) : ils peuvent passer à travers des systèmes de filtration frontale de pores de 1 à $3 \mu\text{m}$ [DROZD, 1996]. De plus, afin d'éviter des fuites entre la membrane et le support en verre fritté, nous avons rajouté sous la membrane en polycarbonate une pré-membrane de $5 \mu\text{m}$ de diamètre de pore (Durapore®, Millipore Corp., Bedford, UK) (Figure 1~3b).

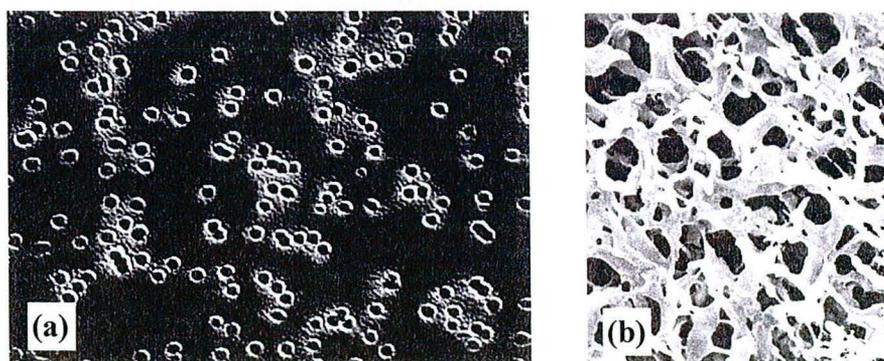


Figure 1~3 : Aspect des membranes de filtration en M.E.B.

a) Membrane en polycarbonate ($0,8 \mu\text{m}$)

b) Membrane en fluorure de polyvinyldène ($5,0 \mu\text{m}$)

(Source : catalogue Fisher Scientific-LABOSI sur CD-ROM)

b) Marquage fluorescent

Le marquage fluorescent est réalisé en solution afin de permettre aux anticorps un accès optimum aux sites de fixations sur toute la surface des oocystes (VESEY *et al.*, 1994 ; SHYPHERD & WYN-JONES, 1995).

Une solution d'anticorps monoclonaux^m (Crypto-A-Glo, Waterborne Inc., New Orleans, Louisiana, USA) marqués avec de l'isothiocyanate de fluoroscéine (FITC) est diluée au $1/20$ (V/V) avec une solution tampon (10 % NGS et 1 % BSA dans du PBS - "Phosphate-Buffered Saline", pH = 7.4). Après avoir bien vortexé l'échantillon, un prélèvement de 100 μ l est effectué et mis dans un microtube de 1,5 ml, auquel est ajouté 40 μ l de la solution d'anticorps.

Comme tout processus biologique, le marquage par les anticorps sur les oocystes possède un optimum de rendement. Le marquage, en effet, semble plus efficace à la température de 37,0 °C, comme nous avons pu le remarquer au cours de nos expériences. Quant au temps d'incubation, nous avons observé qu'un temps de 30 minutes était suffisant et nécessaire pour marquer l'ensemble des oocystes (Tableau 1~II).

Tableau 1~II : Importance du temps d'incubation à 37,0 °C

Temps d'incubation (min)	Valeur mesurée en oocystes pour 100 μ l	CV* (%) Par rapport à la valeur théorique : 500 oocystes
25	373	21 %
30	519	3 %
45	477	3 %
60	508	1 %

* : coefficient de variation (écart type / moyenne)

Nous avons alors choisi d'incuber les microtubes pendant 35 minutes à 37,0 °C. Les anticorps, spécifiques des oocystes de *C. parvum*, se fixent donc sur leur paroi, ce qui permettra leur reconnaissance lors de l'observation au microscope (Figure 1~4).

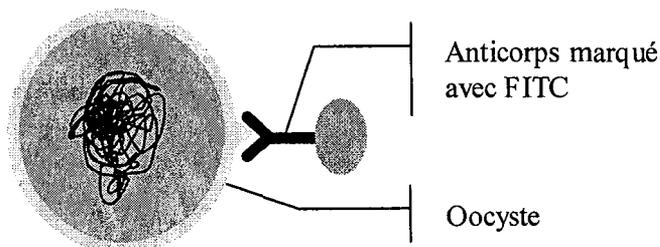


Figure 1~4 : Marquage fluorescent (liaison anticorps – oocystes)

c) Filtration et montage de la lame

La filtration de l'échantillon est réalisée à l'aide du matériel décrit précédemment (§ 1~3.2a). La pompe à vide est mise en route avant la mise en place des membranes, afin que la dépression dans la fiole à vide aide au positionnement des membranes. Ceci évite en particulier de plisser les mem-

branes. L'échantillon marqué, auquel est ajouté 860 μl de tampon HBSS (Hank's balanced salts solution, $\text{pH} = 7,4$) pour obtenir un volume de 1 ml, est filtré (Figure 1~5).

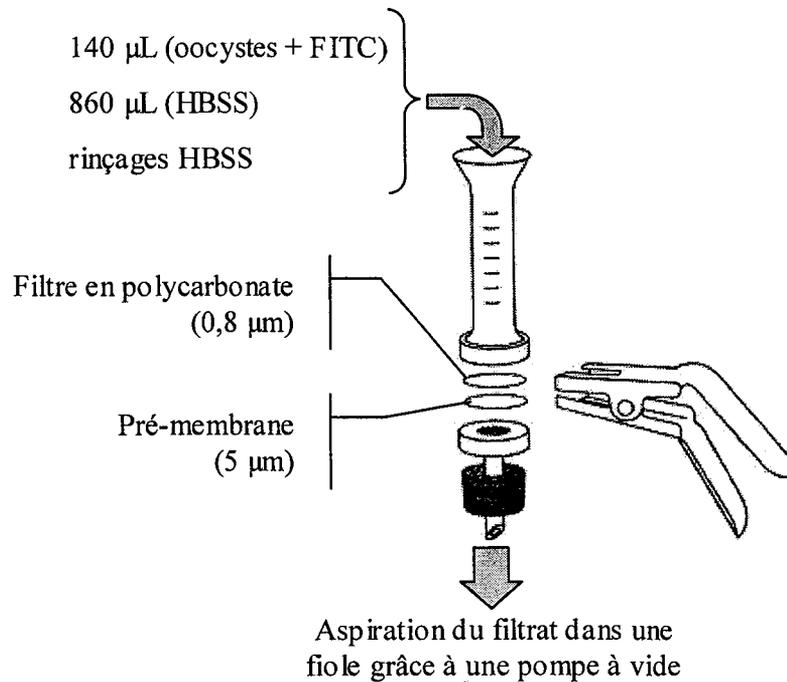


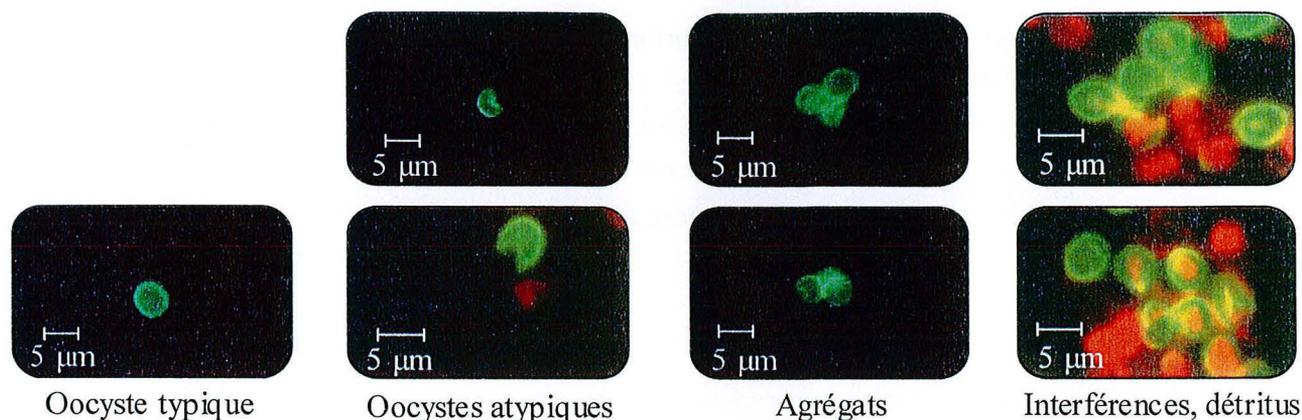
Figure 1~5 : Schéma de la filtration sous-vide

Après la filtration de l'échantillon, l'entonnoir est rincé deux fois avec 5 ml de tampon HBSS afin d'éliminer l'excès d'anticorps. En outre, la valeur du pH du tampon HBSS permet d'obtenir un maximum de fluorescence. L'entonnoir est alors délicatement retiré en faisant pivoter sur un bord et en maintenant la dépression dans la fiole à vide. La membrane en polycarbonate est retirée et placée sur une lame de montage. Une goutte de milieu de montage (35 μl) est mise au centre de la membrane. Ce milieu de montage est composé de 2 % de 1,4-diazabicyclo[2.2.2]octane (DABCO) (Aldrich Chemical Co., Milwaukee, Wis.) dans du glycérol. La membrane est couverte par une lamelle et les bords sont scellés avec un vernis transparent.

d) Comptage au microscope

L'ensemble de la lamelle est analysé au grossissement $\times 400$ avec un microscope équipé d'une lampe au mercure et d'un filtre à FITC (longueur d'onde entre 450 et 490 nm). Les objets sphériques ou ovoïdes, entre 4 et 6 μm de diamètre, émettant une lumière fluorescente de couleur vert pomme avec des bords beaucoup plus lumineux sont identifiés comme étant des oocystes de *C. parvum*. Suite à nos premiers essais, nous avons choisi de compter trois lames différentes pour chaque échantillon. Le résultat définitif est la moyenne des trois mesures.

C'est cette étape qui est la plus consommatrice en temps. De plus, seule la compétence de l'observateur permet d'obtenir une précision lors de cette étape. En effet, l'observateur doit être capable de reconnaître les oocystes et de les différencier d'éventuels détritiques (algues, particules, ...) marqués eux aussi (Figure 1~6).



Source : photographies prises par T. CHESNOT (Laboratoire de Bactériologie - Parasitologie de la Faculté de Pharmacie de Nancy).

Figure 1~6 : Oocystes marqués par immunofluorescence

1~3.3 - Évaluation du protocole d'immunofluorescence modifié

Nous avons évalué trois points de notre protocole d'immunofluorescence :

- la reproductibilité des dénombrements,
- le rendement,
- la robustesse.

a) Reproductibilité des dénombrements

La reproductibilité des dénombrements a été déterminée avec 10 énumérations réalisées pour 5 dilutions. Deux opérateurs ont préparé et compté indépendamment 5 lames pour chaque dilution testée. Les 5 dénombrements de chaque opérateur ont été ensuite rassemblés pour former les groupes de 10 dénombrements.

La précision des groupes de 10 dénombrements a été déterminée par le calcul du coefficient de variation (CV), qui quantifie les dispersions autour de la moyenne [LINDQUIST *et al.*, 1999]. Le coefficient de variation est calculé en divisant l'écart type d'un groupe de dénombrements par leur moyenne et est exprimé en pourcentage. La précision a aussi été estimée en calculant la différence de chaque dénombrement par rapport à la valeur moyenne du groupe de 10 dénombrements, pour chaque dilution. Afin d'obtenir une valeur sans dimension, qui pourra alors également être exprimée en pourcentage, la différence a été divisée par la valeur moyenne (divergence).

Nous avons tracé le coefficient de variation et la divergence par rapport à la valeur moyenne des groupes de 10 dénombrements des 5 dilutions en fonction de la concentration moyenne (Figure 1~7). Nous avons ensuite tracé une enveloppe, déterminée selon un tracé symétrique basé sur la valeur maximale de la divergence pour chaque série.

Les résultats obtenus montrent que pour des concentrations allant de 1 000 oocystes /ml à 10 000 oocystes /ml, les coefficients de variation vont de 5 % à 9 %. Le coefficient de variation est égal à 15 % pour une concentration de 400 oocystes/ml et à 27 % pour une concentration de 200 oocys-

tes/ml. Ces valeurs de coefficients de variation sont cohérentes avec celles trouvées par LE CHEVALLIER *et al.* (1995) et COMPAGNON *et al.* (1997). LE CHEVALLIER *et al.* (1995) ont titré des suspensions stock par immunofluorescence (55 analyses) et ils ont obtenu des valeurs de coefficients de variation allant de 3,0 % à 25 %, avec une moyenne de 15,5 %. COMPAGNON *et al.* (1997) ont obtenu un coefficient de variation de 19 % pour des titrages réalisés par IFA.

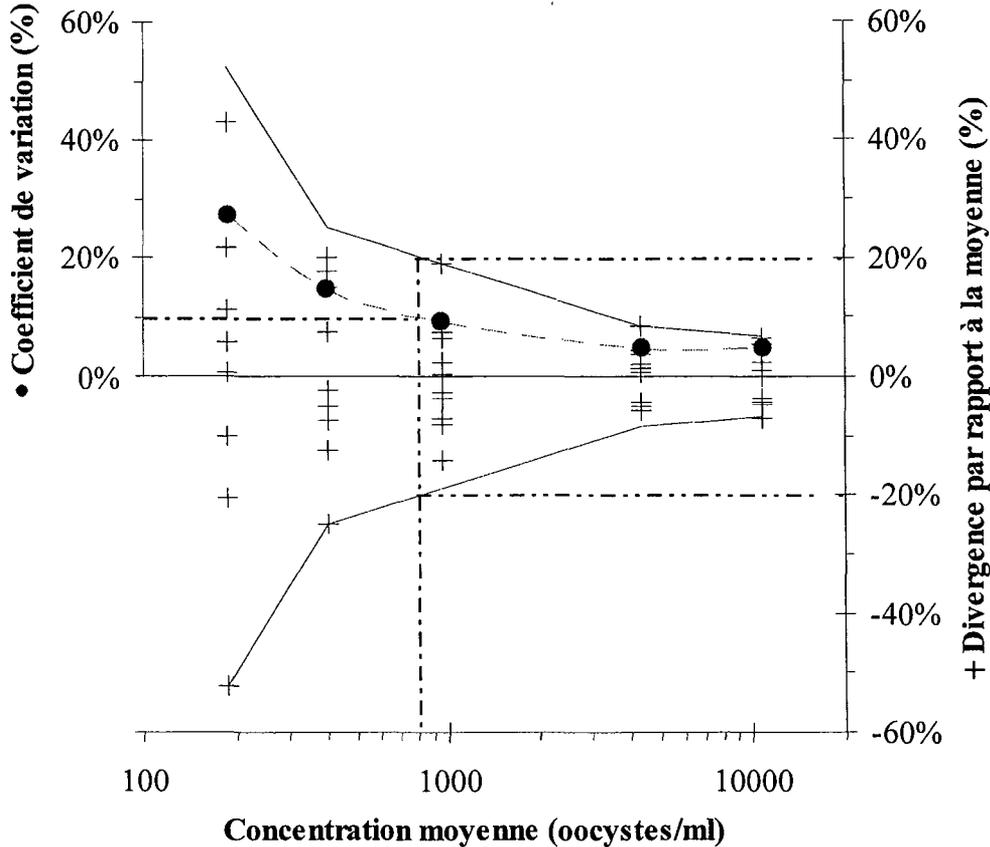


Figure 1~7 : Coefficient de variation et divergence par rapport à la moyenne des 5 groupes de dénombrements en fonction de la concentration moyenne
(le CV est représenté par des cercles pleins rouges et la divergence par rapport à la moyenne par des croix)

BENNETT *et al.* (1999) ont comparé la variation inhérente aux techniques de titrage, en utilisant le coefficient de variation comme outil de comparaison. Ils ont titré plusieurs suspensions en oocystes purifiées avec des concentrations comprises entre 100 et 100 000 oocystes/ml. Ils ont titré tous leurs échantillons 20 fois, en utilisant 5 techniques différentes : l'hématocytométrie^m, l'IFA avec des lames à puits, les cellules de comptage (contraste interférentiel de phase ou DIC^m), une méthode basée sur un compteur de cellule et la cytométrie en flux. Ils ont montré que le degré de précision de chaque technique de titrage est lié à la concentration en oocystes de l'échantillon dénombré. Plus la concentration est petite, plus la divergence par rapport à la moyenne est importante et plus la valeur du coefficient de variation est grande. Nos résultats sont en accords avec ceux de BENNETT *et al.* (1999) (Figure 1~7). En outre, BENNETT *et al.* (1999) ont fixé le domaine d'application des techniques de titrage comme l'intervalle de concentration permettant d'obtenir un coefficient de variation inférieur à 10 %. Cette limite de 10 % n'est pas atteinte pour l'IFA dans leurs travaux et la limite inférieure du domaine d'application est déterminée par extrapolation. Ils ont donc estimé qu'un coefficient de variation de 10 % devrait être atteint par IFA pour une concentration de 8 681 oocys-

tes/ml. Bien que cette limite de 10 % soit fixée sans justification dans leurs travaux, nos résultats montrent que cette limite est pertinente. En effet, pour un coefficient de variation égal ou inférieur à 10 %, la divergence par rapport à la moyenne n'excède pas 20 % (Figure 1~7 : lignes horizontales discontinues de droite), condition satisfaisant à un haut degré de précision. Si le coefficient de variation excède 10 %, la divergence par rapport à la valeur moyenne augmente très rapidement et les dénombrements d'un même échantillon sont moins précis.

Pour notre protocole, un coefficient de variation de 10 % (Figure 1~7 : ligne horizontale discontinue de gauche) est obtenu pour une concentration d'environ 800 oocystes/ml (Figure 1~7 : ligne verticale discontinue), ce qui par conséquent constitue la limite inférieure du domaine d'application de notre protocole. En outre, bien que théoriquement le coefficient de variation soit toujours inférieur à 10 % si la concentration est supérieure à 800 oocystes/ml, nous avons pu nous rendre compte que le nombre maximum d'oocystes qui peuvent être visuellement comptés sur les membranes est de 2 000 oocystes. Par conséquent, le domaine d'application du protocole d'immunofluorescence que nous avons développé est compris entre 800 et 20 000 oocystes/ml.

b) Robustesse

Nous avons évalué la robustesse de notre protocole en comparant les résultats obtenus par deux opérateurs de deux laboratoires différents. Pour chaque suspension diluée, nous avons tracé la concentration moyenne déterminée avec les 5 dénombrements de premier opérateur, en fonction de la concentration moyenne déterminée avec les 5 dénombrements de second opérateur (Figure 1~8).

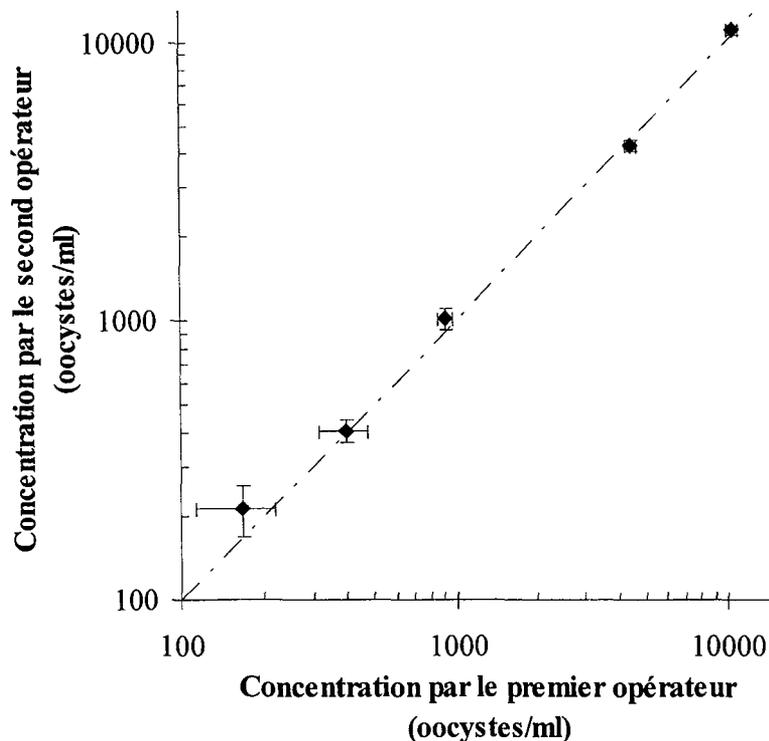


Figure 1~8 : Comparaison entre la concentration moyenne des groupes de 5 dénombrements obtenus par les deux opérateurs

(les barres d'erreur représentent les écarts types des groupes de 5 dénombrements, celles horizontales pour le premier opérateur et celles verticales pour le second)

Les barres d'erreur représentent les écarts types des groupes de 5 dénombrements, celles horizontales pour le premier opérateur et celles verticales pour le second. La première bissectrice a été tracée afin de montrer la concordance entre les résultats des deux opérateurs. La première bissectrice passe dans la zone définie par les barres d'erreur. Par conséquent, des résultats fortement similaires ont été obtenus par les deux opérateurs, travaillant dans deux laboratoires différents, ce qui traduit la robustesse du protocole d'immunofluorescence que nous avons modifié.

c) Rendement

Le rendement a été déterminé à partir du titrage de 12 suspensions en oocystes calibrées (échantillons EasySeed). Les échantillons EasySeed (Biotechnology Frontiers Pty Ltd, Australia) contiennent 99 oocystes dans 0,5 ml de solution, avec un écart type indiqué égal à 1,4. Pour le marquage des échantillons EasySeed, nous avons ajouté 200 μ l de la dilution de travail en anticorps, afin de maintenir la même proportion utilisée pour les dilutions en oocystes (40% V/V). Le rendement est défini par le rapport des dénombrements obtenus avec notre protocole d'immunofluorescence sur le nombre fourni avec les échantillons EasySeed. Le rendement moyen a été trouvé égal à 96,3 %, avec une énumération minimale de 88 oocystes, une maximale de 100 oocystes et un coefficient de variation de 3,5 % (Tableau 1~III).

Tableau 1~III : Résultats des dénombrements des 12 échantillons EasySeed

Dénombrement (oocystes)	100	91	93	96	95	96	97	88	97	95	99	97
Rendement (%)	101	92	93	97	96	97	98	89	98	96	100	98

La haute performance (96,3 %, nombre d'échantillons = 12) et la stabilité (CV = 3,5 %) dans les expériences de rendement montrent que les pertes en oocystes sont très faibles. Le nombre d'oocystes comptés avec notre protocole d'immunofluorescence est donc fiable, *i.e.* : très proche de la concentration réelle en oocystes de la suspension testée. Cependant, bien que le nombre d'oocystes comptés soit proche de la valeur de référence, il faut garder à l'esprit que le titrage n'est pas forcément exact du fait de l'inégale répartition des oocystes à l'intérieur des suspensions [BUKHARI & SMITH, 1995 ; DROZD & SCHWARTZBROD, 1996].

d) « Extension » du domaine d'application

Si, après un premier titrage, la concentration en oocystes est en dehors du domaine d'application de notre protocole, une dilution ou une concentration par centrifugation peut être réalisée afin d'obtenir une concentration en oocystes à l'intérieur de ce domaine. Les dénombrements d'un même échantillon pourront alors être obtenus avec un haut degré de précision. Cependant, un questionnement se justifie sur les éventuelles influences de ces opérations sur la précision du protocole d'immunofluorescence que nous avons développé.

• Effet de la concentration par centrifugation

La principale limite pour la concentration par centrifugation est le volume initial de la suspension, qui doit être suffisant pour atteindre une concentration en oocystes à l'intérieur du domaine d'application. Nous avons évalué l'effet sur le titrage de la concentration par centrifugation. Des échantillons de 0,5 ml de la suspension en oocystes la plus diluée ont été centrifugés à 3 000 g pendant 10 minutes. Le surnageant a été retiré (400 μ l) et le culot a été remis en suspension dans les 100 μ l restants, puis marqué. Ceci correspond donc à une concentration par un facteur de 5. Les divergences des dénombrements par rapport à la valeur moyenne ont été trouvées inférieures à 20 % après la concentration par centrifugation, alors que les résultats de la suspension en oocystes la plus diluée avaient montré des divergences atteignant les 40 %. Le coefficient de variation décroît également, de 27 % sans centrifugation à 10 % avec centrifugation. Ces résultats montrent, par conséquent, qu'une concentration par centrifugation d'une suspension permet d'obtenir une concentration en oocystes à l'intérieur du domaine d'application, augmentant alors significativement la précision des dénombrements de la suspension sans effet secondaire négatif. Il est donc possible d'obtenir avec un haut degré de précision les dénombrements d'un échantillon ayant une faible concentration en oocystes.

• Effet de la dilution

Pour étudier l'effet de la dilution sur la précision des dénombrements d'une suspension, nous avons estimé le nombre d'oocystes présents dans la même suspension stock en oocystes à partir des concentrations moyennes de 5 suspensions obtenues par dilution de cette même suspension stock. L'estimation de la concentration de la suspension stock initiale a été tracée en fonction de la concentration moyenne des dénombrements des suspensions diluées (Figure 1~9). Les facteurs de dilution correspondants ont également été indiqués en abscisse. Le degré d'exactitude de la concentration estimée de la suspension stock initiale est donné par l'intervalle de confiance de 99 % déterminé avec les groupes de 10 dénombrements et représenté par des barres d'erreur. La variabilité des 5 titrages obtenus est déterminée par le calcul du coefficient de variation qui est tracé sur le même graphique (Figure 1~9).

Il apparaît que le coefficient de variation dépend du facteur de dilution. Pour plusieurs dilutions réalisées à partir d'une même suspension stock en oocystes, plus le facteur de dilution appliqué est important, plus le coefficient de variation des dénombrements augmente, ce qui implique une diminution de la précision. Cependant, si les dilutions sont réalisées afin d'obtenir des concentrations en oocystes à l'intérieur du domaine d'application du protocole, alors les titrages sont obtenus avec des coefficients de variation inférieurs à 10 %. Par conséquent, la dilution de la suspension stock peut être utilisée pour permettre de réaliser les titrages à l'intérieur de l'intervalle de concentrations le plus approprié, assurant un haut niveau de reproductibilité.

En outre, nous avons obtenu des estimations similaires de la concentration de la suspension stock initiale, à partir des cinq groupes de 10 dénombrements. Les valeurs sont comprises entre $4,07 \times 10^6$ et $4,36 \times 10^6$ oocystes/ml. Par conséquent, l'erreur due à l'inégale répartition des oocystes à l'intérieur des suspensions peut être palliée par un nombre conséquent d'énumérations (phénomène statistique). L'augmentation du nombre de dénombrements induit une estimation exacte de la

concentration en oocystes. En outre, plus la précision est importante, plus l'intervalle de confiance est faible. Donc, pour un même nombre de dénombrements, l'intervalle de confiance décroît quand la précision augmente. Par conséquent, le titrage est plus proche de la valeur réelle pour une suspension en oocystes dont la concentration est à l'intérieur du domaine d'application de notre protocole.

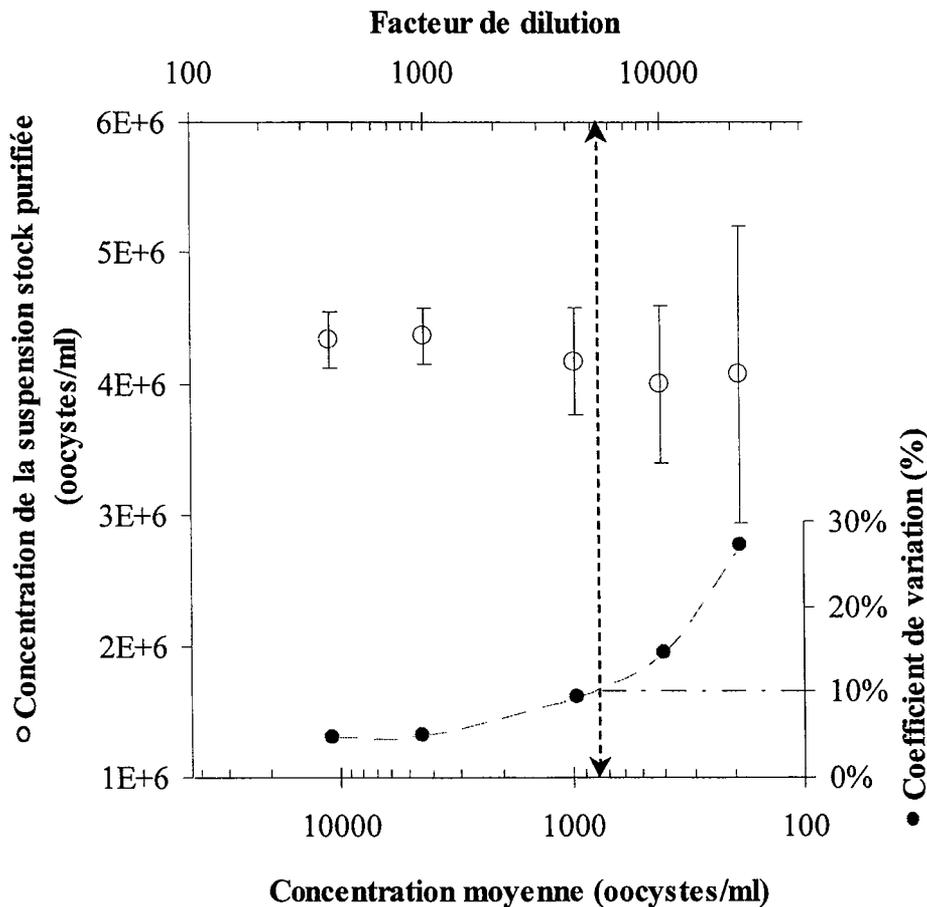


Figure 1-9 : Concentration de la suspension stock initiale et coefficient de variation en fonction de la concentration moyenne des suspensions diluées et du facteur de dilution
(la concentration de la suspension stock initiale est représentée par des cercles vides et le CV par des cercles pleins, et les barres d'erreur indiquent l'intervalle de confiance de 99 %)

1-4- CONCLUSION

Le protocole d'immunofluorescence que nous avons développé permet donc le titrage précis de suspensions purifiées en oocystes. Il est relativement simple à mettre en œuvre, robuste, et possède un rendement important, le seul inconvénient de la méthode reste que le titrage est long. L'étude proprement dite du transport des oocystes de *C. parvum* peut alors débuter. Il est intéressant d'étudier d'abord uniquement l'adsorption des oocystes sur des minéraux avec des essais batch, *i.e.* : en conditions statiques. Ainsi, la séparation des phénomènes permettra une meilleure interprétation des résultats. Avant de réaliser ces essais, il faut choisir convenablement les minéraux sur lesquels seront étudiés l'adsorption des oocystes de *C. parvum* et définir le protocole expérimental des essais batch.

CHAPITRE 2

ESSAIS BATCH : ÉTUDE DE L'ADSORPTION

RÉSUMÉ

La réalisation des essais pour l'étude de l'adsorption des oocystes de *C. parvum* exige tout d'abord le choix du milieu poreux, puis la mise au point d'un protocole expérimental. Les substrats utilisés correspondent à l'ensemble des principaux minéraux (silice, calcite, feldspath, mica), ainsi que les principaux types d'argiles (kaolinite, illite et montmorillonite) et un minerai d'aluminium, la bauxite. Le protocole expérimental utilisé pour l'étude de l'adsorption des oocystes est celui des essais batch : une suspension en oocystes est mise dans un tube contenant un milieu poreux, puis ce tube est agité par retournement. L'évolution de la quantité d'oocystes adsorbés sur le substrat en fonction du temps est suivie. Après avoir déterminé le volume de suspension en oocystes introduit et sa concentration, la masse de sable et la vitesse de rotation, des essais batch ont été réalisés avec les différents substrats. Le titrage des échantillons des premiers essais a révélé que le protocole d'immunofluorescence classiquement employé ne permettait pas d'obtenir des résultats adaptés à nos besoins (en terme de précision). Ainsi, au fur et à mesure de la poursuite des essais batch, le protocole d'immunofluorescence a été modifié, en s'appuyant sur les titrages obtenus. Nous avons donc été obligés de mener plusieurs fois les essais batch, afin de comparer les résultats obtenus avant et après des modifications du protocole d'immunofluorescence présenté dans le chapitre précédent. Il résulte de l'ensemble des essais qu'aucun mécanisme d'adsorption n'a pu être mis en évidence, quelle que soit la matrice solide utilisée (silice, calcite, feldspath, mica, kaolinite, illite, montmorillonite et alumine).

**Laboratoire. Même quand on ne trouve rien,
on renifle l'odeur de la vérité qui se cache.**

Jean ROSTAND (1894-1977),
biologiste et écrivain français.

Extrait de *Carnet d'un biologiste* (1959).

2~1 - INTRODUCTION

La rétention des oocystes dans un milieu poreux saturé peut être due à de nombreux phénomènes se déroulant simultanément. Ainsi, lors d'un essai en colonne, il n'est pas évident de différencier correctement la part de chacun d'eux. C'est pourquoi nous avons choisi de mener une étude spécifique sur l'adsorption des oocystes avec des essais batch. Ces essais consistent à placer une suspension en oocystes dans un tube contenant un milieu poreux et de suivre l'évolution de la quantité d'oocystes adsorbés sur le substrat en fonction du temps. Bien que ce type d'essais présente d'importantes différences avec les essais en colonne (condition statique, rapport de la masse de milieu poreux sur le volume de solution beaucoup plus faible, ...), les résultats obtenus peuvent permettre de déterminer les mécanismes de l'adsorption. Ainsi, il est alors envisageable de différencier les phénomènes de rétention dans les résultats des essais en colonne. Afin d'interpréter convenablement les essais batch, il est important de bien comprendre les mécanismes de l'adsorption, d'autant plus que ces derniers peuvent être décrits à différentes échelles, induisant la précision de l'interprétation. En outre, nous avons choisi de travailler avec des sols remaniés. Il est difficilement envisageable d'étudier l'adsorption sur tous les sols existants. Cependant, nous pouvons utiliser comme substrat les principales familles minérales. Ainsi, le choix des substrats d'études est important. Il doit être fait afin de recouvrir les principales lithologies, mais aussi en tenant compte des résultats trouvés dans la littérature. Une fois ces choix faits et le protocole d'essai batch mis au point, les essais peuvent être menés et leurs résultats interprétés.

2~2 - MÉCANISMES DE L'ADSORPTION DES OOCYSTES

En se basant sur leur taille (§ 0~3.3), les oocystes de *C. parvum* peuvent être assimilés à des colloïdes biologiques, comme l'ont fait, par ailleurs, HARTER *et al.* (2000) dans leurs travaux. La définition d'un colloïde est donnée dans l'Encadré 1.

Encadré 1 : La définition d'un colloïde

Le terme de colloïde est apparu pour la première fois en 1861 avec GRAHAM qui distingua les solutions colloïdales des solutions moléculaires par leur différence de vitesse de diffusion à travers une membrane poreuse. Une suspension colloïdale a alors été définie comme une phase dispersée, distribuée de façon homogène, sous forme finement divisée dans un milieu dispersant. Selon la très officielle INTERNATIONAL UNION FOR PURE AND APPLIED CHEMISTRY, l'état de subdivision est tel que les molécules ou les particules polymoléculaires ont au moins dans une direction une dimension comprise entre 1 nm et 1 µm environ. Il n'est pas nécessaire que les trois dimensions de l'espace soient dans cette gamme de taille (des fibres et des films minces peuvent aussi être classés comme colloïdes).

L'adsorption correspond à la fixation des oocystes sur la matrice poreuse. On peut distinguer plusieurs échelles d'observation et d'interprétation des mécanismes de l'adsorption correspondant à différentes analyses scientifiques.

2~2.1 - Échelle métrique : analyse mécaniste

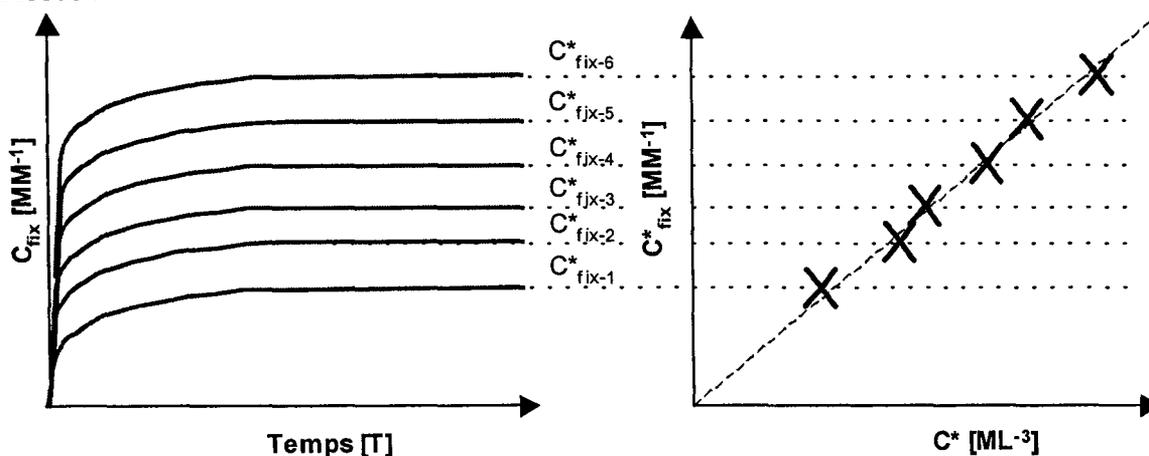
À l'échelle du mètre, il s'agit de la description de ce que l'on observe durant l'expérience, sans interprétation des mécanismes. Lors d'un essai, batch ou en colonne, on place dans un réacteur un milieu poreux et des particules en suspension. On obtient ainsi une cinétique d'adsorption qui correspond à l'évolution de la quantité de particules adsorbées sur le substrat en fonction du temps. En conséquence, la cinétique d'adsorption permet de déterminer le temps nécessaire à l'établissement de tous les équilibres physico-chimiques liés à l'adsorption.

MEDEMA *et al.* (1998) ont déterminé des cinétiques d'adsorption avec des oocystes de *C. parvum* en utilisant des essais batch. Pour cela, ils ont contaminé artificiellement, avec 3 000 à 6 000 oocystes, 10 ml d'un effluent secondaire de station de traitement d'eaux usées composé en grande majorité (> 99 %) de particules de taille inférieure à 10 μm de diamètre et d'une turbidité de 2,4 NTU. En outre, il contient essentiellement de la matière organique [MEDEMA, communication personnelle]. Une adsorption maximale de 70 % a été obtenue au bout de 24 heures avec agitation ou en 96 heures sans agitation. Ces auteurs ne proposent aucune interprétation de leurs résultats.

À partir des valeurs d'équilibre obtenues pour plusieurs cinétiques d'adsorption réalisées avec des concentrations initiales différentes, on peut estimer une loi de partage. Une explication des lois de partage est présentée dans l'Encadré 2.

Encadré 2 : LES LOIS DE PARTAGE

À partir des valeurs d'équilibre obtenues pour plusieurs cinétiques d'adsorption réalisées avec des concentrations initiales différentes, on peut déterminer la loi de partage, comme le montrent les figures ci-dessous :



Sur la figure ci-dessus sont représentées 6 cinétiques d'adsorption obtenues dans les mêmes conditions expérimentales, excepté la concentration initiale qui est à chaque fois différente (C_{0-1} ; C_{0-2} ; C_{0-3} ; C_{0-4} ; C_{0-5} ; C_{0-6}). Les cinétiques sont tracées dans un graphe ayant en abscisses le temps et en ordonnées la concentration fixée C_{fix} (en masse de particules par masse de substrat).

Sur la figure ci-dessus sont représentés les 6 équilibres des 6 cinétiques de la figure ci-contre, tracés dans un graphe ayant en abscisses la concentration dans le fluide à l'équilibre C^* (en masse de particules par volume de fluide) et en ordonnées la concentration fixée à l'équilibre C^*_{fix} (en masse de particules par masse de substrat). La courbe alors obtenue traduit une loi de partage.

Les lois de partage consistent donc à suivre l'évolution de l'équilibre selon les conditions initiales appliquées au système. Les trois formulations les plus courantes des lois de partage dans le cadre de

l'hypothèse de l'équilibre local sont l'adsorption linéaire, l'adsorption de type Langmuir et l'adsorption de type Freundlich :

Partage linéaire

$$C^*_{\text{fix}} = K_d C^*$$

où C^* est la concentration à l'équilibre de la substance considérée dans la phase mobile [ML^{-3}], C^*_{fix} est la concentration à l'équilibre de la substance considérée fixée [$\text{MM}^{-1}_{\text{solide}}$] et K_d est le coefficient de partage entre phases [$\text{L}^3\text{M}^{-1}_{\text{solide}}$]. C^*_{fix} est alors proportionnelle à C^* .

Partage non-linéaire du type Langmuir

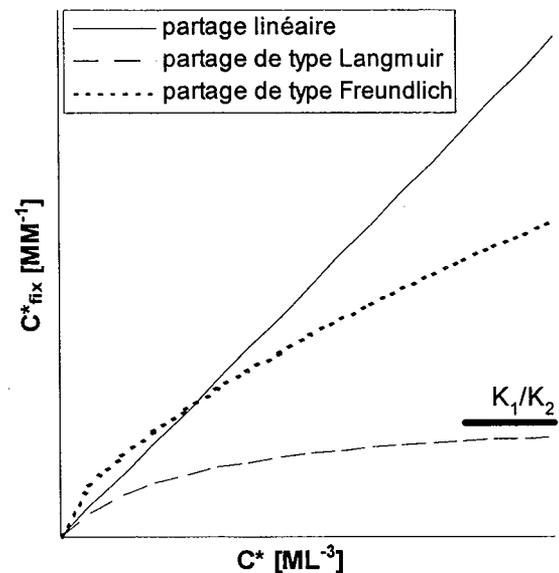
$$C^*_{\text{fix}} = \frac{K_1 C^*}{1 + K_2 C^*}$$

où K_1 [$\text{L}^3\text{M}^{-1}_{\text{solide}}$] et K_2 [L^3M^{-1}] sont les coefficients de la loi de Langmuir, avec C^*_{fix} tendant asymptotiquement vers K_1/K_2 .

Partage non-linéaire du type Freundlich

$$C^*_{\text{fix}} = K_f C^{*n}$$

où K_f [$\text{L}^{3n}\text{M}^{1-n}\text{M}^{-1}_{\text{solide}}$] est le coefficient de partage de la loi de Freundlich et $n > 0$.



Ainsi, l'adsorption d'une particule se traduit à l'échelle de l'expérience par un équilibre de partage des particules entre la surface du solide et la solution. Dans le cas de l'hypothèse de l'équilibre local (H.E.L.), *i.e.* : dans l'hypothèse où les particules en mouvement sont à l'équilibre avec les particules fixées, on trouve, dans la littérature, plusieurs formulations reliant ces concentrations (*i.e.* : des lois de partage). Bien que controversées, les formulations les plus courantes (Encadré 2), de par leur simplicité, peuvent être insérées dans des modèles numériques. Cette échelle correspond donc à celle où sont réalisées les modélisations numériques.

2~2.2- Échelle millimétrique : analyse physico-chimique

À l'échelle du millimètre, on se place au niveau des grains du milieu poreux. Il s'agit essentiellement d'interpréter les mécanismes d'adsorption observés durant l'expérience à partir de la composition et des caractéristiques physico-chimiques du milieu poreux. En effet, ces paramètres assujettissent notamment le nombre et le type de sites de fixation présents à la surface du substrat. Ainsi, l'adsorption peut être limitée par la capacité d'adsorption maximale du milieu poreux, qui dépend de la taille des oocystes et du nombre de sites d'adsorption de la surface solide [BUDDEMEIER & HUNT, 1988]. Ainsi, une adsorption linéaire des particules, présentée dans l'Encadré 2 peut être limitée par une capacité maximale d'adsorption du milieu poreux. Il peut également exister différents sites de fixation à la surface du milieu poreux et l'adsorption peut se faire en plusieurs couches [CASES & VILLIERAS, 1992]. Ceci a une influence sur l'allure des cinétiques d'adsorption. Par exemple, les argiles sont des constituants très importants de l'adsorption dans les sols car ils possèdent une surface d'échange importante, *i.e.* : un grand nombre de sites de fixation potentiels. En outre, les argiles présentent deux types de surfaces, basale et latérale, ce qui peut induire deux types de sites de fixation. Les argiles ont parfois également une capacité d'échange d'ions au niveau de leur espaces interfoliaires.

Enfin, la composition et les caractéristiques physico-chimiques du milieu poreux induisent aussi la physico-chimie du fluide (pH, charge ionique, ...) qui joue un rôle important dans les mécanismes d'adsorption. Ainsi, l'eau, en raison des caractéristiques du milieu poreux, peut se charger en ions et éléments traces qui lui confèrent alors une charge ionique favorisant l'adsorption sur la matrice solide par des forces ioniques. La capacité d'adsorption sur certains minéraux ou colloïdes est, en effet, due à l'existence de charges électriques à la surface et/ou à l'intérieur de ces minéraux [JACKSON, 1981].

MINNIFIELD (1997) a étudié effectué des essais en colonne avec des sédiments composés d'un mélange de minéraux (sable Kildare), qu'il a utilisé sous deux formes : traité (*i.e.* : dont on a supprimé les oxydes métalliques et la matière organique) et non traité (§ 0~6). Il a trouvé que les sédiments traités retenaient davantage les oocystes que les mêmes sédiments non traités, 98,28 % et 91,92 % respectivement. Il a donc conclu de ses expériences que la proportion d'oocystes qui sont fixés dépend des propriétés physiques et chimiques du milieu poreux.. Cependant, cette conclusion est discutable, étant donné, d'une part, la faible différence entre les deux valeurs et, d'autre part, la technique de titrage utilisée. En effet, l'auteur a employé un hématocytomètre^m avec un comptage au microscope optique par contraste interférentiel de phase (DIC). Or, les travaux de BENNETT *et al.* (1999) ont montré la faible précision de cette technique de mesures.

2~2.3 - Échelle micrométrique : analyse microbiologique

À l'échelle du micromètre, on se place au niveau des oocystes. Il s'agit donc d'interpréter les mécanismes d'adsorption observés durant l'expérience à partir des caractéristiques des oocystes, en tenant compte de la composition et des caractéristiques physico-chimiques du milieu poreux. Deux principales caractéristiques des oocystes influencent les mécanismes d'adsorption : l'hydrophobicité et le potentiel zêta.

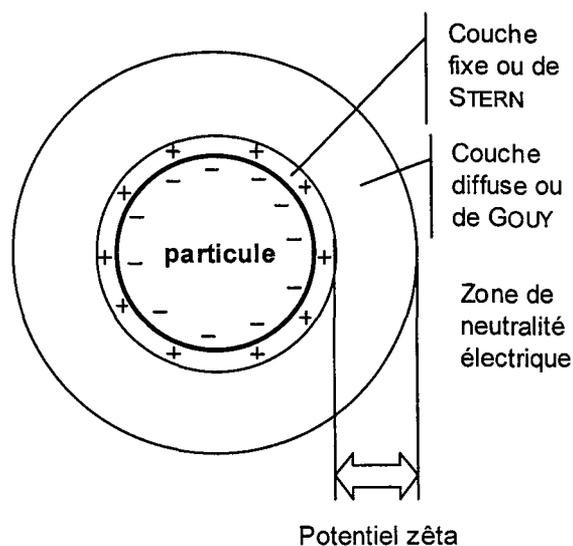
L'hydrophobicité est la propriété de surface des cellules qui est déterminée par leur capacité à se lier aux hydrocarbures ou d'autres composés non polaires en présence ou en absence d'eau. Un micro-organisme hydrophobe aura tendance à s'adsorber sur des composés également hydrophobes comme les grains du milieu poreux, la matière organique ou d'autres cellules hydrophobes (elles peuvent alors former des micelles). Les interactions hydrophobes jouent donc un rôle significatif dans l'adhésion des micro-organismes sur la matrice poreuse. DROZD & SCHWARTZBROD (1996) ont trouvé que les oocystes sont légèrement hydrophobes.

Le potentiel zêta se définit comme le potentiel au niveau du plan de coupure hydrodynamique ou plan de cisaillement entre la partie fixée de la double couche (couche de STERN) et la couche diffuse (couche de GOUY). Ce plan correspondrait au plan externe de HELMHOLTZ. Une explication plus détaillée est fournie dans l'Encadré 3.

Encadré 3 : LE POTENTIEL ZËTA

La charge effective d'une particule colloïdale suspendue dans l'eau peut différer de sa charge réelle de par la présence d'ions en solution, de signe opposé, qui adhèrent plus ou moins fermement à la particule :

- Les ions les plus proches de la particule y sont fortement retenus par attraction électrostatique. Ils constituent la **couche fixe ou adhérente ou couche de STERN**, qui se déplace avec la particule, abaisse sa charge réelle, et forme autour d'elle une sorte d'écran protecteur.
- La concentration de ces ions diminue rapidement quand on s'éloigne de la particule (la force d'attraction varie en effet en $1/r^6$, r représentant la distance au centre de la particule). Il existe donc une deuxième **couche diffuse ou couche de GOUY**, qui n'adhère pas à la particule, mais qui forme un nuage autour d'elle, s'estompe et devient nulle à une certaine distance de la particule. Dans un champ électrique, ces ions, de signe contraire à celui de la particule, sont attirés par cette dernière, mais sont attirés également par le pôle opposé. Cette couche freine donc le mouvement électrophorétique (migration de particules colloïdales à l'intérieur de la solution, sous l'effet d'un champ électrique).



Le **potentiel zêta** correspond au point où commence la couche diffuse, *i.e.* : à l'extérieur de la couche fixe. Ce potentiel est le seul qui importe vraiment : il est dû non pas à la charge réelle, mais à la charge effective de l'ensemble (particule + double couche). C'est cette charge effective (et, par conséquent, le potentiel zêta) qui détermine la mobilité de la particule, ainsi que sa stabilité vis-à-vis de la coalescence (formation d'agglomérats).

Les données bibliographiques concernant le potentiel zêta des oocystes de *C. parvum* sont rares et contradictoires. Ainsi, DROZD & SCHWARTZBROD (1996) indiquent que les oocystes ont un potentiel zêta négatif au pH des eaux naturelles. En outre, ce potentiel diminuerait légèrement en fonction de l'âge des oocystes. Ce résultat est confirmé par les récents travaux de KARAMAN *et al.* (1999) et de CONSIDINE *et al.* (2000). Dans cette optique, des forces électrostatiques peuvent donc apparaître avec une matrice poreuse présentant des charges positives (calcium, fer, aluminium ou oxyde de manganèse, ...). En revanche, BRUSH (1997) indique un potentiel neutre, précisant que la charge négative proviendrait des techniques de purification et de stockage. Par conséquent, les oocystes présents dans l'environnement ne possèderait pas de charge de surface. Dans ces conditions, les forces électrostatiques devraient être négligeables.

WALKER & MONTEMAGNO (1999) ont réalisé des essais en flux laminaire à faible débit au sein de divers substrats de synthèse (oxydes de métaux alumineux et ferreux, silice) avec comme objectif de déterminer l'influence d'un stress extérieur (dessiccation et gel) sur l'adsorption des oocystes de *C. parvum*. Ce stress extérieur a pour conséquence de modifier les caractéristiques des oocystes. Ils ont déterminé que 1,8 % des oocystes sont viables après congélation et 0 % après dessiccation. Le titrage est réalisé par comptage des oocystes sur une grille contenant des mailles de 1 mm sur 1 mm placée sous le flux laminaire, avec un microscope optique par contraste interférentiel de phase (DIC). Ils ont observé une adsorption uniquement sur l'oxyde d'aluminium III (Al_2O_3) et celle-ci est beaucoup plus importante après un stress extérieur (61 % adsorbés après congélation, 43 % adsorbés après dessiccation et 4 % sans stress). Pour expliquer ce phénomène, ils ont émis

l'hypothèse qu'un stress engendre une dénaturation de la paroi et l'apparition de véritables sites de fixation. Ils ont alors conclu que, dans les milieux naturels, la présence d'argiles et de limons enrichis en oxyde d'aluminium aurait une influence favorable sur la fixation des oocystes non infectieux. Cependant, étant donné que les oocystes viables (*i.e.* : n'ayant donc subi aucun stress) ne se sont quasiment pas fixés, ils ont avancé l'hypothèse que les oocystes intacts se comportent comme des colloïdes biologiques sans réel site de fixation.

2~2.4 - Échelle nanométrique : analyse thermodynamique

À l'échelle du nanomètre, on se place au niveau des forces qui interviennent dans l'adsorption. Il s'agit donc d'interpréter les mécanismes d'adsorption observés durant l'expérience à partir des forces d'interactions colloïdales (Encadré 4), en tenant compte de la composition et des caractéristiques physico-chimiques du milieu poreux, ainsi que de celles des oocystes.

Encadré 4 : LES FORCES D'INTERACTIONS COLLOÏDALES

La théorie DLVO (1948) développée par DERJAGUIN, LANDAU, VERVEY ET OVERBEEK distingue trois principales forces d'interactions colloïdales que sont la répulsion de Born, la force de VAN DER WAALS et les forces électrostatiques.

Répulsion de Born

Lorsque deux particules sont très proches l'une de l'autre, ils se créent des interactions moléculaires. Cette répulsion appelée répulsion de Born est due aux chevauchements des orbitales moléculaires respectives des deux particules. C'est une force peu intense et rare dans la mesure où elle n'agit qu'à des distances très faibles (de l'ordre de quelques dizaines de nanomètre).

Force attractive de VAN DER WAALS

La force de VAN DER WAALS est caractérisée par l'énergie d'attraction moléculaire que possède toute particule colloïdale liée à sa charge de surface et à sa composition. Elle est le résultat d'une synchronisation des électrons dans les orbitales atomiques respectives de deux atomes. Pour une certaine distance, la répulsion mutuelle est minimale et une liaison faible peut s'instaurer : c'est l'interaction de VAN DER WAALS. La puissance de cette force est liée à la composition et à la charge du colloïde, mais pas à la composition de la phase liquide. En outre, cette force diminue rapidement lorsque la distance entre les particules augmente.

Attraction et répulsion électrostatiques

Les particules colloïdales présentent des charges de surface. Toute autre particule colloïdale ou non (ion, matrice solide, ...) qui présente une charge de surface de même signe, à son voisinage, subira une répulsion. À l'inverse, si elle présente une charge de signe opposé, elle sera attirée. Ces mécanismes d'attraction et de répulsion électrostatique entraînent l'existence de forces intenses et de longue portée.

Généralement, ce niveau d'interprétation est difficile à réaliser. En outre, le dépôt de particules sur une surface modifie les conditions de capture des particules suivantes, ce qui complique d'autant plus l'inventaire des forces.

CONSIDINE *et al.* (2000) ont mesuré la force d'interaction entre des oocystes de *C. parvum* et de la silice amorphe. Ils ont observé une force de répulsion exponentielle entre la silice et les oocystes, légèrement dépendante du pH et de la force ionique. Ils ont conclu que, malgré cette importante barrière, l'adhésion entre des oocystes et la silice pourrait se produire s'ils rentrent en contact. Cependant, cette adhésion est rendue encore plus ardue par la présence de nombreuses aspérités sur la surface de l'oocyste (§ 0~3.3).

2~3 - SUBSTRATS UTILISÉS

Le milieu poreux joue un rôle important dans les mécanismes d'adsorption (§ 2~2.2). Aussi, afin de déterminer le comportement des oocystes de *C. parvum* sur plusieurs types de matériaux géologiques, des substrats recouvrant les principales lithologies ont été sélectionnés.

2~3.1 - Composition

Nous avons travaillé avec trois types de sables : un sable siliceux naturel (SSN) provenant des alluvions de la Moselle, un sable calcaire naturel (SCN) provenant des alluvions de la Meuse et un sable siliceux traité (SST) provenant des alluvions du Rhin. Le sable siliceux traité est lavé en deux phases. Un lavage à l'acide chlorhydrique permet une décarbonatation et un traitement au polyacrylate de sodium élimine l'argile. La composition minéralogique des sables utilisés a été déterminée par une analyse aux rayons X (Tableau 2~1).

Tableau 2~1 : Composition des sables d'étude

Minéraux	SST	SSN	SCN
Quartz	98 %	80 %	6,5 %
Feldspaths	2 %	18 % (orthose)	1,5 %
Mica		2 % (muscovite)	
Calcite			90 %
Kaolinite			2 %

(Source : analyses par rayons X – réalisées par le Laboratoire Environnement et Minéralurgie, Nancy)

En plus de la kaolinite naturellement présente dans le sable calcaire naturel, nous avons utilisé deux autres argiles, de l'illite et de la montmorillonite, et un minéral, de la bauxite.

La bauxite est une roche sédimentaire contenant au moins 40 % d'alumine ou oxyde d'aluminium (Al_2O_3) auquel s'ajoutent des oxydes de fer, des minéraux argileux (e.g. : kaolinite) et des minéraux titanés.

2~3.2 - Description minéralogique

Jouant un rôle plus important dans les processus de rétention (§ 2~2.2), les argiles seront donc plus amplement décrites.

a) Argiles

• Généralités sur les argiles

Les argiles sont des phyllosilicates^m d'aluminium dont les feuillets sont constitués de couches de tétraèdres SiO_4 (Figure 2~1) et de couches d'octaèdres $Al(OH)_6$ (Figure 2~2) reliées par les atomes O et OH mis en commun.

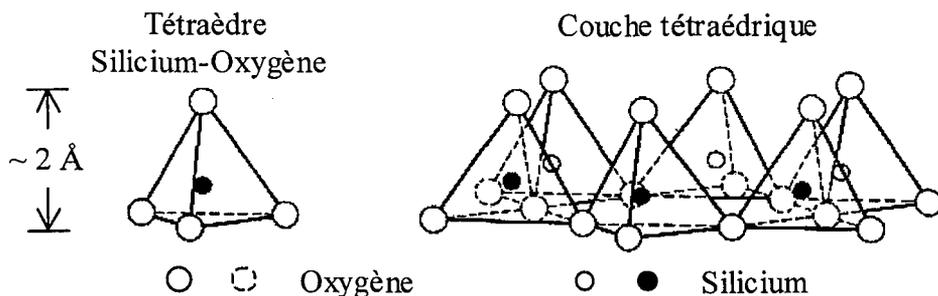


Figure 2~1 : Diagramme d'un tétraèdre et d'une couche tétraédrique

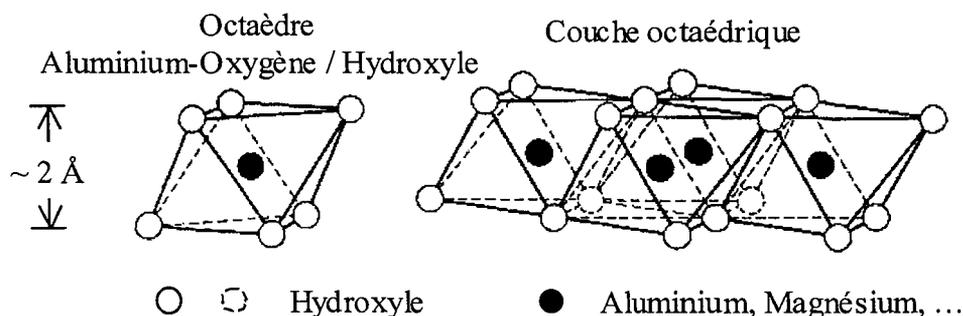


Figure 2~2 : Diagramme d'un octaèdre et d'une couche octaédrique

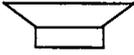
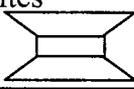
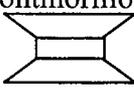
D'après la structure du feuillet, on distingue principalement les argiles 1/1 (1 couche tétraédrique et 1 couche octaédrique) et les argiles 2/1 (2 couches tétraédriques pour 1 couche octaédrique). La distance inter-réticulaire qui sépare deux feuillets successifs est notée d .

Les substitutions d'atomes sont fréquentes dans les feuillets. Les sites tétraédriques sont occupés par des cations Si^{4+} pour former des tétraèdres de silice, mais à ceux-ci se substituent souvent d'autres cations comme Al^{3+} ou Fe^{3+} de valence moindre. De même, les sites octaédriques sont essentiellement occupés par des cations Al^{3+} , qui peuvent aussi se substituer à d'autres cations comme Mg^{2+} , Fe^{3+} ou Fe^{2+} . Ces substitutions ioniques isomorphiques qui ne respectent pas les valences des cations provoquent un excès de charges négatives dans le feuillet. Ce déséquilibre est compensé par l'adsorption de cations dans l'espace interfoliaire (capacité d'échange des argiles).

Ainsi, les argiles ont la propriété d'absorber certains cations et de les retenir selon une capacité d'échange cationique (CEC). Les cations échangeables les plus courants sont Ca^{2+} , Mg^{2+} , H^+ , K^+ , NH_4^+ et Na^+ .

Les principaux minéraux argileux à la surface de la terre sont la kaolinite, les illites et les montmorillonites (Tableau 2~II).

Tableau 2~II : Récapitulation des caractéristiques des principaux minéraux argileux

Minéral argileux	Description	CEC (cmol/kg)	Surface spécifique (m ² /g)	Origine de la charge	Caractéristiques de la charge
Kaolinite 	1-1 liaisons H fortes	5 - 15	15	Sommets, liaisons brisées (sommets hydroxylés)	Charges variables et fixes
Illites 	2-1 liaisons K fortes	25	80	Substitutions isomorphiques, liaisons brisées aux sommets	Principalement charges fixes
Montmorillonites 	2-1 liaisons faibles	80 - 100	800	Substitutions isomorphiques, liaisons brisées aux sommets	Principalement charges fixes

• **Kaolinite (1/1, d = 7 Å).**

Elle a pour formule générique Al₂Si₂O₅(OH)₄. Il n'y a pas de substitution dans les couches (Figure 2~3). Le feuillet est neutre. Ses cristaux sont souvent grands (jusqu'à 15 µm).

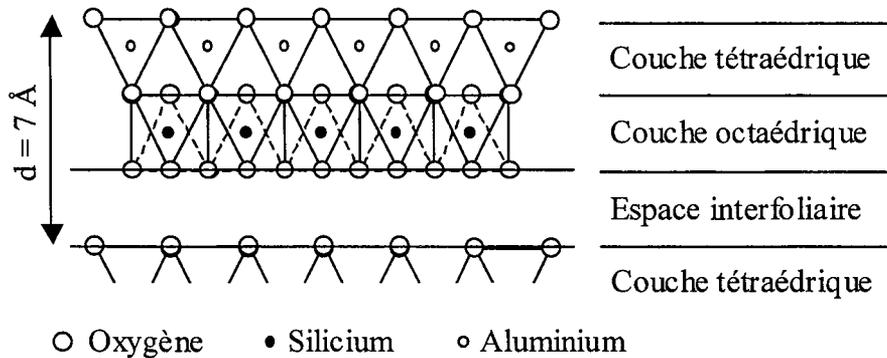


Figure 2~3 : Représentation schématique de la structure de la kaolinite
(projection sur un plan perpendiculaire aux feuillets)

• **Illites (2/1, d = 10 Å)**

Elles ont pour formule générique (Al_xSi_{4-x})^{IV}(Al_{2-(y+k)}Mg_yFe^{II}_k)^{VI}O₁₀(OH)₂K_x. Il s'agit de l'association d'une couche octaédrique (alumineuse) et deux couches tétraédriques (siliceuses). Mais, il peut y avoir des substitutions (remplacement de Si⁴⁺ par Al³⁺) (Figure 2~4). Des cations (K⁺) sont alors adsorbés dans l'espace interfoliaire afin de compenser le déséquilibre des charges.

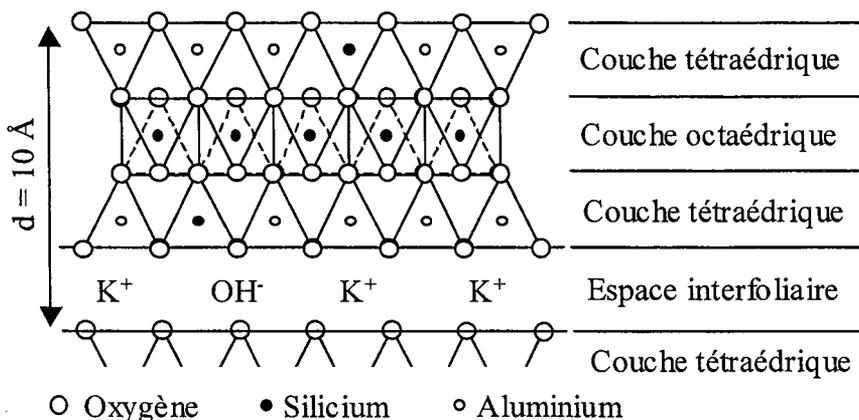


Figure 2~4 : Représentation schématique de la structure de l'illite
(projection sur un plan perpendiculaire aux feuillets)

C'est le minéral ubiquiste par excellence. Sa structure est proche de la muscovite (plus d'eau, moins de K^+).

- **Montmorillonites (2/1, $d = 14 \text{ \AA}$).**

Elles ont pour formule générique $(Al_xSi_{4-x})^{IV}(Al_{2-(y+k+1)}Mg_yFe^{II}_kFe^{III}_1)^{VI}O_{10}(OH)_2Me$. L'empilement des feuillets est désordonné. Chaque feuillet est tourné dans son plan par rapport au précédent. Les substitutions d'atomes sont importantes (Figure 2~5). Ce désordre et la faible charge des feuillets facilitent leur écartement et l'adsorption des molécules variées (eau, cations, molécules organiques) au niveau de l'espace interfoliaire qui s'écarte.

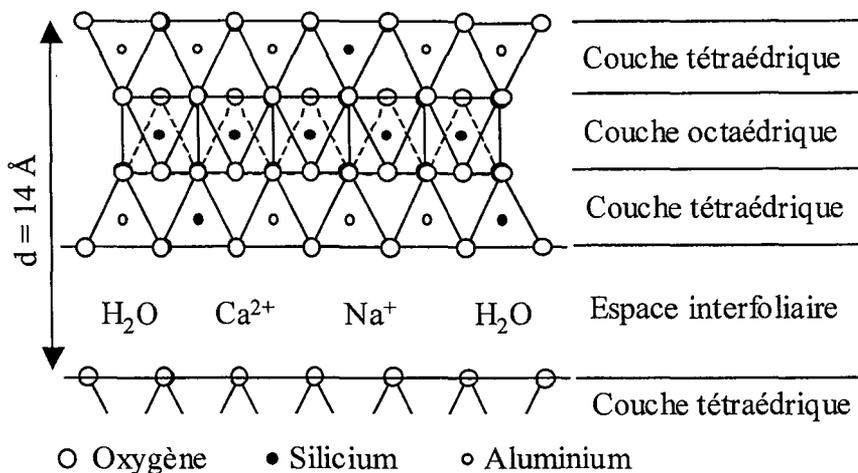


Figure 2~5 : Représentation schématique de la structure de la montmorillonite
(projection sur un plan perpendiculaire aux feuillets)

Les montmorillonites sont généralement calciques, plus rarement sodiques. Les feuillets de montmorillonites peuvent s'intercaler régulièrement ou irrégulièrement avec d'autres feuillets argileux, souvent illitiques. L'ensemble forme des interstratifiés.

b) Autres minéraux des substrats utilisés

- **Quartz**

Le quartz est un minéral composé de dioxyde de silicium ou silice de formule SiO_2 . Sous forme cristalline, tel le quartz cristallisé, la silice est la variété la plus condensée des silicates^m de formule SiO_4 . L'atome de silicium est situé au centre d'un tétraèdre dont les sommets sont occupés par les atomes d'oxygène. Dans la silice, les tétraèdres sont tous liés entre eux par leurs sommets et chaque atome d'oxygène est donc commun à deux tétraèdres successifs.

- **Calcite**

La calcite est un carbonate naturel de calcium, dont la formule chimique est $CaCO_3$. La calcite est un minéral extrêmement répandu. Constituant des roches calcaires à 95 %, la calcite forme également le ciment de nombreuses roches détritiques (sparite). Elle est fréquente dans les roches faiblement métamorphiques^m, plus rare dans les gneiss et les roches ignées^m, et constitue souvent un

cristal d'altération des silicates de calcium. Avec le quartz, elle représente le principal cristal de remplissage des fissures et diaclases^m des roches.

• Feldspaths

Les feldspaths constituent un groupe important de minéraux composés d'aluminosilicates de potassium, de sodium, de calcium ou occasionnellement de baryum. Les feldspaths sont les minéraux les plus abondants, représentant environ la moitié du volume de l'écorce terrestre. Ils apparaissent en cristaux simples ou en masses, et forment un constituant important de nombreuses roches effusives^m et métamorphiques, comme le granite, le gneiss, le basalte et d'autres roches cristallines^m. Tous les feldspaths s'érodent facilement pour former une sorte d'argile connue sous le nom de kaolin.

L'orthose, un feldspath contenant du potassium dont la formule chimique est KAlSi_3O_8 , est l'un des minéraux les plus communs.

• Micas

Les micas constituent un groupe de minéraux de la famille des phyllosilicates composés de silicate d'aluminium, qui se caractérisent par un clivage^m basal parfait qui permet de les séparer en feuillets très fins, légèrement élastiques. Les micas les plus importants sont la muscovite, la phlogopite, le lépidolite, et la biotite.

La muscovite, également appelée mica blanc, contient du potassium et de l'aluminium et a pour formule $\text{KA}l_2[(\text{OH},|\text{F})_2, \text{AlSi}_3\text{O}_{10}]$. Elle apparaît souvent en paillettes brillantes, abondant dans les granites, les micaschistes et les gneiss.

• Alumine

L'alumine est le seul oxyde formé par l'aluminium métallique et a pour formule chimique Al_2O_3 lorsqu'il est sous la forme anhydre. On le trouve dans des minerais, tels que le corindon de formule (Al_2O_3) , la diaspore $(\text{Al}_2\text{O}_3, \text{H}_2\text{O})$, la gibbsite $(\text{Al}_2\text{O}_3, 3\text{H}_2\text{O})$ et plus particulièrement dans la bauxite, une forme impure de la gibbsite. Les pierres précieuses, comme le rubis et le saphir, sont constituées de corindon coloré par de petites impuretés. L'alumine est un composé très dur : seuls le diamant et quelques produits de synthèse, tels que le carborundum et le carbure de silicium, ont une dureté supérieure. À température ambiante, l'alumine est insoluble dans tous les composés chimiques courants. Elle présente une température de fusion élevée, légèrement supérieure à $2\,000^\circ\text{C}$. C'est pourquoi on l'utilise comme matériau réfractaire, par exemple pour le revêtement de fours spéciaux. Sous forme hydratée, l'alumine est soluble dans les acides et les bases, et est utilisée comme matière première dans la synthèse de tous les composés de l'aluminium.

2~3.3 - Granulométrie des sables

Pour une comparaison des résultats et une bonne répétitivité des expériences, il est nécessaire de travailler sous des conditions semblables pour tous les sables comme, par exemple, en granulométrie.

GARNIER *et al.* (1998) ont conduit des essais en colonne (18 cm de longueur) avec *C. parvum* et des billes de verre avec deux tailles de diamètres : 0,5 mm et 1,5 mm. La percolation des oocystes dans la colonne est d'autant plus rapide que le diamètre des grains est grand. À la fin de l'essai, la colonne est analysée et ils retrouvent les oocystes dans les 5 premiers centimètres avec un diamètre de 0,5 mm et entre 12 cm et 16 cm avec un diamètre de 1,5 mm. Ces travaux laissent donc supposer qu'une granulométrie dont la taille de grain est comprise entre 0,5 mm et 1,5 mm devrait permettre une rétention sur toute la longueur d'une colonne d'une quinzaine de centimètres. Nous avons alors choisi cette granulométrie, afin d'optimiser la rétention dans notre colonne.

La courbe granulométrique alors obtenue (Figure 2~6) indique une distribution de tailles des grains unimodale. Le diamètre des grains correspondant à 60 % de tamisat, *i.e.* : le d_{60} , est égal à 0,69 mm et celui correspondant à 10 %, *i.e.* : le d_{10} , est égal à 0,52 mm. Le coefficient d'uniformité, qui est le rapport des deux valeurs précédentes, est donc égal à 1,33, ce qui correspond à un sable uniforme. Enfin, ce sable peut être considéré comme un sable grossier (diamètre des grains compris entre 0,2 et 2 mm) d'après la nomenclature granulométrique.

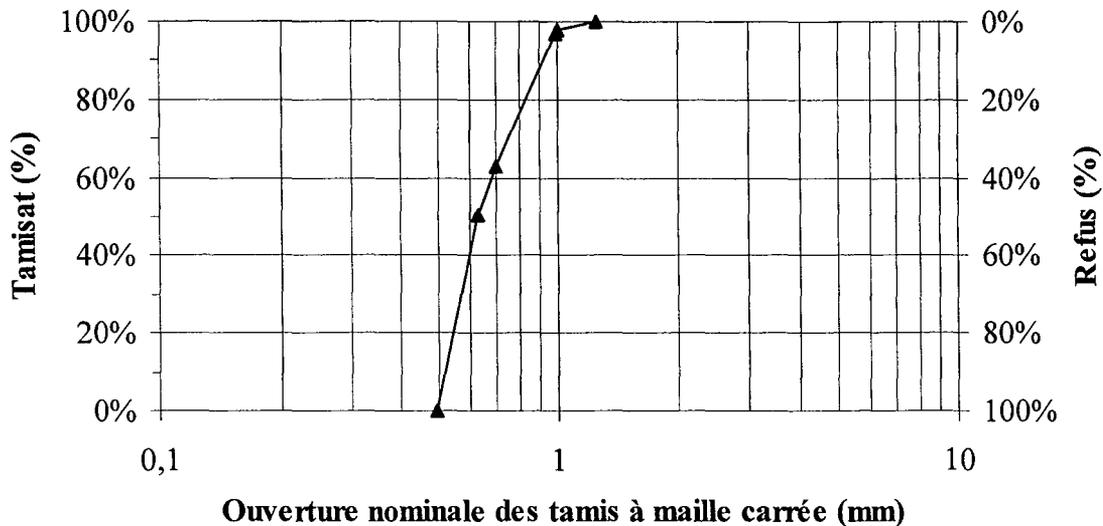


Figure 2~6 : Courbe granulométrique type des sables utilisés

2~4 - DÉVELOPPEMENT DU PROTOCOLE EXPÉRIMENTAL

Des essais batch ont été réalisés pour déterminer les paramètres d'adsorption des oocystes de *C. parvum* sur une matrice solide. Lors d'un essai batch, aucun apport extérieur n'est réalisé au cours de l'expérience et les éléments en contact interagissent à leur guise. Les résultats obtenus par ce type d'essais sont des cinétiques d'adsorption. On peut ensuite faire varier les concentrations des constituants en présence et déterminer des lois de partage, ou modifier les conditions expérimentales (nature du substrat, force ionique, ...) pour en déterminer leur influence.

2~4.1 - Choix du protocole

À la suite de plusieurs séries d'expériences, un protocole précis d'essais batch a été établi en tenant compte des résultats de la phase de tests. Dans un tube en polystyrène cristal (PSTC) de 20 ml,

on place 1,100 g de matrice solide ($\pm 0,5$ mg) et 17,5 ml d'eau déminéralisée, distillée et dopée à environ 5×10^3 oocystes/ml. Le tube est placé sur un agitateur à retournement dont la vitesse a été réglée à 5 tr/min (Figure 2~7). Ces choix trouveront des justifications dans les paragraphes suivants.

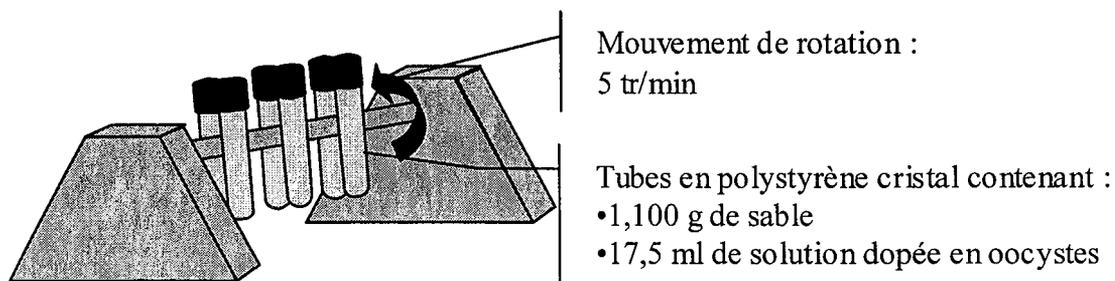


Figure 2~7 : Essai batch - Schéma de l'expérience

a) Choix de la concentration de la suspension en oocystes

Le titrage des échantillons est réalisé par immunofluorescence et le dénombrement au microscope optique (§ 1~3.2). La concentration de la suspension en oocystes à mesurer doit être supérieure à 800 oocystes/ml, selon les résultats de l'évaluation du protocole d'immunofluorescence utilisé (§ 1~3.3). Or, selon les travaux déjà réalisés sur l'adsorption, une perte de l'ordre de 70 % est possible [MEDEMA *et al.*, 1998 ; WALKER & MONTEMAGNO, 1999] (§ 2~2.1 et 2~2.3). Par conséquent, la concentration initiale de la suspension en oocystes doit être supérieure à 10^3 oocystes/ml. Nous avons alors choisi une concentration voisine de 5×10^3 oocystes/ml, nous assurant ainsi une bonne marge de manœuvre. Cette solution dopée en oocystes est homogénéisée sur table à agitation rotative à 300 tr/min pendant 20 minutes.

b) Choix du volume de suspension et de la masse de matrice solide introduits dans les tubes

Il est nécessaire que la surface extérieure totale de la matrice solide soit suffisante pour fixer éventuellement tous les oocystes. De plus, il est important que le tube soit suffisamment rempli de fluide afin d'entraîner le sable lors des retournements. C'est pourquoi le volume introduit a été fixé à 17,5 ml. Ce volume permet l'entraînement du sable à chaque rotation. Les tubes sont ainsi quasiment pleins et le sable est correctement entraîné et ne se colle pas sur les parois. Par conséquent, il faut que la matrice solide puisse fixer autour de $8,75 \times 10^4$ oocystes (pour une concentration voisine de 5×10^3 oocystes/ml).

Les réacteurs d'essai sont des tubes de 20 ml en polystyrène cristal. À l'origine, ils étaient prévus en verre, mais MUSIAL *et al.* (1987) ont relevé que le verre est susceptible de fixer les oocystes. Étant donné la surface spécifique du sable (de l'ordre de $0,08$ m²/g), une masse de sable de 1,100 g de sable est grandement suffisante pour offrir un potentiel de fixation maximal. En effet, le calcul de la masse minimale nécessaire pour fixer tous les oocystes introduits est :

Diamètre moyen des oocystes de *C. parvum* : $4,9 \cdot 10^{-3}$ mm

$$\Rightarrow \text{Section moyenne des oocystes de } C. \textit{parvum} : \pi \times \left(\frac{4,9 \cdot 10^{-3}}{2} \right)^2 = 1,89 \times 10^{-11} \text{ m}^2$$

$$\Rightarrow \text{Surface minimale nécessaire} : 1,89 \times 10^{-11} \times 8,75 \times 10^4 = 1,65 \times 10^{-6} \text{ m}^2$$

$$\Rightarrow \text{Masse minimale nécessaire} : \frac{1,65 \times 10^{-6}}{0,08} = 2,07 \times 10^{-5} \text{ g}$$

Cette valeur correspond à une estimation. En effet, rien ne certifie que les oocystes se placent en monocouche à la surface des particules de la matrice solide. En outre, les oocystes sont sphériques, et par conséquent ne peuvent pas recouvrir intégralement la surface des particules. Cependant, il apparaît qu'une masse très faible suffit. Cependant, plus la surface est importante, plus la probabilité de contact est grande. Il est donc préférable d'avoir une masse de matrice solide importante. C'est pourquoi, nous avons choisi une masse de 1,100 g.

c) Choix du volume des prélèvements

Un échantillon du surnageant est prélevé dans chaque tube selon une chronique établie à l'avance et la concentration en oocystes est mesurée par immunofluorescence selon le protocole que nous avons développé (§ 1~3.2). En outre, un tube contenant seulement la suspension en oocystes est ajouté afin de repérer d'éventuelles influences du milieu extérieur (température, luminosité, ...). Ce tube permet également de corréliser les essais entre eux et nous l'appellerons « témoin de répétabilité » (Tr). Le prélèvement dans ce tube est réalisé en fin de chronique et, théoriquement, il ne doit présenter aucun déficit en oocystes.

Étant donné que les oocystes ont une répartition non homogène au sein des suspensions [BUKHARI & SMITH, 1995 ; DROZD & SCHWARTZBROD, 1996], le volume des prélèvements doit être suffisamment grand pour permettre d'obtenir des échantillons représentatifs. L'importance du volume des prélèvements a été révélée par des expériences tests (Tableau 2~III). Il apparaît alors que la concentration déterminée à partir de prélèvements de 10 ml est plus grande que celle obtenue à partir de prélèvements de 1 ml. Or, la principale cause d'erreur dans le titrage est une perte en oocystes au cours du protocole d'immunofluorescence. Par contre, il ne peut y pas avoir d'apport en oocystes, exception faite d'une contamination accidentelle d'un produit. La même technique de titrage étant utilisée, il semble logique de penser que la différence provient du volume d'échantillonnage. On peut alors en déduire que la concentration obtenue avec des prélèvements de 10 ml est plus proche de la concentration réelle.

Tableau 2~III : Échantillonnage - Importance du volume de prélèvement

	Prélèvement de 1 ml	Prélèvement de 10 ml
Comptage de 100 µl	385 oocystes	467 oocystes
	371 oocystes	478 oocystes
	381 oocystes	471 oocystes
Moyenne	379 oocystes	472 oocystes
CV	1,9 %	1,2 %

Pour une bonne représentativité, nous avons donc choisi de réaliser des prélèvements de 10 ml dans les tubes de 17,5 ml (57 %). Après homogénéisation à l'aide d'un agitateur secoueur de type Vortex, on réalise deux sous-échantillons de 1 ml. Le titrage peut ainsi se faire sur deux sites différents : l'un, au Laboratoire Environnement, Géomécanique et Ouvrages (LAEGO) et l'autre au Laboratoire de Bactériologie - Parasitologie.

d) Choix de la vitesse de rotation

Il faut que la vitesse soit relativement lente pour assurer la chute du sable dans l'ensemble du tube à chaque demi-rotation tout en limitant les effets mécaniques (friction et chocs entre les grains et les oocystes). C'est ainsi que l'on optimisera les processus d'adsorption. Des essais préliminaires pratiqués à différentes vitesses ont montré qu'une vitesse de 5 tours par minute semble être la mieux adaptée.

2~4.2 - Mise en œuvre du protocole

Tous les tubes sont remplis avec 1,100 g de sable, sauf un, celui correspondant au témoin de répétabilité. Un volume d'eau déminéralisée et distillée correspondant au volume nécessaire pour l'essai est dopé en oocystes. La suspension est ensuite homogénéisée sur table à agitation rotative à 300 tr/min pendant 20 minutes. Enfin, un volume de 17,5 ml de la solution dopée en oocystes est introduit dans chaque tube, en commençant par le dernier tube de la chronique de prélèvements établie à l'avance. Lorsque la moitié des tubes sont remplis, un échantillon de 10 ml de la suspension initiale est prélevée, afin de déterminer la concentration de l'essai. Puis, le remplissage des tubes est poursuivi.

La vitesse de rotation est réglée à 5 tr/min, puis tous les tubes sont placés sur l'agitateur à retournement. L'essai est alors lancé. Les échantillons de 10 ml sont ensuite prélevés dans les tubes, dès qu'ils sont sortis du support de l'agitateur à retournement, selon la chronique de prélèvements établie. À la fin de l'essai, un échantillon de 10 ml est prélevé dans le témoin de répétabilité.

2~4.3 - Détermination de la variation de la concentration en oocystes significative

Les échantillons prélevés dans le surnageant sont titrés par immunofluorescence selon le protocole que nous avons développé (§ 1~3.2). La concentration dans le surnageant est alors déterminée. Puis, par comparaison avec la concentration initiale introduite dans les tubes, la variation en oocystes dans le surnageant est calculée et exprimée sous forme d'un pourcentage comme suit :

$$\%_{\text{variation}} = \frac{C_{T0} - C_{\text{éch}}}{C_{T0}} \times 100 \quad (2\sim 1)$$

avec C_{T0} : concentration en oocystes dans la suspension initiale (oocystes/ml),
 $C_{\text{éch}}$: concentration en oocystes dans l'échantillon (oocystes/ml).

Ce pourcentage est donc positif dans le cas d'un déficit en oocystes dans le surnageant et négatif dans le cas d'un gain. Nous avons choisi cette formulation (déficit positif) puisqu'on peut supposer que le déficit en oocystes dans le surnageant correspond *a priori* aux oocystes qui se sont adsorbés sur la matrice solide. En calculant cette fraction pour tous les tubes de la chronique, on obtient donc une cinétique d'adsorption. Dans la suite, nous abrègerons l'expression et emploierons la notion de déficit dans le surnageant.

L'évaluation du protocole d'immunofluorescence utilisé (§ 1~3.3) a montré que, pour la concentration initiale choisie pour nos essais (§ 2~4.1a), à savoir voisine de 5×10^3 oocystes/ml, les titrages sont obtenus avec une erreur maximale de $\pm 10\%$ par rapport à la valeur moyenne (Figure 1~7). C'est cette erreur qui peut induire un gain en oocystes dans le surnageant. Pour déterminer le déficit significatif dans le surnageant, supposons un échantillon où il n'y a pas eu d'adsorption, *i.e.* ayant une concentration de 5×10^3 oocystes/ml, le titrage obtenu pourrait donc varier entre $5,5 \times 10^3$ et $4,5 \times 10^3$ oocystes/ml. Par conséquent, en utilisant l'équation (2~1), le déficit dans le surnageant maximum possible serait de 18,2%, *i.e.* : pour une concentration d'essai déterminée égale à $5,5 \times 10^3$ oocystes/ml et une concentration de l'échantillon à $4,5 \times 10^3$ oocystes/ml.

En conséquence, nous avons choisi de ne considérer comme significatif que des déficits dans le surnageant supérieurs à 20%.

2~5 - RÉSULTATS ET INTERPRÉTATIONS DES ESSAIS

Ce sont les difficultés à obtenir des résultats précis lors des premiers essais batch qui nous ont amené à modifier et fixer le protocole d'immunofluorescence (importance de l'incubation, nécessité d'une pré-membrane, ...). Ainsi, les essais batch ont dû être réalisés plusieurs fois en fonction de l'évolution du protocole d'immunofluorescence. Seuls les résultats des derniers essais réalisés sont donnés ici, les premiers essais ne présentant aucun intérêt par leur manque de précision. Cependant, des coefficients de variation importants sont encore visibles dans les essais présentés, car des modifications mineures du protocole d'immunofluorescence ont encore été réalisées suite à ces essais.

Les essais batch avec les trois types de sables sont d'abord présentés, puis les autres essais réalisés, dont ceux avec les autres substrats : la bauxite, l'illite et la montmorillonite.

2~5.1 - Essais batch avec les trois types de sables

Rappelons que les trois types de sables sont : un sable siliceux traité (SST), un sable siliceux naturel (SSN) et un sable calcaire naturel (SCN).

a) Sable siliceux traité

La cinétique d'adsorption réalisée avec le sable siliceux traité est présentée sur la Figure 2~8. Avec ce sable, les déficits dans le surnageant calculés sont compris entre 0,7% et 5,2%, donc largement inférieurs au déficit significatif. Il semblerait donc qu'il n'y ait pas d'adsorption sur le sable siliceux traité.

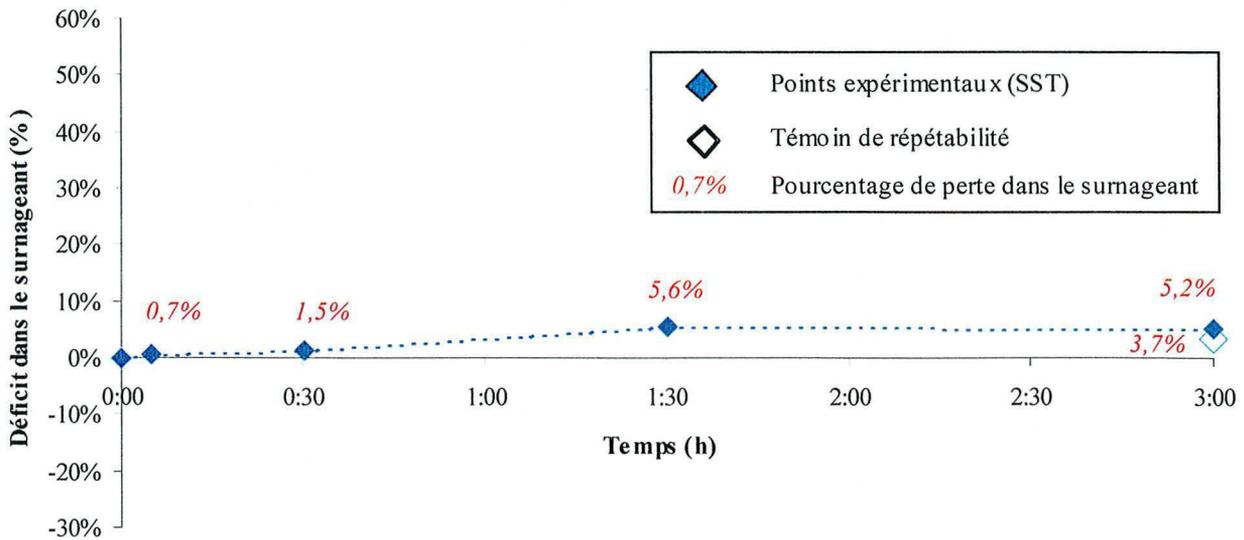


Figure 2~8 : Résultats de l'essai batch avec le sable siliceux traité

Il convient de noter que la Figure 2~8 ne présente que six points dont le Tr. En effet, c'est sur cette série de mesures qu'il nous est apparu l'importance de l'incubation (à travers les paramètres température et temps). La série de mesures précédente a été obtenue en suivant la procédure d'incubation indiquée sur la notice fournie avec les anticorps, à savoir que l'incubation peut être réalisée soit à température ambiante au moins 45 minutes, soit à 37°C pendant 30 minutes. Cependant, les écarts obtenus entre les opérateurs nous ont incité à vérifier nos procédures d'incubation. Il s'avère que l'incubation est une étape importante et que pour marquer tous les oocystes, il est nécessaire d'incuber au moins 30 minutes à exactement 37,0°C (§ 1~3.2b).

b) Sable siliceux naturel

Avec le sable siliceux naturel (Figure 2~9), les déficits dans le surnageant calculés sont compris entre 6,5 % et 18,9 %, donc non significatifs, bien qu'il semble y avoir un léger déficit au début de l'essai (jusqu'à 30 minutes). Mais au vu de la valeur du Tr (14,0 %) et des barres d'incertitudes, les valeurs obtenues ne permettent pas de conclure qu'il y ait adsorption.

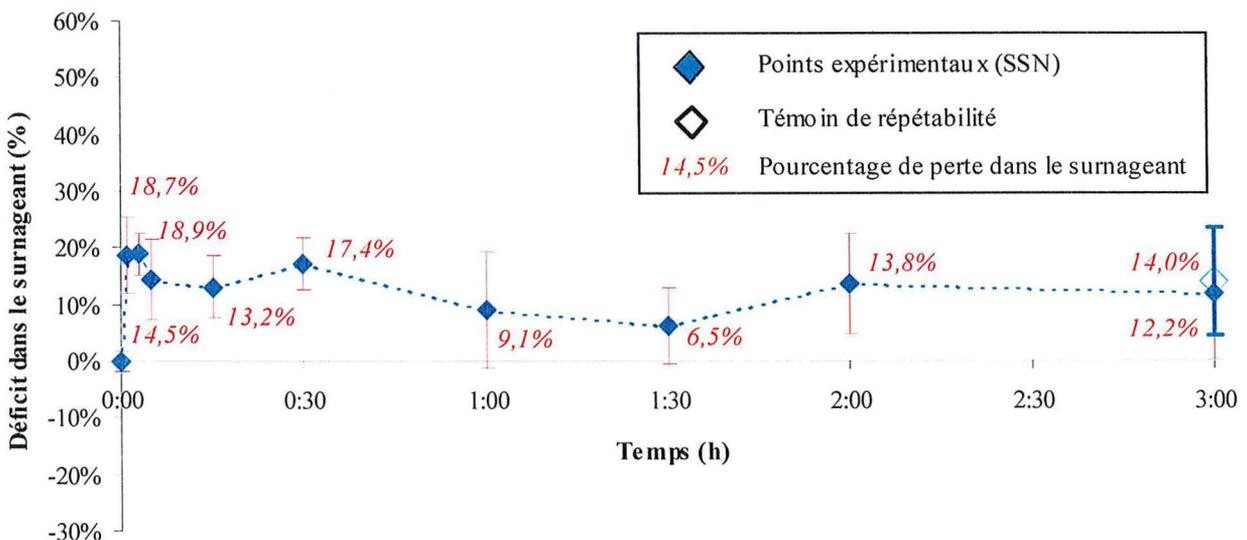


Figure 2~9 : Résultats de l'essai batch avec le sable siliceux naturel
(les barres d'erreur représentent le coefficient de variation des points de mesures)

c) Sable calcaire naturel

Avec le sable calcaire naturel (Figure 2~10), les points oscillent autour de la valeur zéro, entre -11,1 % et 6,7 %. Un échantillon a également été prélevé au bout de 48 heures (non représenté sur la figure). La perte déterminée dans le surnageant est de 1,3 % (CV de 12,4 %). Là aussi, les déficits sont non significatifs et ne permettent pas de conclure qu'il y ait adsorption, même au bout de 48 heures.

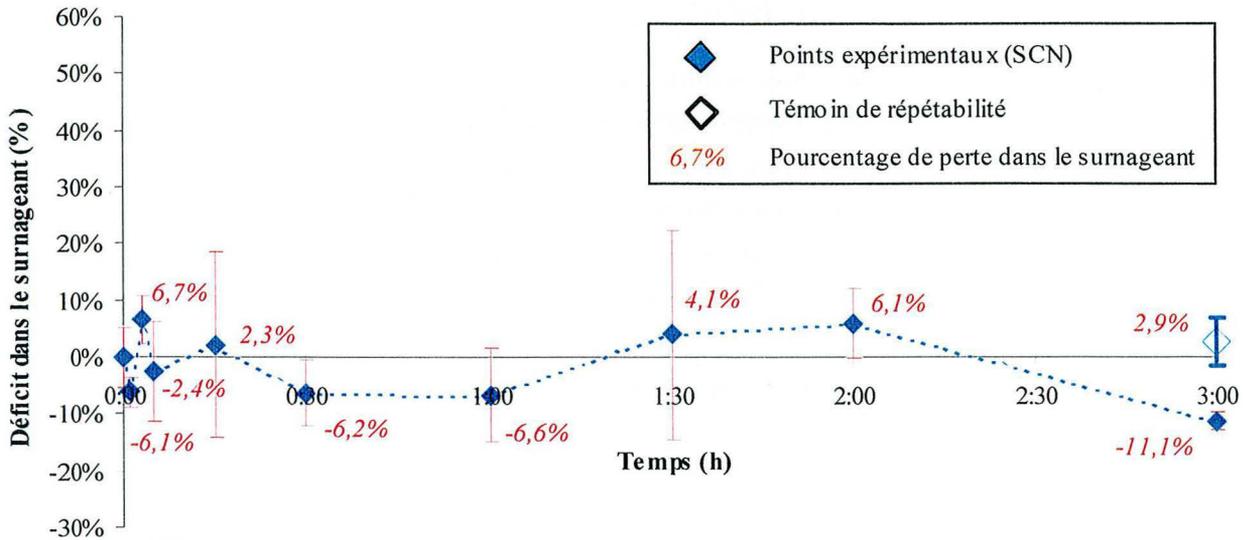


Figure 2~10 : Résultats de l'essai batch avec le sable calcaire naturel
(les barres d'erreur représentent le coefficient de variation des points de mesures)

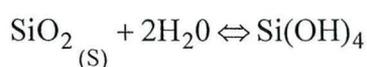
2~5.2 - Interprétation des essais batch avec les trois types de sables

Il ne semble donc pas qu'il y ait adsorption sur les substrats naturels étudiés (silice, calcite, feldspath et kaolinite), même au bout de 48 heures. Effectivement, les premiers essais (non présentés en raison de leur manque de précision) ont été réalisés avec des prélèvements répartis sur 48 heures. Cependant, bien que les titrages obtenus ne présentaient pas une grande précision, il est tout de même apparu qu'il n'y avait pas de variations importantes en oocystes dans le surnageant. C'est pourquoi les essais que nous avons présenté au paragraphe précédent (§ 2~5.1) ont été réalisés sur 3 heures, avec parfois un prélèvement supplémentaire à 48 heures, comme pour le sable calcaire naturel. En effet, ces derniers essais avaient pour principal objectif de confirmer l'absence d'adsorption comme, malgré un titrage peu précis, le laisser pressentir les premiers essais. Cette absence d'adsorption est en accord avec les récents travaux de WALKER & MONTEMAGNO (1999) (§ 2~2.3).

En outre, afin d'interpréter ce résultat, nous avons étudié la physico-chimie des eaux.

a) Physico-chimie des eaux avec la silice

La silice s'hydrate dans l'eau :



$$K_s = 1,7 \cdot 10^{-4}$$

Son hydratation n'est pas totale et la constante de solubilisation est fonction de la structure de la silice (à température ambiante et pression atmosphérique, la silice amorphe et le quartz sont les seules formes stables) et de la température de la solution aqueuse. Une fois hydratée, la silice adopte un comportement d'acide faible. Ainsi, en fonction du pH de la solution, la silice se dissocie et prend des formes et des comportements différents [ROCQUES, 1990] :



À pH faible, elle présente une forme neutre mais polaire, tétraédrique et non-dissociée, l'acide orthosilicique : Si(OH)_4 . Plus le pH augmente et plus la molécule tétraédrique aura tendance à s'ioniser. Les ions silicium tétraédriques se polymérisent et deviennent vite insolubles. Au voisinage du pH neutre, ces oligopolymères entrent rapidement dans le domaine colloïdal et peuvent atteindre jusqu'à 10 nm. Entre pH 7 et 10, la suspension colloïdale chargée négativement se stabilise. Pour des pH inférieurs à 9, c'est la forme Si(OH)_4 qui est prépondérante (Figure 2~11).

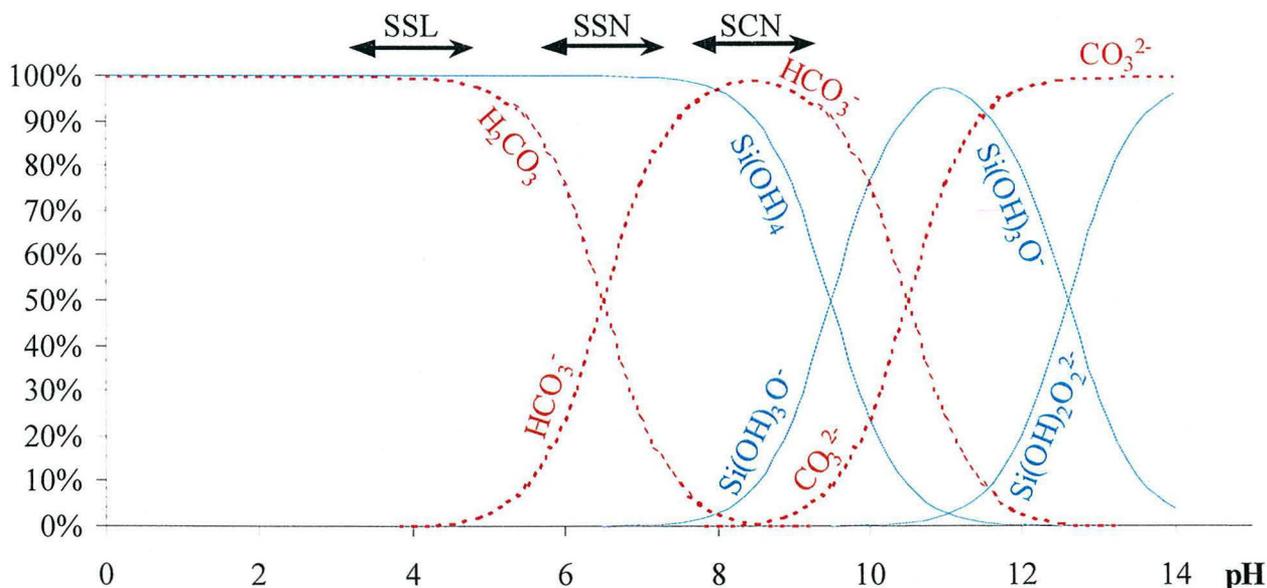


Figure 2~11 : Schéma de prédominance des formes de la silice et de la calcite en fonction du pH

(les flèches représentent les valeurs du pH au cours des essais batch)

b) Physico-chimie des eaux avec la calcite

La calcite se dissout dans l'eau et libère du calcium et des carbonates :



Les carbonates se comportent alors comme une base faible :



Donc, pour des pH inférieurs à 6,5, c'est la forme neutre de la calcite qui est majoritaire. Dans les autres cas, la calcite se présente sous la forme d'un anion (Figure 2~11).

c) Conséquences de la physico-chimie

Le pH a été mesuré dans les tubes en présence des sables utilisés pour les essais batch. De façon générale, le pH varie autour de 4 pour le sable siliceux traité, autour de 6,5 pour le sable siliceux naturel et autour de 8,5 pour le sable calcaire naturel (Figure 2~11).

Ainsi, le pH de toutes les solutions est inférieur à 9 et la silice est donc sous une forme dissoute électro-négative. En ce qui concerne la calcite, la forme prédominante des carbonates est donc l'anion hydrogénocarbonate, HCO_3^- (Figure 2~11). Or, les oocystes présentent également une charge de surface négative à ces valeurs de pH [DROZD & SCHWARTZBROD, 1996] (§ 2~2.3). En conséquence, nous pouvons supposer que les oocystes subissent des répulsions électrostatiques (Encadré 4), ce qui freine voire empêche leur adsorption. Cette répulsion semble relativement importante, puisque l'on n'observe pas de fixation, ni sur le sable siliceux naturel (présence de feldspaths qui donne une plus grande force ionique à l'eau), ni sur le sable calcaire naturel (présence de kaolinite). En outre, la dissociation de la calcite libère des ions Ca^{2+} , ce qui pourrait diminuer le potentiel zêta des oocystes (Encadré 3) et permettre une légère adsorption.

2~5.3 - Autres essais batch

Les essais batch ont été poursuivis dans deux optiques : modifier les conditions dans la phase aqueuse des tubes et rechercher un substrat plus propice à l'adsorption.

a) Ajout de Ca^{2+}

L'ajout d'un sel de calcium (chlorure de calcium) à 10^{-2} M/l, dans les tubes d'essai, permet d'augmenter le nombre de cations (la concentration du calcium est ainsi 7 fois plus élevée qu'avec le sable calcaire) et, de surcroît, la force ionique de la phase aqueuse. Ainsi, les propriétés de surface de la matrice solide et des oocystes doivent s'en trouver modifiées, ce qui pourrait rendre possible un phénomène d'adsorption. Cependant, les résultats obtenus sont peu convaincants. Les points oscillent et, pour un même échantillon, les comptages divergent. Lors des comptages, il a pu être remarqué que la quasi-totalité des lames présentaient un nombre relativement élevé d'amas d'oocystes. L'hypothèse avancée est qu'en présence de calcium, les oocystes s'agrègent, ce qui rendrait inefficace l'homogénéisation dans les tubes avant les prélèvements. Les échantillons ne seraient alors pas suffisamment représentatifs. Cette propriété des oocystes à s'agréger a été notée par d'autres équipes de recherche (groupe de discussion *on line*). On peut supposer également que c'est ce même phénomène qui est responsable des coefficients de variation importants lors de l'essai batch avec le sable calcaire naturel (Figure 2~10).

b) Essai avec de la bauxite

WALKER & MONTEMAGNO (1999) ont observé une adsorption sur de l'oxyde d'aluminium III (Al_2O_3) (§ 2~2.3). Or, dans la nature, l'alumine se trouve essentiellement dans la bauxite dont elle est un composant majoritaire (§ 2~3.1).

Un essai a donc été lancé avec 11 mg de bauxite en poudre, les oocystes baignant alors dans une suspension colloïdale de bauxite. Il convient alors de rajouter une étape au protocole de l'essai batch. Il semble en effet nécessaire, avant de prélever, de séparer les oocystes libres et les oocystes éventuellement liés à la bauxite. Les travaux de MEDEMA *et al.* (1998) ont montré que la vitesse de sédimentation des oocystes liés avoisinait la vitesse de sédimentation du substrat sur lequel ils étaient fixés. Nous avons déterminé, à l'aide d'un spectrophotomètre, qu'un repos de 30 minutes du tube permet de faire sédimenter plus de 95 % de la bauxite. Or, en 30 minutes, les oocystes libres ne sédimenteront quasiment pas [MEDEMA *et al.* (1998)]. En faisant l'hypothèse que les oocystes peuvent se fixer sur tous les types de grains (aucune influence de la taille du substrat), le calcul de la fraction fixée sur la bauxite se fait donc sur 95 % de la masse de bauxite introduite, soit 10,45 mg.

Les résultats de l'essai batch avec la bauxite montrent que les déficits dans le surnageant sont compris entre 1,5 % et 20,6 % (Figure 2~12). En effet, au bout de 5 minutes et de 30 minutes, la perte dans le surnageant est respectivement de 19,9 % et de 20,6 %. Ces résultats, proches de la valeur de perte significative, pourraient indiquer une adsorption. Cependant, la valeur intermédiaire à 15 minutes est de 1,5 % et la perte au niveau du témoin de répétabilité est également de 20,6 %. En outre, tous les autres points de la cinétique sont inférieurs à 10 % de perte. Par conséquent, au vu de l'ensemble des résultats, de l'allure générale de la cinétique d'adsorption obtenue et des incertitudes, nous ne pouvons pas conclure qu'il y ait adsorption. Rappelons que dans leurs travaux WALKER & MONTEMAGNO (1999) ont trouvé une adsorption de seulement 4 % sur de l'alumine de synthèse avec des oocystes viables. Par ailleurs cette valeur est discutable, étant donné la technique de titrage utilisée. En effet, selon les travaux de BENNETT *et al.* (1999), la description de cette technique nous laisse présager une faible précision (§ 2~2.3).

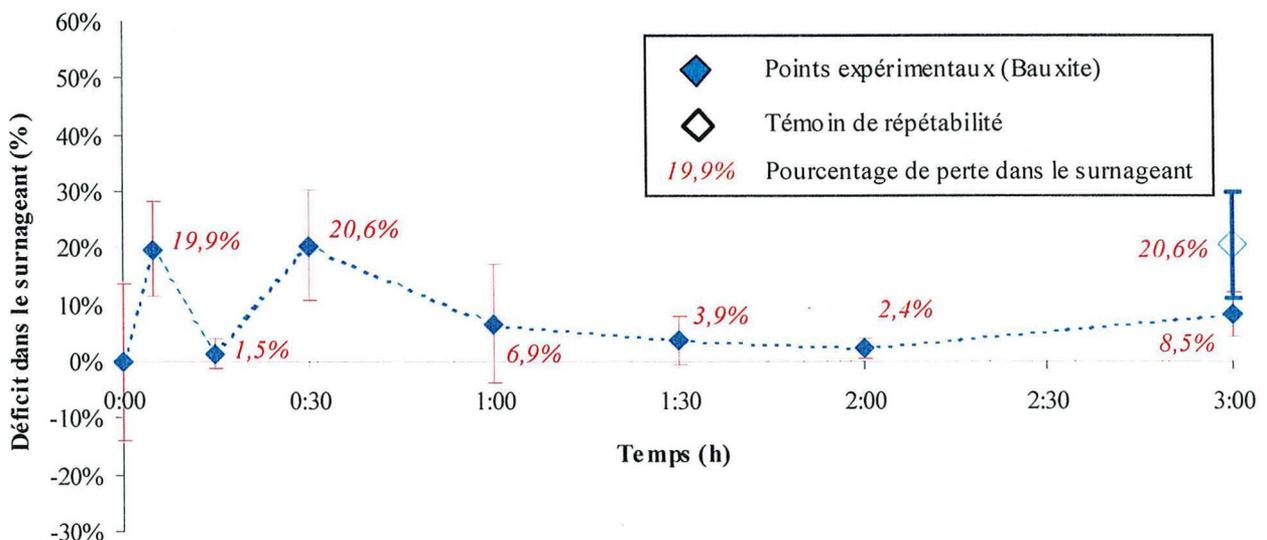


Figure 2~12 : Résultats de l'essai batch avec de la bauxite
(les barres d'erreur représentent le coefficient de variation des points de mesures)

c) Essai avec de l'illite

Un essai a été conduit avec le sable siliceux traité mélangé avec 1 % d'illite, soit 11 mg. Afin d'ôter tout doute sur l'effet éventuel de l'action mécanique du sable sur le processus d'adhésion des oocystes, deux tubes ont été ajoutés avec uniquement de l'illite en suspension dans l'eau, les oocystes baignant alors dans une suspension colloïdale d'illite. Comme pour la bauxite, il est nécessaire de séparer les oocystes libres et les oocystes éventuellement liés à l'illite avant de prélever. Nous avons déterminé qu'un repos de 20 minutes du tube permet de faire sédimenter plus de 80 % de l'argile. En faisant de nouveau l'hypothèse que les oocystes peuvent se fixer sur tous les types de grains d'argiles (aucune influence de la taille du substrat), le calcul de la fraction fixée sur l'argile se fait donc sur seulement 80 % de la masse d'illite introduite soit 8,8 mg.

Les déficits dans le surnageant dans les deux tubes contenant seulement l'illite sont de 8,8 % au bout de 1 heure et de -4,9 % au bout de 3 heures (Figure 2~13), donc largement inférieurs au déficit significatif. Il semblerait donc qu'il n'y ait pas d'adsorption. Avec le sable siliceux traité et l'illite, durant les deux premières heures, les déficits dans le surnageant sont compris entre -7,9 % et 15,3 % (Figure 2~13), également inférieurs à la valeur significative. Il semblerait, donc, qu'il n'y ait pas d'adsorption. Par contre, au bout de 3 heures d'essai, le déficit dans le surnageant est de 21,4 %. Or, un échantillon a également été prélevé au bout de 48 heures (non représenté sur la figure). La perte dans le surnageant déterminée est de 11,0 % (CV de 28,3 %). De plus, le tube ne contenant que de l'illite échantillonné au bout de 3 heures indique une perte dans le surnageant de -4,9 % (Figure 2~13). Par conséquent, au vu de l'ensemble des résultats, de l'allure générale de la cinétique d'adsorption obtenue et des incertitudes, nous ne pouvons pas conclure qu'il y ait adsorption, même au bout de 48 heures.

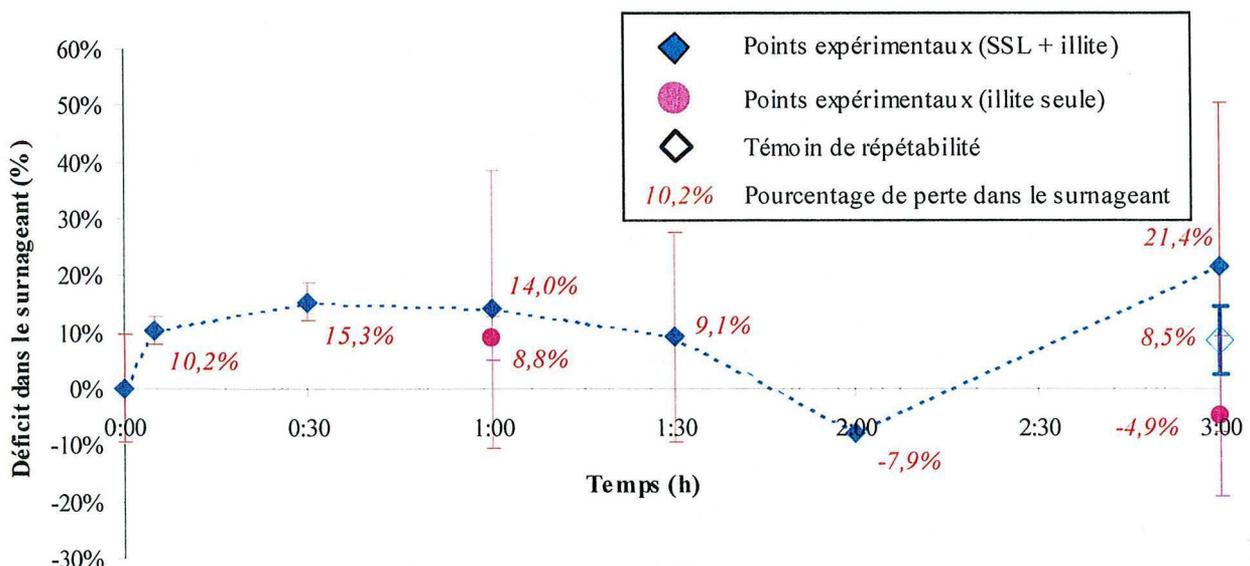


Figure 2~13 : Résultats de l'essai batch avec de l'illite
(les barres d'erreur représentent le coefficient de variation des points de mesures)

Ce résultat peut être expliqué par la structure de l'argile. En effet, l'illite est un phyllosilicate avec un cation (K^+) interfoliaire (2~3.2a). Cependant, le réseau cristallin est bien structuré et stable (argile très peu gonflante). Il y a donc très peu d'échange d'ions. Bien que des ions Al^{III} soient insé-

rés dans les feuillets de silice, cette argile semble peu propice à d'éventuelles fixations des oocystes même au niveau des ions aluminium, sûrement en raison des feuillets électronégatifs de la silice.

d) Essai avec de la montmorillonite

Un essai a été pratiqué avec 11 mg de montmorillonite, les oocystes baignant alors dans une suspension colloïdale de montmorillonite. Comme pour la bauxite et l'illite, il est nécessaire de séparer les oocystes libres et les oocystes éventuellement liés à la montmorillonite avant de prélever. Nous avons déterminé qu'un repos de 45 minutes du tube permet de faire sédimenter plus de 65 % de l'argile. En faisant de nouveau l'hypothèse que les oocystes peuvent se fixer sur tous les types de grains d'argiles (aucune influence de la taille du substrat), le calcul de la fraction fixée sur l'argile se fait donc sur seulement 65 % de la masse de montmorillonite introduite soit 7,15 mg.

Les résultats de l'essai batch avec la montmorillonite montrent que les déficits dans le surnageant sont compris entre -2,2 % et 9,2 % (Figure 2~14), donc largement inférieurs à la valeur significative, à l'exception de l'échantillon à 30 minutes qui indique une perte de 22,8 %. Cependant, au vu de l'ensemble des résultats, de l'allure générale de la cinétique d'adsorption obtenue et des incertitudes, nous ne pouvons pas conclure qu'il y ait adsorption.

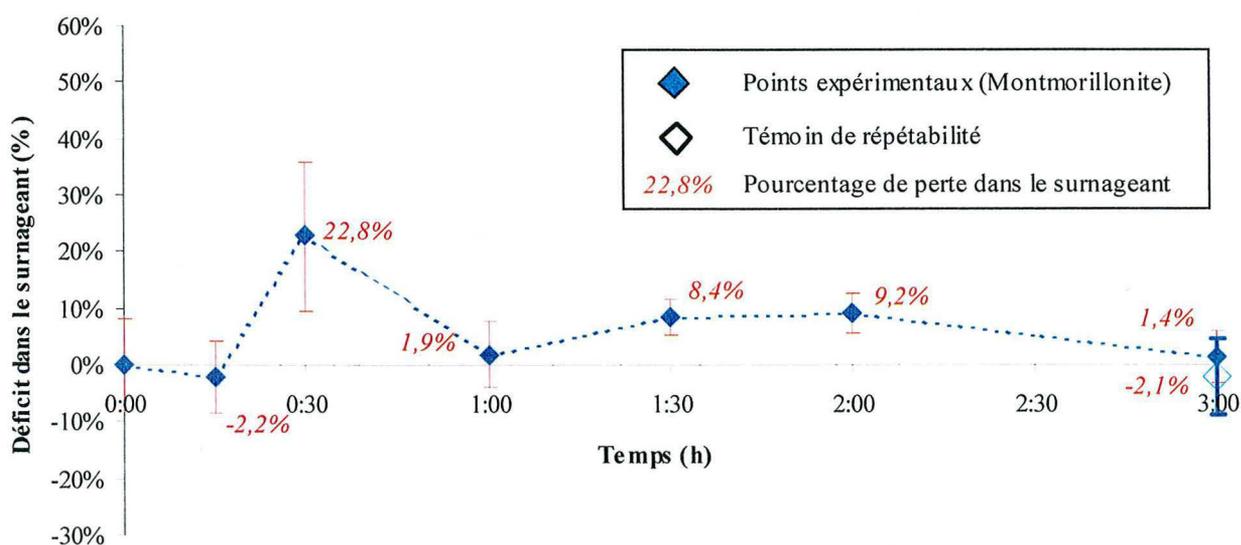


Figure 2~14 : Résultats de l'essai batch avec de la montmorillonite
(les barres d'erreur représentent le coefficient de variation des points de mesures)

2~6 - CONCLUSION

Que ce soit sur un substrat siliceux, calcaire, feldspathique, argileux ou alumineux, dans des conditions salines ou non, aucun essai batch réalisé n'a pu mettre en évidence de façon certaine un quelconque phénomène d'adsorption. Aucune loi de partage ne peut donc être déterminée. Ces résultats sont en accord avec les travaux de WALKER & MONTEMAGNO (1999), qui concluent sur l'hypothèse que les oocystes intacts se comportent comme des colloïdes biologiques sans réel site de fixation. De même, nos résultats ne sont pas contradictoires avec ceux de MEDEMA *et al.* (1998), puisque l'adsorption observée lors de leurs essais s'est pour l'essentiel produite sur de la matière

organique en suspension [MEDEMA, communication personnelle]. Reste cependant que les séries d'expériences en essais batch, à défaut de révéler un phénomène d'adsorption ont tout de même montré la probable influence de la charge ionique sur la paroi des oocystes. En effet, nous avons observé une tendance des oocystes à s'agréger lorsque nous avons augmenté la charge ionique par l'ajout de chlorure de calcium.

En outre, ces essais batch nous ont permis de mettre au point un protocole d'immunofluorescence adapté à nos besoins. Il en découle cependant que les essais batch ont dû être recommencés plusieurs fois, en fonction de l'avancement de la mise au point de notre protocole d'immunofluorescence, et que la précision des titrages ne correspond pas pour tous les essais à celle décrite dans le chapitre 1. Néanmoins, même si les titrages réalisés ne présentaient pas une grande précision, l'ensemble des essais réalisés n'a pas révélé de variation en oocystes importante dans le surnageant. C'est pour cette raison que nous n'avons pas recommencé nos essais batch une fois le protocole définitif d'immunofluorescence fixé. Par contre, c'est ce protocole qui a été utilisé par la suite lors des essais en colonne, menés pour étudier le comportement des oocystes en conditions dynamiques.

CHAPITRE 3

ESSAI EN COLONNE À CIRCULATION FERMÉE : DÉVELOPPEMENT NOVATEUR ET SIMULATIONS

RÉSUMÉ

L'étude du transport d'éléments pathogènes comme les oocystes requiert la mise en place d'un protocole original d'essai en colonne. En effet, dans un souci d'économie en micro-organismes et de sécurité vis-à-vis de l'environnement, il est quasiment obligatoire de minimiser le nombre d'oocystes et donc de travailler avec un faible volume de suspension. C'est pourquoi, et bien que d'une mise au point plus complexe, nous avons développé un essai en colonne à circulation fermée. L'interprétation des résultats de cet essai est cependant plus ardue que celle des résultats d'un essai classique en colonne ouverte. Elle réclame le développement d'un code de calcul. Par conséquent, avant la mise au point du protocole expérimental, nous nous sommes assurés de la résolution numérique. Nous avons choisi de résoudre l'advection et la dispersion par marche au hasard, la filtration avec une solution analytique et le mélange dans le réservoir par une méthode semi-analytique. Nous avons alors pu programmer notre modèle et le valider. La validation du modèle s'est faite en plusieurs étapes : la colonne seule, le réservoir et l'ensemble du système. Il en ressort que nos simulations numériques de l'essai en colonne à circulation fermée fournissent des résultats très satisfaisants.

**Il y a ceux qui voient les choses telles qu'elles sont et se demandent "Pourquoi?".
Et il y a ceux qui imaginent les choses telles qu'elles pourraient être
et se disent "Pourquoi pas?".**

George Bernard SHAW (1856-1950),
écrivain irlandais.
(Prix NOBEL de littérature en 1925)

3~1 - INTRODUCTION

Les essais batch n'ont révélé aucun phénomène d'adsorption. Il convient dorénavant de mettre en évidence un autre mécanisme de rétention : la filtration colloïdale. Pour cela, il est intéressant de mener des essais en colonne. Il s'agit d'expériences réalisées dans des conditions dynamiques donc plus proches de la réalité. Nous avons décidé, dans un souci d'économie en oocystes et de sécurité vis-à-vis de l'environnement, de développer un essai en colonne à circulation fermée. En effet, un tel essai permet de travailler avec un volume faible de solution dopée en oocystes. Cependant, ce type d'essai ne s'interprète pas par les techniques classiques de dépouillement. Aussi, il a été décidé de développer un modèle numérique de l'essai en colonne à circulation fermée. Les résultats des simulations ont ensuite été validés à partir de solutions analytiques existantes (pour des cas simples) et de résultats expérimentaux. Une fois ce modèle mis au point et validé, nous sommes intéressés au choix de la technique de détermination des paramètres hydrodynamiques.

3~2 - CONSÉQUENCES D'UNE CIRCULATION FERMÉE

L'étude du transport d'éléments pathogènes comme les oocystes au sein d'une colonne de milieu poreux nous a contraint à développer un protocole d'essai en colonne original (Figure 3~1). En effet, dans un souci d'économie et de sécurité, il est intéressant de minimiser le nombre d'oocystes manipulés et donc de travailler avec un faible volume de solution dopée. C'est pourquoi, il est apparu utile de « recycler » le fluide en sortie de colonne et donc de mettre en place une circulation fermée. Le nombre d'oocystes est ainsi minimisé. Cette contrainte fait apparaître, néanmoins, le problème du choix de la zone de prélèvements et de la technique d'interprétation des résultats.

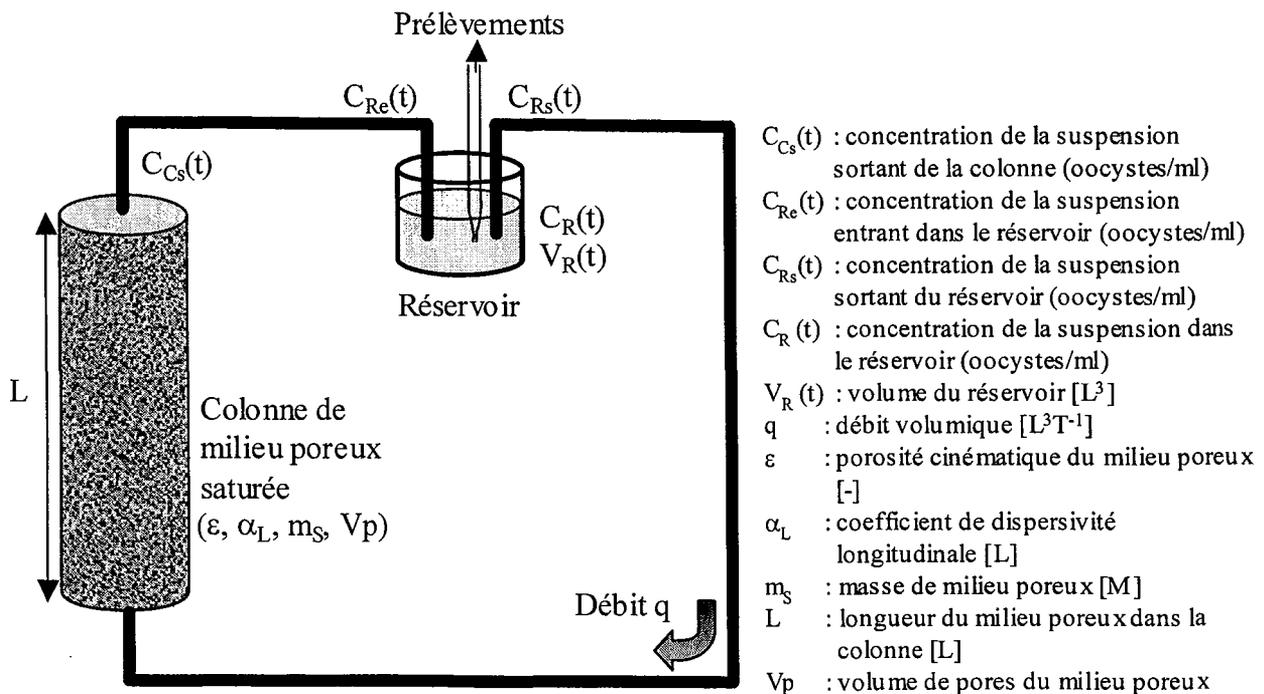


Figure 3~1 : Schéma du dispositif de l'essai en colonne à circulation fermée

3~2.1 - Choix d'une zone de prélèvements

Il est nécessaire d'avoir une zone de prélèvements, puisqu'une mesure de la concentration en ligne n'est pas possible. La solution que nous avons adoptée est l'insertion d'un réservoir (Figure 3~1). Outre un avantage conséquent sur les prélèvements (rapides et simples à effectuer), ce dispositif assure le maintien de la saturation en solution du circuit. Toutefois, il faudra alors maîtriser les conditions expérimentales à l'intérieur du réservoir.

3~2.2- Nécessité d'un modèle numérique

De nombreuses solutions, aussi bien analytiques que numériques, existent dans la littérature pour des géométries et des conditions aux limites et initiales variées, afin d'estimer, à partir de résultats expérimentaux, les paramètres hydrodynamiques d'essais en colonne [BUÈS & ZILLIOX, 1990]. Dans notre configuration (circuit fermé), il a été nécessaire de développer une technique d'interprétation basée sur l'ajustement de courbes obtenues numériquement sur les points expérimentaux acquis au niveau du réservoir.

En effet, habituellement, les résultats des essais en colonne sont obtenus en sortie de colonne ouverte et par ajustement des paramètres de transport (dispersivité, coefficient de filtration colloïdale, vitesse moyenne de pore, ...) une courbe théorique est calée sur les points expérimentaux. La courbe théorique est obtenue par des méthodes analytiques (solution de l'équation de transport possible dans des conditions particulières) ou numériques (*e.g.* : différences finies, ...).

Dans notre cas, il est extrêmement difficile de déterminer les paramètres de transport en résolvant les équations décrivant le système de manière analytique et cela pour plusieurs raisons :

- le système est en circuit fermé (la concentration en entrée de la colonne est donc fonction de celle en sortie),
- les conditions aux limites pour la colonne sont variables (*e.g.* : concentration en oocystes en entrée de colonne) et tout établissement d'une solution analytique est par conséquent extrêmement ardu,
- pour l'essai avec la solution dopée en oocystes, les points expérimentaux correspondent à la concentration dans le réservoir. La relation entre la concentration dans le réservoir et la concentration en sortie de colonne est loin d'être triviale.

C'est pour cela que nous avons décidé de développer un modèle numérique afin de déterminer les paramètres du transport à travers la colonne à partir de l'évolution de la concentration dans le réservoir.

3~3 - MODÈLE NUMÉRIQUE DE L'ESSAI EN COLONNE À CIRCULATION FERMÉE

Nous avons résolu numériquement les équations qui régissent le transport dans l'ensemble du circuit. Comme mentionné en début de chapitre précédent (§ 2~2), nous avons opté pour assimiler les oocystes de *C. parvum* à des colloïdes biologiques. Le transport de particules colloïdales repose sur l'écriture du bilan de masse appliqué à un milieu poreux. Ce bilan fait apparaître plusieurs mécanismes qui peuvent se partager en deux parties, le déplacement et les termes « puits/source » (dont la rétention). Nous avons choisi de résoudre séparément ces deux types de phénomènes.

Ainsi, nous avons, dans un premier temps, modélisé le déplacement à travers la colonne de milieu poreux saturé en eau, puis, dans un deuxième temps, les termes « puits/source » et, dans un troisième temps, l'évolution de la concentration dans le réservoir [MARLY *et al.*, 2001].

3~3.1 - Modélisation du déplacement dans la colonne seule : technique de marche au hasard

Un colloïde biologique se déplace avec le fluide et est donc soumis à l'advection. De plus, comme pour un soluté, il faut aussi prendre en compte les phénomènes de dispersion hydrodynamique. Quelques éléments concernant l'advection et la dispersion hydrodynamique sont donnés dans l'Encadré 5.

Il est nécessaire parfois de prendre en compte la mobilité propre du micro-organisme. En effet, certains d'entre eux sont capables de se déplacer dans une phase liquide en utilisant un organe de locomotion (flagelle, cils, ...) ou en réponse à une attraction chimique. Ce dernier type de mouvement est spécifique aux bactéries qui se déplacent vers les nutriments. Or, la forme de dissémination de *C. parvum* est un oocyste qui se forme lors de la phase d'enkystement de son cycle de développement (§ 0~3.2). L'oocyste de *C. parvum* ne possède aucun organe de locomotion et ne peut donc se déplacer seul.

Les seuls phénomènes régissant le déplacement à prendre en compte sont donc l'advection et la dispersion. En positionnant un lit de billes en entrée de colonne (qui permettra d'uniformiser la concentration sur toute la section de la colonne) et en choisissant judicieusement la géométrie de cette dernière, l'écoulement peut être considéré comme globalement monodimensionnel. L'équation d'advection-dispersion en 1D au sein d'un milieu poreux (homogène, isotrope et incompressible) se présente sous la forme :

$$\frac{\partial C_{\text{ooc}}}{\partial t} = D_L \frac{\partial^2 C_{\text{ooc}}}{\partial x^2} - v_{\text{pore}} \frac{\partial C_{\text{ooc}}}{\partial x} \quad (3\sim 1)$$

avec C_{ooc} : la concentration en oocystes dans la suspension (oocystes/ml),

v_{pore} : la vitesse moyenne de pore (m/s),

D_L : le coefficient de dispersion longitudinale ($D_L = D_{11}$) (m²/s),

t : le temps (s),

x : la position dans la colonne (m).

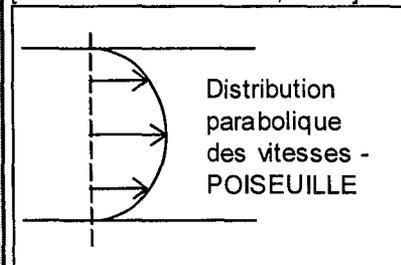
Encadré 5 : L'ADVECTION ET LA DISPERSION HYDRODYNAMIQUE

Advection

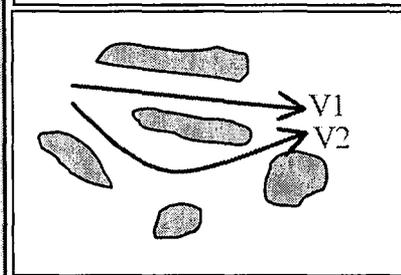
L'advection, connue également sous le nom de convection (e.g. : DE MARSILY, 1981), correspond à l'entraînement des éléments en solution dans le mouvement du fluide qui se déplace.

Dispersion hydrodynamique

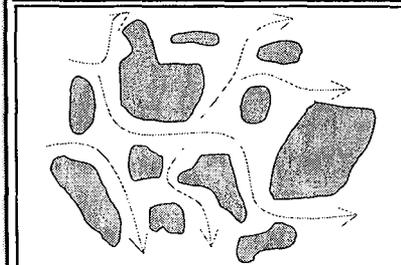
La dispersion hydrodynamique correspond à la combinaison de deux processus: la diffusion moléculaire et la dispersion dynamique. La **diffusion moléculaire** est un mécanisme physique lié à l'agitation moléculaire. Dans un fluide au repos, les particules se déplacent dans toutes les directions de l'espace par mouvement brownien. La résultante de cette agitation moléculaire est un transfert de particules des zones à concentration élevée vers les zones à concentration faible. La **dispersion dynamique** est un mécanisme de mélange dû essentiellement à l'hétérogénéité du champ des vitesses microscopiques [FRIED & COMBARNOUS, 1971]. Trois mécanismes principaux sont impliqués, à savoir :



- Au niveau des canalicules, entre les agrégats, les vitesses ne sont pas réparties uniformément dans la fraction mobile. En régime laminaire, l'écoulement suit un profil de type POISEUILLE. La propagation des éléments transportés est alors plus rapide dans l'axe des pores que sur les bords, ce qui conduit à un étalement progressif des éléments transportés par rapport au mouvement moyen de convection.



- La différence des ouvertures et des longueurs des trajets engendre une variation des vitesses d'un pore à l'autre ou au sein d'un même pore.



- Les lignes de courant fluctuent par rapport à la direction de l'écoulement.

Chacun de ces processus agissant simultanément tend à séparer deux particules de fluide initialement voisines. L'expression générale des composantes du tenseur de dispersion se présente sous la forme suivante :

$$D_{ij} = (D_m + \alpha_T |U|) \delta_{ij} + \frac{(\alpha_L - \alpha_T) U_i U_j}{|U|}$$

- avec D_m : coefficient de diffusion moléculaire [L²T⁻¹],
 δ_{ij} : symbole de KRONECKER [-],
 α_T : coefficient de dispersivité transversale [L],
 α_L : coefficient de dispersivité longitudinale [L],
 $U_i U_j$: composantes de la vitesse de pore [LT⁻¹].

En se plaçant dans le régime IV de PFANNKUCH (1962), i.e. : dans le cas où la diffusion moléculaire est négligeable devant la dispersion dynamique (vérifié § 4-3), le coefficient de dispersion longitudinale (D_L) peut alors s'écrire (Encadré 6) :

$$D_L = \alpha_L v_{pore} \tag{3-2}$$

avec α_L : coefficient de dispersivité longitudinale (m).

L'équation (3~1) devient alors :

$$\frac{\partial C_{\text{ooc}}}{\partial t} = \alpha_L v_{\text{pore}} \frac{\partial^2 C_{\text{ooc}}}{\partial x^2} - v_{\text{pore}} \frac{\partial C_{\text{ooc}}}{\partial x} \quad (3\sim3)$$

Notre choix s'est porté sur la résolution des phénomènes advectif et dispersif par une technique de marche au hasard. Cette résolution lagrangienne, issue de la théorie de la physique stochastique, consiste à assimiler le nuage de polluant à un certain nombre de particules dont l'évolution est suivie au cours du temps. Ces particules subissent l'ensemble de deux déplacements [KINZELBACH, 1986] :

- un premier déplacement déterministe, correspondant au mécanisme d'advection,
- un second déplacement aléatoire dû au mécanisme de dispersion. Ce phénomène aléatoire correspond à la fluctuation de la vitesse réelle autour d'une vitesse moyenne (Figure 3~2). Cette théorie ne peut être validée que pour un grand nombre de particules (théorie des grands nombres inhérente à la théorie stochastique).

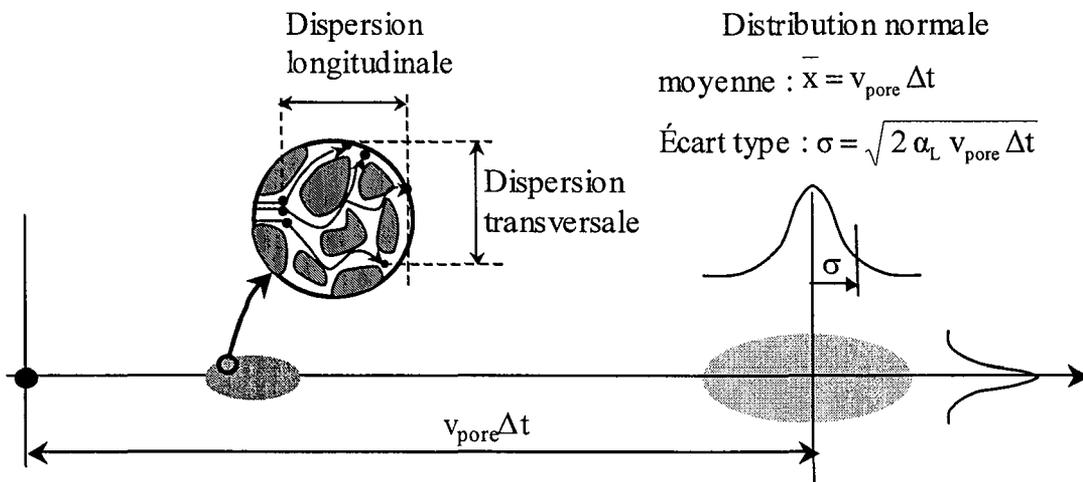


Figure 3~2 : Schéma explicatif du phénomène stochastique considéré (d'après KINZELBACH, 1986)

Ce type de résolution se conçoit bien dans notre cas, puisque le soluté est déjà formé d'éléments particuliers (un oocyste correspond à une particule). Il s'ensuit que l'équation de transport (3~3) est d'une forme analogue à l'équation de FOKKER - PLANCK et donc se résout par :

$$X(t+\Delta t) = X(t) + v_{\text{pore}}\Delta t + \zeta \sqrt{2 \alpha_L v_{\text{pore}} \Delta t} \quad (3\sim4)$$

où $X(t)$ et $X(t+\Delta t)$: position de la particule considérée aux temps (t) et $(t+\Delta t)$,

ζ : nombre aléatoire issu d'une loi normale centrée réduite.

Lorsque la position $X_i(t)$ de l'oocyste i est supérieure ou égale à la longueur de la colonne (L), la particule sort de la colonne. On connaît donc son temps de transfert au sein de la colonne (t_T). On stocke alors le temps de transfert de chaque particule à travers la colonne. Le résultat en sortie de colonne est la somme des réponses à des Dirac élémentaires déterminés pour chaque injection, *i.e.* : à chaque pas de temps Δt .

Encadré 6 : LES RÉGIMES DE DISPERSION

On peut définir un **nombre de Péclet moléculaire** qui correspond à l'influence de l'advection et de la diffusion moléculaire. Il représente le rapport du temps de diffusion moléculaire ($t_m = d_p^2 / D_m$) sur une distance caractéristique du milieu poreux par le temps d'advection ($t_a = d_p^2 / v_{pore}$) sur la même distance, soit :

$$Pe_m = \frac{v_{pore} d_p}{D_m}$$

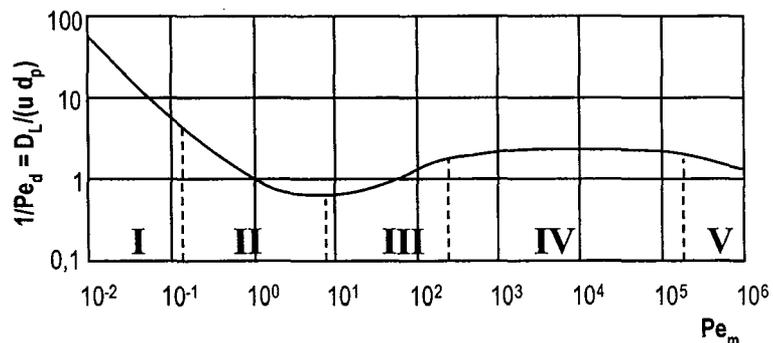
avec Pe_m , nombre de Péclet moléculaire [-],
 d_p , diamètre moyen des pores [L],
 v_{pore} , vitesse de pore [LT⁻¹],
 D_m , coefficient de diffusion moléculaire [L²T⁻¹].

Par analogie au nombre de Péclet moléculaire, on définit un **nombre de Péclet dynamique** qui correspond au rapport du temps de dispersion dynamique ($t_d = d_p^2 / D_L$) sur une distance caractéristique du milieu poreux par le temps d'advection ($t_a = d_p^2 / v_{pore}$) sur la même distance :

$$Pe_d = \frac{v_{pore} d_p}{D_L}$$

avec Pe_d , nombre de Péclet dynamique [-],
 D_L , coefficient de dispersion longitudinale (dans le sens d'écoulement) [L²T⁻¹].

En fonction de ces deux nombres de Péclet, PFANNKUCH (1962) définit cinq régimes de dispersion qui correspondent à la prédominance des rôles joués par la diffusion moléculaire et la dispersion dynamique (Figure ci-contre) :



- **Le régime I** est un régime où la diffusion moléculaire est prépondérante. Dans ce domaine la vitesse d'écoulement est faible et le rapport entre le coefficient de dispersion dynamique et celui de la diffusion moléculaire (D_L / D_m) est constant. Pour un massif constitué d'un assemblage non consolidé de grains identiques et du fait de la tortuosité, on a :

$$\left(\frac{D_L}{D_m}\right)_0 = \frac{2}{3}$$

- **Le régime II** est un régime de superposition où la diffusion moléculaire et la dispersion dynamique sont du même ordre de grandeur.

- **Le régime III** est un régime où la dispersion dynamique est prédominante sans pour cela qu'il soit possible de négliger la diffusion moléculaire. La partie de la courbe correspondante peut être approchée par une relation de la forme :

$$\frac{D_L}{D_m} = \left(\frac{D_L}{D_m}\right)_0 + \alpha Pe_m^m \text{ avec } \alpha \approx 0,5 \text{ et } m \approx 1,2$$

- **Le régime IV** est un régime de dispersion dynamique pure. L'effet de la diffusion moléculaire devient négligeable. La relation est la suivante :

$$\frac{D_L}{D_m} = \beta Pe_m \text{ avec } \beta = 1,8 \pm 0,4$$

En utilisant la définition du nombre de Péclet moléculaire, l'équation précédente devient :

$$\frac{D_L}{D_m} \approx \beta \frac{v_{pore} d_p}{D_m} \text{ d'où : } D_L = \alpha_L v_{pore} \text{ avec } \alpha_L = \beta d_p$$

avec α_L , coefficient de dispersivité intrinsèque longitudinale [L].

- **Le régime V** est un régime où les effets d'inertie ne sont plus négligeables. Dans ce domaine, la loi de DARCY n'est plus valable.

3~3.2- Modélisation des termes « puits/source » dans la colonne seule

Ces termes « puits/source » dans le contexte d'un transport en milieu poreux peuvent être regroupés en trois familles de mécanismes [JACKSON, 1981] :

- Des mécanismes physiques :
 - filtration des éléments par les pores du milieu,
 - sédimentation pour certains colloïdes.
- Des mécanismes géochimiques :
 - complexation des ions,
 - réaction acide/base,
 - réaction d'oxydo-réduction,
 - précipitation-dissolution,
 - adsorption-désorption.
- Des mécanismes radiologiques et biologiques :
 - dégradation naturelle,
 - filiation (apparition d'éléments nouveaux),
 - production (activité biologique).

La contribution de chacun d'eux dépend des propriétés physiques et chimiques de la matrice solide et des micro-organismes. Ainsi, de la liste de ces mécanismes, ceux qui s'appliquent aux oocystes de *C. parvum* sont la filtration, la sédimentation, l'adsorption, la dégradation et la production. L'adsorption a été étudiée dans le Chapitre 2. De plus, l'oocyste est une forme enkystée autrement dit une forme de dormance, *i.e.* : sans activité biologique. Il n'y a donc aucun processus de multiplication, celle-ci ne se déroulant que dans l'hôte (§ 0~3.2). Par conséquent, les seuls mécanismes à considérer sont la sédimentation, la dégradation et la filtration.

a) Sédimentation

MEDEMA *et al.* (1998) ont déterminé expérimentalement la vitesse de sédimentation dans l'eau des oocystes de *C. parvum* et ils ont obtenu une vitesse inférieure à 1 mm/h. Ils ont également montré que la vitesse de sédimentation obtenue est en accord avec la loi de STOKES, correspondant à l'expression suivante :

$$V_S = \frac{g}{18} d_{\text{ooc}}^2 \frac{\rho_{\text{ooc}} - \rho}{\mu} \quad (3\sim 5)$$

- avec V_S : vitesse de sédimentation ou vitesse de STOKES [LT^{-1}],
 g : accélération de la pesanteur [L^2T^{-1}],
 d_{ooc} : diamètre des oocystes [L],
 ρ_{ooc} : masse volumique des oocystes [ML^{-3}],
 ρ : masse volumique du fluide [ML^{-3}],
 μ : viscosité dynamique du fluide [$ML^{-1}T^{-1}$].

La sédimentation, *i.e.* : la chute gravitationnelle des oocystes dans le fluide du milieu poreux, est donc négligeable.

b) Dégradation

Les oocystes de *C. parvum* libérés dans l'environnement assurent la survie du parasite dans des conditions environnementales défavorables pour la majorité des micro-organismes. En effet, les oocystes sont très résistants à différents agents physiques et chimiques (§ 0~4.2). WALKER & STEDINGER (1999) ont introduit dans leur modèle hydrologique un mécanisme de dégradation des oocystes présents dans les fèces et dans l'eau de ruissellement. Ils suggèrent une dégradation du premier ordre fortement dépendante de la température, en se basant sur les résultats des travaux de ROBERTSON *et al.* (1992) qui ont étudié la survie des oocystes de *C. parvum* sous diverses conditions. Le modèle qui en découle est donc :

$$Z_{k,t+\Delta t} = Z_{k,t} e^{-v(T)\Delta t} \quad (3\sim6)$$

avec $Z_{k,t}$: nombre d'oocystes de la génération k au pas de temps t,

$v(T)$: taux de viabilité à la température T (°C), avec pour des températures entre 4°C et 37°C, $v(T) = C 10^{-0,058 T}$, avec C une constante égale à $10^{-2,68}$.

On peut regretter l'absence de précision dans leur publication sur les unités utilisées pour ce modèle. On peut cependant présumer à la lecture globale de leur étude les unités suivantes : le temps t en jour, la constante C et le taux de viabilité $v(T)$ en inverse de jour et la constante égale à 0,058 dans l'expression du taux de viabilité en inverse de degré Celsius. Avec ces unités, le modèle de dégradation (3~6) indique les résultats suivants (Tableau 3~I) :

Tableau 3~I : Résultats du modèle de dégradation des oocystes de *Cryptosporidium parvum* (d'après WALKER & STEDINGER, 1999)

Jours	10			50			100		
	5°C	10°C	20°C	5°C	10°C	20°C	5°C	10°C	20°C
Survie	98,9 %	99,5 %	99,9 %	94,8 %	97,3 %	99,3 %	89,8 %	94,7 %	98,6 %

Dans un aquifère, la température de l'eau est en moyenne comprise entre 5°C et 10°C et le temps communément utilisé pour la délimitation du périmètre de protection rapproché est de l'ordre de 50 jours. Les résultats du modèle de dégradation des oocystes de *C. parvum* indiquent que dans ces conditions leur dégradation reste très faible (Tableau 3~I) et pourra donc être négligée.

c) Filtration

La filtration correspond au blocage des micro-organismes transportés par des pores et canalicules plus petits. Elle dépend des conditions d'écoulement et des caractéristiques physiques des oocystes ainsi que du milieu. En considérant les oocystes de *C. parvum* comme des colloïdes biologiques, nous avons donc appliqué la théorie de la filtration colloïdale. Quelques éléments sur la filtration colloïdale sont donnés dans l'Encadré 7.

Encadré 7 : LA FILTRATION COLLOÏDALE

Il existe deux approches théoriques : la première, appelée macroscopique, est basée sur le déplacement du front de colmatage des filtres, la seconde, appelée microscopique, cherche à décrire les mécanismes de filtration à partir des processus élémentaires qui ont lieu dans l'espace libre d'un milieu poreux.

Approche macroscopique

Au niveau macroscopique, le taux de filtration peut s'exprimer de deux façons :

- Par une équation qui traduit une filtration irréversible [IWASAKI, 1937] :

$$\left(\frac{\partial \sigma}{\partial t}\right) = -v_{\text{pore}} \lambda C_v$$

- où σ : volume de particules filtrées par volume de milieu poreux [-],
- v_{pore} : vitesse moyenne de pore [LT⁻¹],
- λ : coefficient de filtration colloïdale [L⁻¹], fonction du milieu,
- C_v : volume de particule par volume de suspension [-].

- Par une équation incluant un terme de désorption [MINTS, 1951] :

$$\left(\frac{\partial \sigma}{\partial t}\right) = -v_{\text{pore}} \lambda C_v + k_{\text{des}} \sigma$$

- où k_{des} : constante de désorption des particules sur le solide [T⁻¹].

Un concept de collecteur a été défini : le milieu filtrant est considéré comme un ensemble de collecteurs répartis équitablement dans des unités élémentaires de lit d'épaisseur constante. En utilisant ce concept, la rétention de particules dans un lit filtrant peut être considérée en terme de dépôt de particules à partir d'une suspension en contact avec un collecteur de géométrie définie. Pour un lit poreux de porosité ϵ [-] et de diamètre moyen des grains d_g [L], le coefficient de filtration est obtenu en fonction de l'efficacité de capture d'un collecteur isolé sphérique η [-] et de l'efficacité de collision α [-] et s'exprime par [YAO *et al.*, 1971] :

$$\lambda = \frac{3(1-\epsilon)}{2 d_g} \alpha \eta$$

L'efficacité de capture η (comprise habituellement entre 10⁻² et 10⁻⁴) se définit comme le rapport de la concentration de particules retenue dans la tranche de lit sur la concentration qui entre. L'efficacité de collision α est un facteur de correction pour tenant compte les interactions électrostatiques. Idéalement, il est égal à 1. Cependant, il apparaît difficile de quantifier l'influence de la force ionique, du potentiel de surface et du diamètre des particules sur l'efficacité de collision.

Le problème majeur de cette approche réside dans la détermination des coefficients α et η .

Approche microscopique

Pour palier ce problème, l'approche microscopique s'intéresse aux forces que subissent les particules et donc à l'analyse des trajectoires des particules. YAO *et al.* (1971) exprime l'efficacité de capture pour un collecteur sphérique isolé comme la somme de trois termes de capture dus à la diffusion brownienne, à l'interception et à la sédimentation. RAJAGOPALAN & TIEN (1976) proposent une expression de l'efficacité de capture pour un lit de collecteur en prenant notamment en compte les forces attractives entre particule et collecteur.

En outre, l'accumulation des micro-organismes peut affecter la taille et la géométrie des grains, les caractéristiques de surface et donc la porosité de la matrice poreuse. En faisant l'hypothèse que les particules forment un dépôt lisse uniforme autour des grains de collecteur, la taille des grains augmentent et la porosité diminue. Le passage du flux n'est pas bloqué. La porosité du lit ϵ [-] et la taille des grains d_g [L] s'exprime par [PENDSE *et al.*, 1978] :

$$d_g = d_{g0} \left(1 + \frac{\sigma}{(1-\epsilon_{\text{ini}})(1-\epsilon_{\text{dep}})} \right) \text{ et } \epsilon = \epsilon_{\text{ini}} - \left(1 - \frac{\sigma}{(1-\epsilon_{\text{dep}})} \right)$$

- où d_{g0} , diamètre moyen initial des grains [L],
- ϵ_{ini} , porosité initiale du milieu poreux [-],
- ϵ_{dep} , porosité du dépôt de particules [-].

En définissant la filtration comme la rétention physique des oocystes transportés par des pores et canalicules plus petits, il nous a semblé correct de considérer que la filtration est irréversible sous nos conditions expérimentales. Par conséquent, l'équation exprimant la filtration des oocystes de *C. parvum* au sein de la colonne se présente donc sous la forme :

$$\frac{\partial \theta_{\text{ooc}}}{\partial t} = -v_{\text{pore}} \lambda C_{\text{ooc}} \quad (3\sim7)$$

- avec θ_{ooc} : nombre d'oocystes retenus par filtration par unité de volume de milieu poreux (oocystes/ml),
 C_{ooc} : nombre d'oocystes par unité de volume de suspension (oocystes/ml),
 λ : coefficient de filtration colloïdale (m^{-1}),
 v_{pore} : vitesse moyenne de pore (m/s).

L'équation (3~7) se résout simplement :

$$N_f = N_0 \exp(-v_{\text{pore}} \lambda t_T) \quad (3\sim8)$$

- où N_0 : nombre d'oocystes entrant dans la colonne (oocystes),
 N_f : nombre d'oocystes sortant de la colonne, après filtration (oocystes),
 t_T : temps de transport des N_0 oocystes au sein de la colonne (s).

3~3.3 - Modélisation de la colonne seule : bilan du déplacement et de la rétention

Les phénomènes à prendre en compte lors du transport des oocystes dans une colonne de milieu poreux saturé, homogène et incompressible sont donc :

- d'un point de vue mécanique : l'advection et la dispersion,
- d'un point de vue rétention : l'adsorption et la filtration.

On peut alors résumer l'ensemble de ces mécanismes sous la forme d'une équation phénoménologique :

$$\left\{ \begin{array}{l} \text{Variation de la} \\ \text{concentration} \\ \text{au sein du} \\ \text{milieu poreux} \end{array} \right\} = \left\{ \text{Advection} \right\} + \left\{ \text{Dispersion} \right. \\ \left. \text{dynamique} \right\} + \left\{ \text{Adsorption} \right\} + \left\{ \text{Filtration} \right\}$$

L'advection et la dispersion dynamique sont déterminés par l'équation (3~3). Lors des essais batch, nous n'avons pas pu mettre en évidence un phénomène d'adsorption. Nous avons donc opté de ne pas la prendre en compte. Il reste alors la filtration, dont l'équation (3~7) en donne l'expression. L'équation du transport 1D des oocystes de *C. parvum* dans une colonne de milieu poreux saturé, correspondant à l'équation phénoménologique écrite ci-dessus est donc :

$$\frac{\partial C_{\text{ooc}}}{\partial t} = v_{\text{pore}} \alpha_L \frac{\partial^2 C_{\text{ooc}}}{\partial X^2} - v_{\text{pore}} \frac{\partial C_{\text{ooc}}}{\partial X} - v_{\text{pore}} \lambda C_{\text{ooc}} \quad (3\sim9)$$

À tout instant, la concentration en oocystes élués est obtenue en combinant les équations (3~4) et (3~8). Le temps de transport des oocystes au sein de la colonne (t_T) est alors obtenu en additionnant

les pas de temps élémentaires nécessaires pour que la position de la particule soit supérieure à la longueur de la colonne (L). Ainsi, par ajustement des courbes obtenues numériquement et des points expérimentaux mesurés au niveau du réservoir, on pourra obtenir le coefficient de filtration colloïdale (λ). Deux possibilités sont alors envisageables :

- déterminer, par ajustement des courbes, l'efficacité de collision (α) et calculer l'efficacité de capture (η) par une des formules empiriques existantes, puis calculer le coefficient de filtration colloïdale (Encadré 7),
- déterminer directement, par ajustement des courbes, le coefficient de filtration colloïdale.

L'expression du coefficient de filtration colloïdale à partir de l'efficacité de collision et de l'efficacité de capture a été déterminée dans un cas particulier (Encadré 7), qui ne correspond pas à notre situation [YAO *et al.*, 1971]. Par conséquent, la détermination du coefficient de filtration colloïdale sera donc faite par voie directe. Le principe utilisé dans le modèle est de simuler l'ensemble de l'essai et de déterminer la courbe numérique la plus proche des points expérimentaux obtenus au niveau du réservoir. À partir d'une valeur imposée initialement, le modèle fait varier le coefficient de filtration colloïdale par dichotomie, jusqu'à ce que la moyenne des écarts entre les points expérimentaux et les valeurs numériques obtenues par la simulation soit inférieure à une valeur fixée par l'utilisateur. Notons que la discrétisation temporelle utilisée dans le modèle ne permet pas d'obtenir une courbe « continue » mais un nuage de points. Ceci nous a incité à utiliser une technique de minimisation de la moyenne des écarts. La Figure 3~3 représente l'influence du coefficient de filtration colloïdale sur les résultats des simulations numériques, avec en abscisses un temps réduit – volume élué (V) sur volume de pore (V_p) – et en ordonnées une concentration réduite – concentration dans le réservoir ($C_R(t)$) sur concentration initiale dans le réservoir (C_{R0}) –.

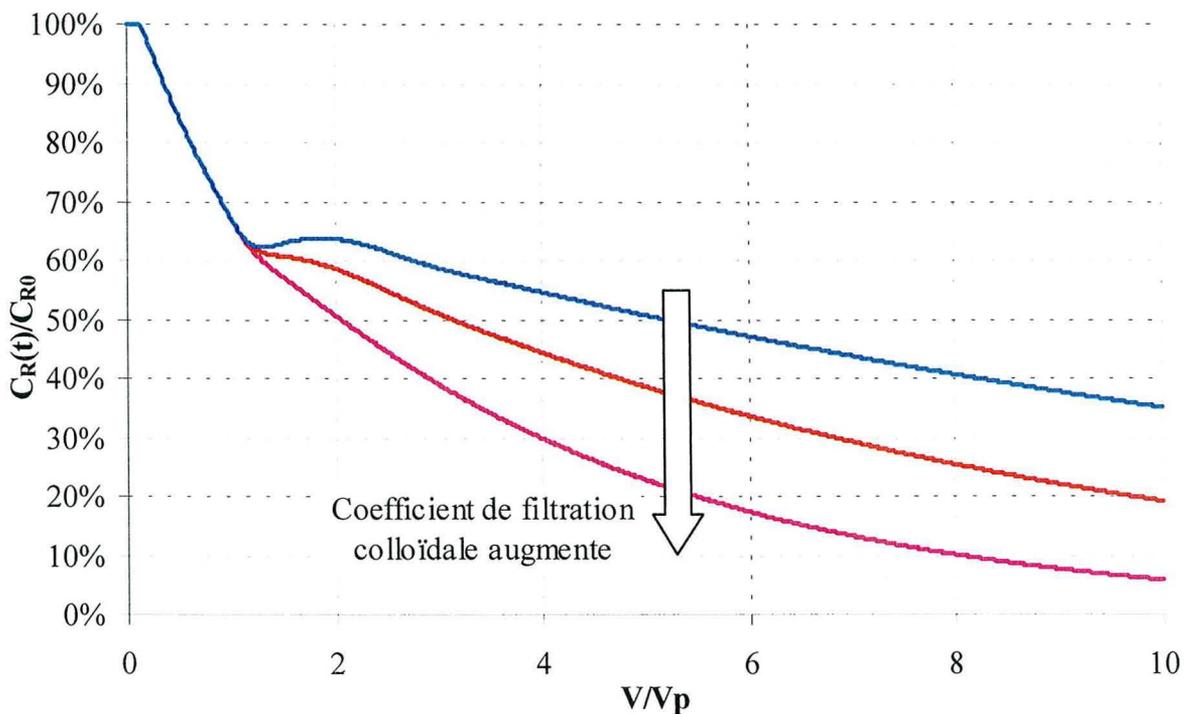


Figure 3~3 : Évolution de la concentration réduite dans le réservoir - Influence du coefficient de filtration colloïdale sur les résultats des simulations numériques

Une variation du coefficient de filtration colloïdale induit toujours une variation dans le sens contraire au niveau de la courbe numérique. En effet, comme le montre la Figure 3~3, une augmentation du coefficient de filtration colloïdale entraîne un abaissement de la courbe numérique. En conséquence, la détermination de ce coefficient par dichotomie est justifiée.

Étant donné la taille des oocystes et le fait que le protocole de l'essai en colonne à circulation fermée nous permet d'utiliser une faible quantité d'oocystes, nous pouvons négliger l'effet du dépôt des oocystes sur les caractéristiques du milieu poreux (porosité et diamètre moyen des grains sont considérés constants pour chaque essai) (Encadré 7 et § 4~2.1d).

3~3.4 - Modélisation du réservoir : mélangeur idéal

L'équation du bilan de masse dans le réservoir est (Figure 3~1) :

$$q C_{Re}(t) = q C_{Rs}(t) + V_R(t) \frac{dC_R(t)}{dt} \quad (3~10)$$

où q : débit volumique (ml/s),
 $C_{Re}(t)$: concentration du soluté entrant dans le réservoir (oocystes/ml),
 $C_{Rs}(t)$: concentration du soluté sortant du réservoir (oocystes/ml),
 $C_R(t)$: concentration du soluté dans le réservoir (oocystes/ml),
 $V_R(t)$: volume du réservoir variable en raison des prélèvements (ml),
 t : temps (s).

L'hypothèse faite est de considérer le réservoir comme un mélangeur idéal, *i.e.* : que la concentration du fluide qui en sort $C_{Rs}(t)$ (oocystes/ml) est à tout moment égale à la concentration dans le réservoir $C_R(t)$ (oocystes/ml). L'équation (3~10) devient alors :

$$\frac{1}{\beta(t)} \frac{dC_R(t)}{dt} + C_R(t) = C_{Re}(t) \quad \text{avec} \quad \beta(t) = \frac{q}{V_R(t)} \quad (3~11)$$

L'équation (3~11) justifie la décision de modéliser le transport dans l'ensemble du circuit. En effet, lors d'un essai, c'est l'évolution de la concentration dans le réservoir $C_R(t)$ qui est mesurée. Supposons que la concentration en sortie de colonne $C_{Cs}(t)$ corresponde à la concentration qui entre dans le réservoir $C_{Re}(t)$, avec un temps de retard dû aux tuyaux (Figure 3~1). Alors, pour obtenir directement l'évolution de la concentration en sortie de colonne à partir de celle dans le réservoir, il faudrait dériver les résultats expérimentaux, ce qui exigerait un grand nombre de mesures et une meilleure précision du titrage. Or, la technique de titrage utilisée exige beaucoup de temps et elle ne présente pas une précision importante, donc cette solution est difficilement envisageable (§ 1~2).

Les prélèvements étant réalisés ponctuellement, la fonction $V_R(t)$ est donc une distribution du type « créneau » (Figure 3~4).

L'équation (3~11) est résolue sur des intervalles de temps, *i.e.* : les paliers où $V_R(t)$ est constante. On travaille donc par intervalle i où $\beta(t) = \beta_i$ est constant.

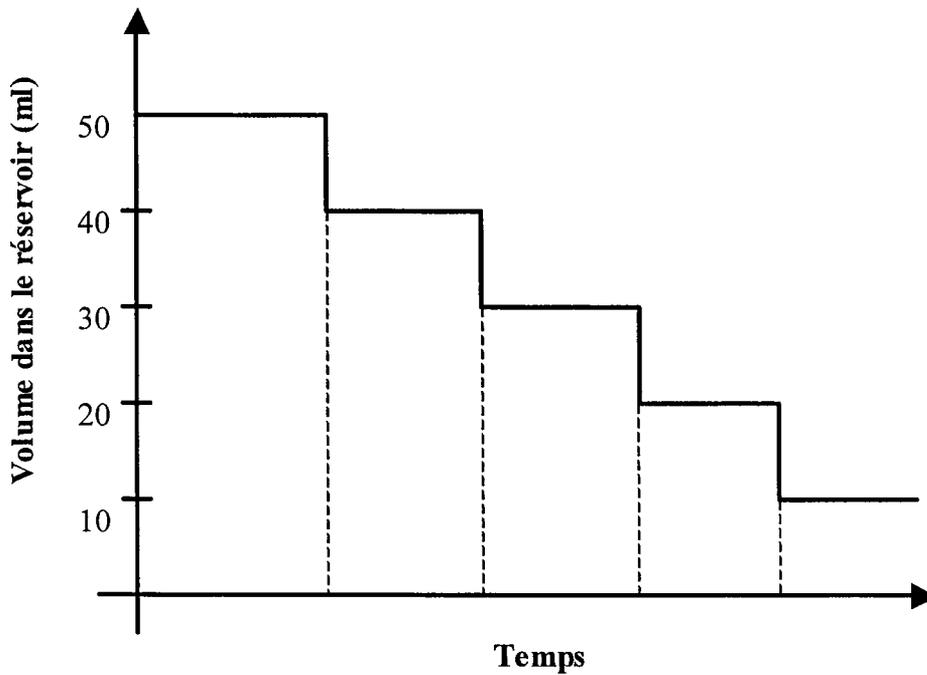


Figure 3~4 : Représentation de la fonction « créneau » $V_R(t)$

La solution générale de cette équation différentielle est la suivante :

$$C_R(t) = A(t) e^{-\beta_i t} \quad (3\sim12)$$

et
$$\frac{dC_R(t)}{dt} = \left(\frac{dA(t)}{dt} - \beta_i A(t) \right) e^{-\beta_i t} \quad (3\sim13)$$

En combinant les équations (3~11), (3~12) et (3~13) on obtient :

$$\frac{dA(t)}{dt} = \beta_i e^{-\beta_i t} C_{Re}(t) \quad (3\sim14)$$

En discrétisant par rapport au temps, on estime $\frac{dA(t)}{dt}$ à l'aide de la formule des accroissements finis. L'expression fournissant le plus de précision pour le pas de temps ($k \Delta t$) est :

$$\left| \frac{dA(t)}{dt} \right|_{k\Delta t} \approx \frac{A((k+1) \Delta t) - A((k-1) \Delta t)}{2\Delta t} \quad (3\sim15)$$

Cependant, l'expression (3~15) nécessite de connaître la valeur de $A(t)$ au pas de temps précédent, mais aussi au pas de temps suivant. Une autre alternative consiste à écrire, pour le pas de temps ($k \Delta t$) :

$$\left| \frac{dA(t)}{dt} \right|_{k\Delta t} \approx \frac{A(k \Delta t) - A((k-1) \Delta t)}{\Delta t} \quad (3\sim16)$$

$$\left| \frac{dA(t)}{dt} \right|_{k\Delta t} \approx \frac{A((k+1) \Delta t) - A(k \Delta t)}{\Delta t} \quad (3\sim17)$$

En additionnant alors l'expression (3~16) pour le pas de temps ($k \Delta t$) et l'expression (3~17) pour le pas de temps ($(k-1) \Delta t$), on obtient :

$$A^k = A^{k-1} + \frac{A'^{k-1} + A'^k}{2} \Delta t \tag{3-18}$$

en notant : $\left. \frac{dA(t)}{dt} \right|_{k\Delta t} = A'^k$ et $A(k \Delta t) = A^k$

Par conséquent, les équations (3~14) et (3~18) donnent :

$$A^k = A^{k-1} + \frac{\beta_i C_{Re}((k-1) \Delta t) e^{\beta_i (k-1) \Delta t} + \beta_i C_{Re}(k \Delta t) e^{\beta_i k \Delta t}}{2} \Delta t \tag{3-19}$$

L'expression de la concentration dans le réservoir par pas de temps sur chaque intervalle i à partir de l'équation (3~12) donne :

$$C_R(k \Delta t) = A^k e^{-\beta_i k \Delta t} \tag{3-20}$$

Les constantes A^k sont calculées par récurrence grâce à l'équation (3~19) à partir des conditions initiales, qui changent à chaque prélèvement :

- avant le premier prélèvement : $A^0 = C_{R0} = C_R(0)$,
- après le prélèvement i au pas de temps $(k \Delta t)$: $A^k = C_R(k \Delta t) e^{\beta_i k \Delta t}$.

Ainsi, le nombre de particules sortant du réservoir est calculé par itération à chaque pas de temps avec les équations (3~19) et (3~20) (Figure 3~5).

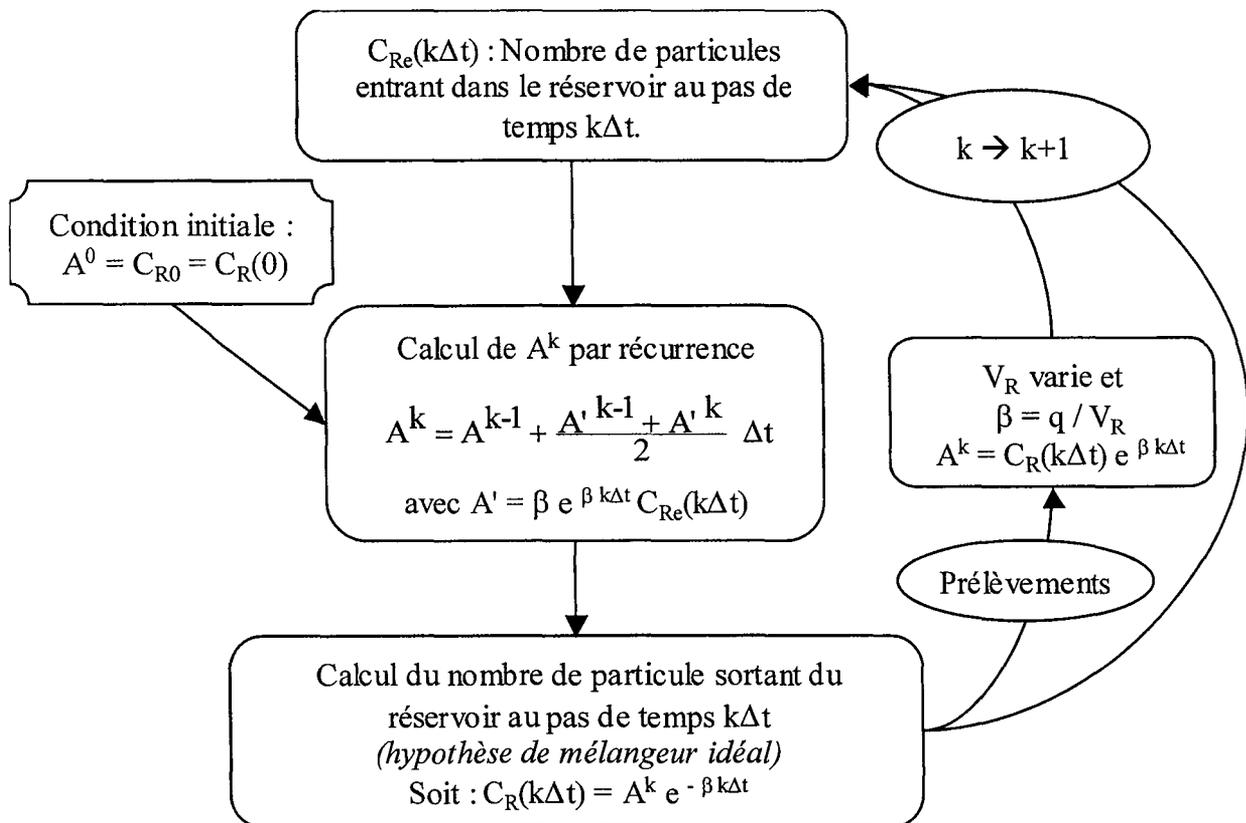


Figure 3~5 : Détail de l'algorithme - Calcul de la concentration de sortie de réservoir

3~3.5 - Modélisation de la colonne à circulation fermée : sommation des réponses à des Dirac élémentaires

Supposons que la concentration en oocystes entrant dans le réservoir $C_{Re}(t)$ (oocystes/ml) soit égale à la concentration sortant de la colonne $C_{Cs}(t)$ avec un retard attribué au temps de parcours dans les tuyaux. De même, avec un délai correspondant à la longueur des tuyaux, la concentration en oocystes sortant du réservoir $C_{Rs}(t)$ (oocystes/ml) est égale à la concentration entrant dans la colonne $C_{Ce}(t)$. La dispersion dans les tuyaux due à la forme parabolique des champs de vitesse (profil type POISEUILLE, Encadré 5) est donc négligée. Ce temps de retard est calculé pour chaque tuyau en divisant le volume du tuyau considéré par le débit volumique de l'essai.

Dans le système « à circulation fermée », un nombre variable de particules entre dans la colonne à chaque pas de temps élémentaire. Les réponses à des Dirac élémentaires calculées seront donc variables en fonction du nombre de particules entrant. La courbe d'éluion est la somme des réponses à des Dirac élémentaires à pic variable occasionnées aux temps précédents (Figure 3~6).

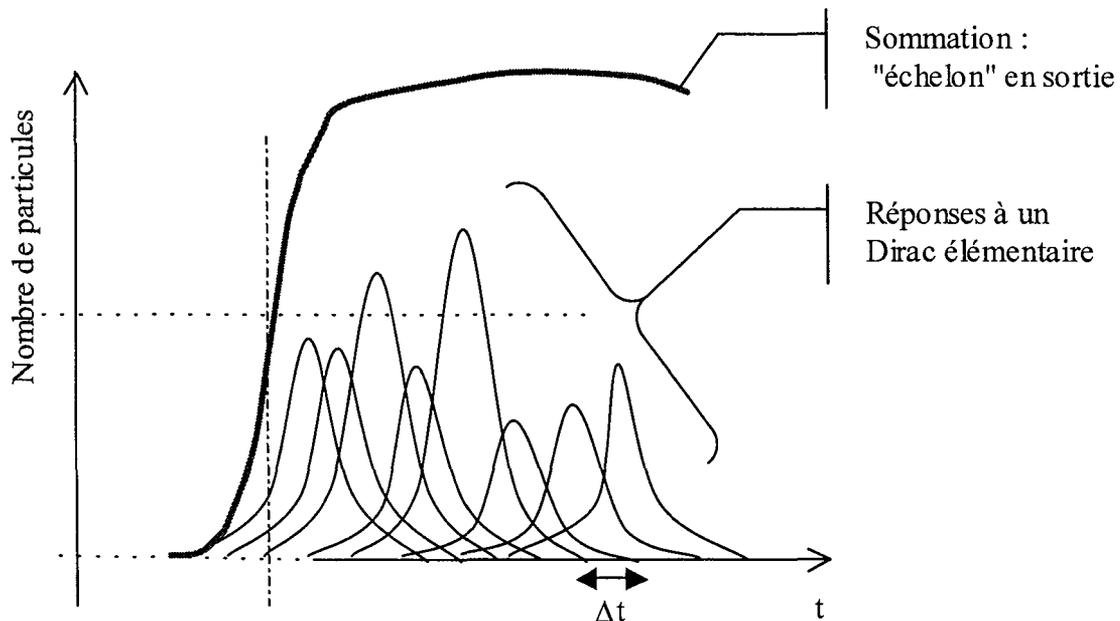


Figure 3~6 : Schéma explicatif - Sommation des réponses à des Dirac élémentaires dans le cas d'une injection variable à chaque pas de temps élémentaire

3~3.6 - Algorithme et programmation

La méthode utilisée pour réaliser le programme, outre les techniques de modélisation détaillées dans les paragraphes précédents, est une discrétisation temporelle (la durée totale du calcul est divisée en pas de temps élémentaires). De plus, le nombre de particules imposé au départ régit la sensibilité du résultat des simulations.

La difficulté majeure rencontrée dans cet algorithme est due à la multiplicité des variables physiques considérées. En effet, les équations mathématiques qui sont utilisées dans le code de calcul

font intervenir respectivement une position élémentaire (marche au hasard), un nombre (filtration) et une concentration (mélange dans le réservoir).

Or, il convient de remarquer que ces trois notions peuvent aisément s'utiliser à tour de rôle. En effet, en ce qui concerne la modélisation du transport au sein de la colonne, la position de chaque particule est connue au temps t . À tout moment, on peut donc revenir au nombre de particules éluées, *i.e.* : à un nombre par pas de temps élémentaire. À débit volumique et pas de temps constants, le nombre d'oocystes qui traversent un volume en un temps Δt et la concentration sont proportionnels.

L'algorithme suivant (Figure 3~7) synthétise les commentaires des paragraphes précédents.

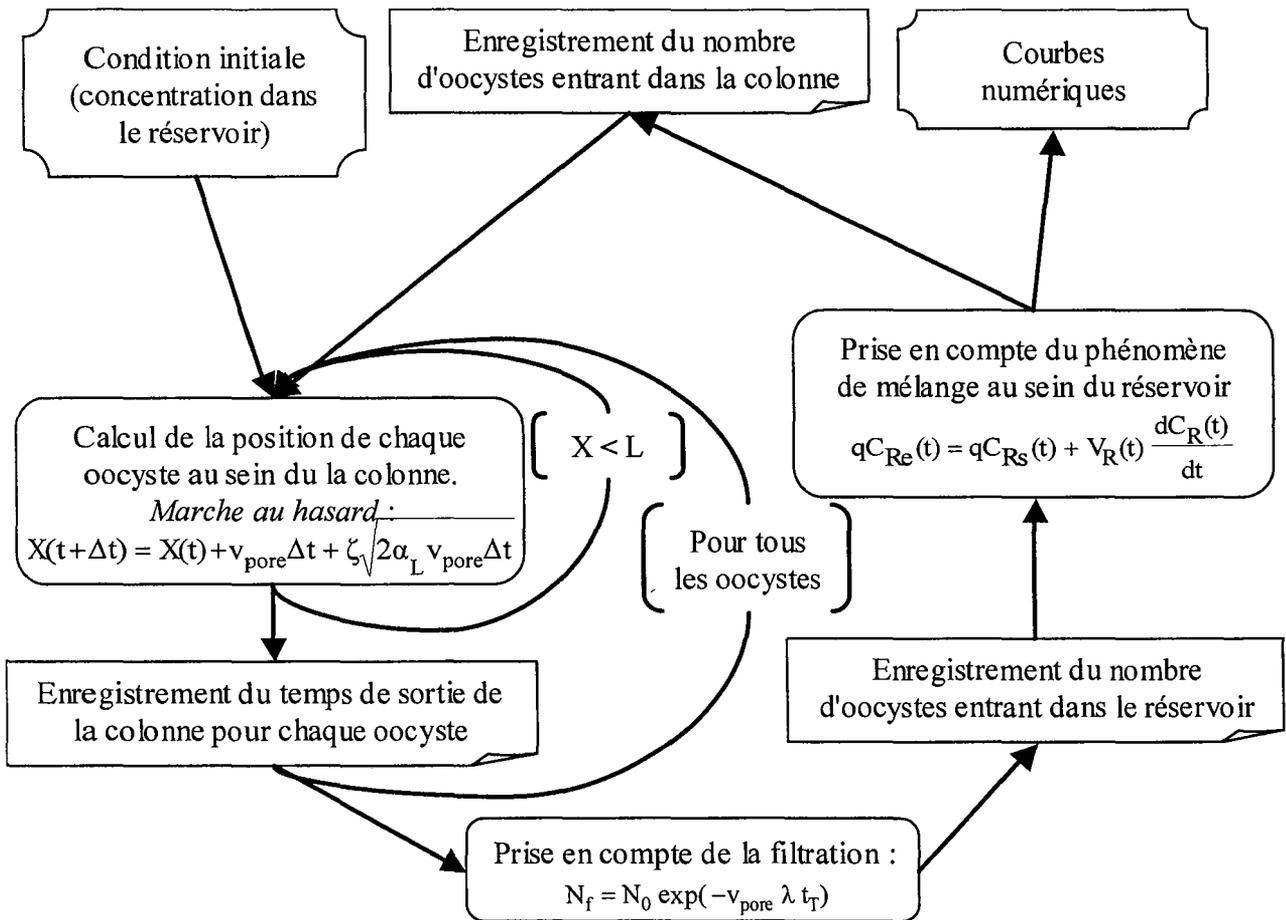


Figure 3~7 : Algorithme sommaire du programme de l'essai en colonne à circulation fermée

Ainsi, les calculs sont réalisés sur l'ensemble de la durée des simulations par pas de temps itératifs. Le nombre de particules dans le réservoir et en sortie de colonne est enregistré à chaque pas de temps.

Le programme a été écrit en langage C à l'aide du logiciel Microsoft® Visual C++ version 6.0. Le programme permet de réaliser l'ajustement des courbes numériques avec des points expérimentaux (§ 3~4.2). Il prend également en compte d'éventuels prélèvements dans le réservoir. Une interface réalisée sous Microsoft® Visual Basic version 6.0 permet de constituer tous les fichiers d'entrée nécessaires avec des feuilles Microsoft® Excel, et renvoi les fichiers de sortie, contenant

les concentrations pour chaque pas de temps aux points d'enregistrement sélectionnés, dans un classeur Microsoft® Excel.

3~4 - ESTIMATION DES PARAMÈTRES HYDRODYNAMIQUES

L'estimation des paramètres hydrodynamiques (débit volumique, porosité cinématique et coefficient de dispersivité longitudinale) s'obtient par calage sur les données expérimentales d'un traçage au NaCl. Nous avons donc, dans un premier temps, cherché les paramètres qui influencent nettement l'évaluation du coefficient de filtration colloïdale. Dans un deuxième temps, nous avons déterminé la technique d'ajustement adéquate. Enfin, dans un troisième temps, nous avons évalué les critères d'ajustement à imposer pour obtenir ces paramètres avec une précision convenable.

3~4.1 - Paramètres hydrodynamiques influents

Une simulation numérique de l'essai en colonne à circulation fermée, appelée simulation de référence, a été réalisée avec un jeu de paramètres donnés (Tableau 3~II), *i.e.* : les paramètres hydrodynamiques (coefficient de dispersivité longitudinale, porosité cinématique et débit volumique), les paramètres de forme (volume du réservoir et longueur de colonne) et le paramètre de rétention (coefficient de filtration colloïdale). Par la suite, l'impact de la variation des paramètres hydrodynamiques sur l'estimation du coefficient de filtration colloïdale a été déterminé et comparé à la valeur obtenue par la simulation de référence. La modification du coefficient de dispersivité longitudinale (α_L) a une influence limitée sur la valeur du coefficient de filtration colloïdale (Tableau 3~II).

Notons que dans l'équation (3~21), qui correspond à l'écriture en variables adimensionnelles de l'équation (3~9), pour des valeurs différentes de α_L , seul le terme Pe_{col} varie. Sur la Figure 3~8, la variation du coefficient de dispersivité longitudinale influe sur la pente de la « percée ». Cette différence modifie alors la valeur de la concentration en sortie de colonne, ce qui se répercute sur la concentration entrant dans le réservoir $C_{Re}(t)$. Comme l'évolution de la concentration dans le réservoir $C_R(t)$ ne varie quasiment pas (Figure 3~8) et que le modèle estime le coefficient de filtration colloïdale à partir de celle-ci (§ 3~3.3), il est justifié de ne pas estimer le coefficient de dispersivité longitudinale avec le modèle. Il sera alors pris égal au diamètre moyen des grains (*i.e.* : valeur à 50 % de la courbe granulométrique).

$$\frac{\partial C^*}{\partial t^*} = \frac{1}{Pe_{col}} \frac{\partial^2 C^*}{\partial x^{*2}} - \frac{\partial C^*}{\partial x^*} - \lambda L C^* \quad (3~21)$$

avec $C^* = \frac{C_C}{C_0}$, $x^* = \frac{x}{L}$, $t^* = \frac{t v_{pore}}{L}$ et $Pe_{col} = \frac{L}{\alpha_L}$

où C_C : concentration dans la colonne à la position x et au temps t [ML^{-3}],

C_0 : concentration de la solution injectée [ML^{-3}],

Pe_{col} : nombre de Péclet de colonne [-],

λ : coefficient de filtration colloïdale [L^{-1}],

x : position dans la colonne [L],

- L : longueur de la colonne [L],
- t : temps [T],
- v_{pore} : vitesse moyenne de pore [LT^{-1}],
- α_L : coefficient de dispersivité longitudinale [L].

Seuls le débit volumique (q) et la porosité cinématique (ϵ) influencent nettement l'estimation par le code de calcul du coefficient de filtration colloïdale (Tableau 3~II). Ce sont donc uniquement ces deux paramètres qui seront modifiés pour l'ajustement des points expérimentaux du traçage avec la courbe obtenue par la simulation numérique.

Tableau 3~II : Influence des paramètres hydrodynamiques sur la détermination du coefficient de filtration colloïdale par rapport à une simulation de référence

$\alpha_L \times 10^4 \text{ (m)}$	$\lambda \text{ (m}^{-1}\text{)}$	ϵ	$\lambda \text{ (m}^{-1}\text{)}$	$q \text{ (ml/min)}$	$\lambda \text{ (m}^{-1}\text{)}$
1	8,88	0,30	8,88	4,0	10,75
8*	9,00	0,32*	9,00	4,1	9,69
10	9,00	0,35	8,88	4,2	9,38
20	9,00	0,40	8,56	4,3*	9,00
50	9,50	0,45	8,25	4,4	8,44
100	9,63	0,50	7,94	4,5	8,13

* : Paramètres de la simulation de référence ($V_R = 50 \text{ ml}$; $L = 0,138 \text{ m}$; $\alpha_L = 8 \times 10^{-4} \text{ m}$; $\epsilon = 0,32$; $q = 4,3 \text{ ml/min}$; $\lambda = 9 \text{ m}^{-1}$)

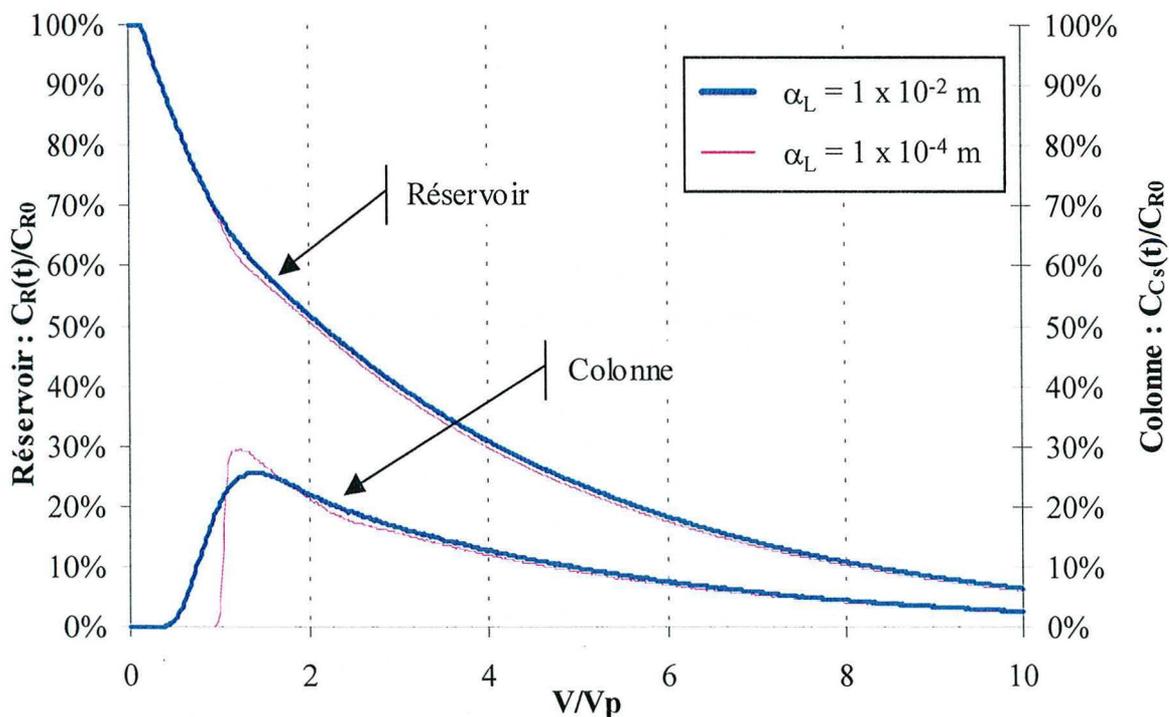


Figure 3~8 : Évolution de la concentration réduite dans le réservoir et en sortie de colonne - Influence du coefficient de dispersivité longitudinale sur les résultats des simulations numériques

Paramètres de la simulation : $V_R = 50 \text{ ml}$; $L = 0,135 \text{ m}$; $\epsilon = 0,32$; $q = 4,3 \text{ ml/min}$; $\lambda = 9 \text{ m}^{-1}$; 10^5 particules ; $\Delta t = 5s$.

3~4.2 - Technique d’ajustement du débit volumique et de la porosité cinématique

Suite à un traçage au NaCl, l’ajustement du débit volumique et de la porosité cinématique est réalisé par calage sur les points expérimentaux mesurés à l’aide une cellule conductimétrique montée en ligne à la sortie de la colonne. Afin d’obtenir des courbes numériques comparables aux points expérimentaux, *i.e.* : correspondant à un même point géométrique du circuit (influence des temps de parcours dans les tuyaux), le modèle numérique a été conçu de façon à pouvoir stocker le nombre de particules passant au niveau de la cellule de conductimétrie à chaque pas de temps. Comme le montre la Figure 3~9, la porosité cinématique a une influence aussi bien sur la position du « plateau », *i.e.* : lorsque la concentration devient constante, que sur celle de la « percée », alors que le débit volumique n’influe que sur la « percée ». En conséquence, la porosité cinématique est ajustée en premier et le débit volumique en second.

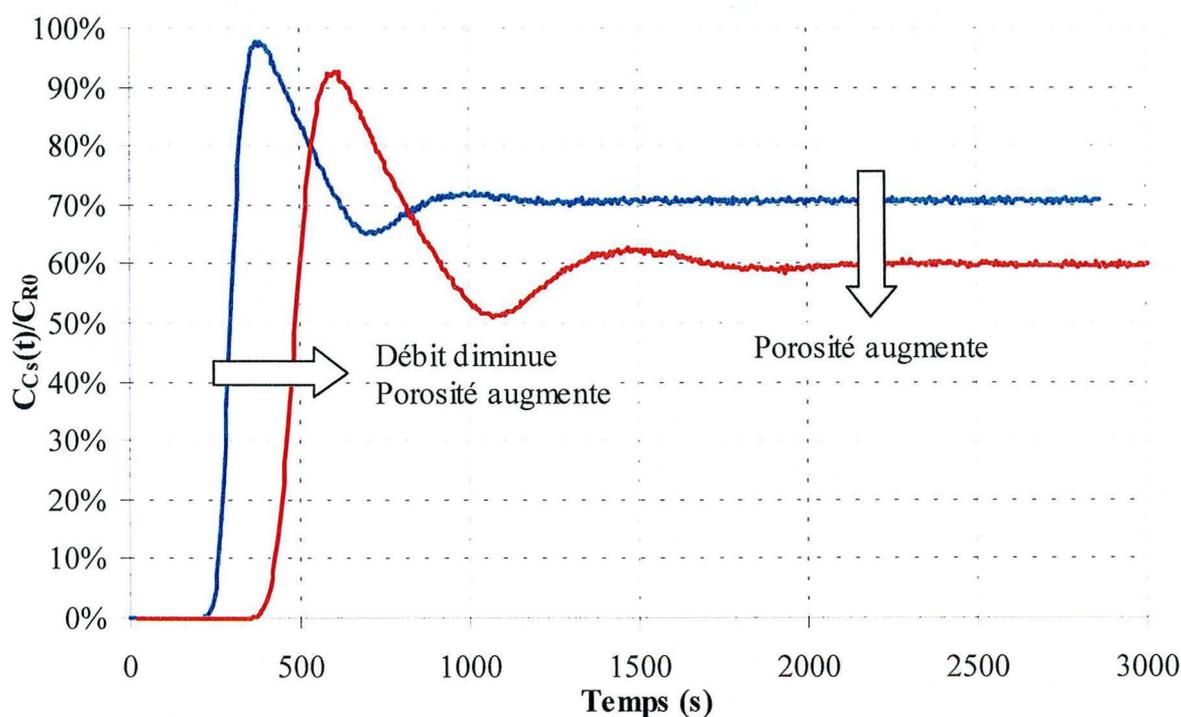


Figure 3~9 : Évolution de la concentration réduite en sortie de colonne - Influence du débit volumique et de la porosité cinématique sur les simulations numériques

La technique d’ajustement est une dichotomie autour d’une valeur imposée initialement. Pour le débit volumique, cette valeur est déterminée avec une mesure par pesée et, pour la porosité cinématique, elle est prise égale à 0,4 (valeur classique pour des colonnes de sable). Le code de calcul réalise alors une simulation de l’ensemble de l’essai de traçage au NaCl avec ces valeurs imposées. Un test compare ensuite les valeurs moyennes des « plateaux » calculées à partir des points expérimentaux et des valeurs numériques obtenues par la simulation. Si l’écart en valeur absolue entre les moyennes des « plateaux » est supérieur à une valeur fixée par l’utilisateur, le modèle numérique réalise une autre simulation avec une nouvelle valeur pour la porosité cinématique (supérieure ou inférieure à la valeur initiale) en fonction du signe de l’écart (positif ou négatif). Cette procédure dichotomique est répétée jusqu’à l’obtention d’une valeur de porosité cinématique en accord avec le test de comparaison. Une fois la valeur de la porosité cinématique établie, le modèle fait une estimation du débit volumique. Pour cela, les deux points expérimentaux encadrant la valeur à 50 % de la

« percée » sont comparés aux deux valeurs numériques correspondantes. Par une procédure identique à celle utilisée pour la porosité cinématique, une estimation du débit volumique est obtenue.

Une fois les paramètres hydrodynamiques estimés, la simulation de l'essai avec la solution en oocystes peut être menée afin de déterminer le seul paramètre inconnu restant : le coefficient de filtration colloïdale.

3~5- VALIDATION DU MODÈLE NUMÉRIQUE

La validation du modèle numérique de l'essai en colonne à circulation fermée s'est déroulée en trois étapes [MARLY *et al.*, 2001] :

- validation par la solution théorique dans le cas d'une injection constante : colonne seule,
- validation par la solution théorique dans le cas d'une injection constante et un traçage expérimental au NaCl : réservoir seul,
- validation de l'ensemble par un traçage expérimental au NaCl (par définition, seuls les phénomènes d'advection et de dispersion sont possibles).

3~5.1 - Colonne seule : solution théorique

La partie concernant la colonne seule a pu être validée par une solution analytique. En effet, l'équation de transport en variables dimensionnelles (3~9) ou en variables adimensionnelles (3~21) pour une injection en entrée de colonne à concentration constante C_0 (Figure 3~10) peut être résolue par transformée de LAPLACE. La solution en variables adimensionnelles s'exprime par :

$$C^*(x^*, t^*) = \frac{1}{2} \left[\exp\left(A_- \frac{x^*}{2}\right) \operatorname{erfc}(B_-) + \exp\left(A_+ \frac{x^*}{2}\right) \operatorname{erfc}(B_+) \right] \quad (3~22)$$

$$\text{avec : } A_{\pm} = \operatorname{Pe}_{\text{col}} \pm \sqrt{\operatorname{Pe}_{\text{col}}^2 + 4M_C \operatorname{Pe}_{\text{col}}}, \quad B_{\pm} = \frac{1}{2} \left(\frac{\sqrt{\operatorname{Pe}_{\text{col}}} x^* \pm \sqrt{\operatorname{Pe}_{\text{col}} + 4M_C t^*}}{\sqrt{t^*}} \right), \quad M_C = \lambda L,$$

$$C^* = \frac{C_C}{C_0}, \quad x^* = \frac{x}{L}, \quad t^* = \frac{t v_{\text{pore}}}{L} \quad \text{et} \quad \operatorname{Pe}_{\text{col}} = \frac{L}{\alpha_L}$$

où C_C : concentration dans la colonne à la position x et au temps t [ML^{-3}],

C_0 : concentration de la solution injectée [ML^{-3}],

$\operatorname{Pe}_{\text{col}}$: nombre de Péclet de colonne [-],

λ : coefficient de filtration colloïdale [L^{-1}],

L : longueur de la colonne [L],

v_{pore} : vitesse moyenne de pore [LT^{-1}],

α_L : coefficient de dispersivité longitudinale [L],

erfc : fonction erreur complémentaire.

avec condition initiale : $C_C(x, t=0) = 0 \quad \forall x,$

conditions aux limites : $C_C(x=0, t) = C_0 \quad \forall t > 0,$

$\lim_{x \rightarrow \infty} C_C(x, t) = 0 \quad \forall t > 0$ (milieu semi-infini).

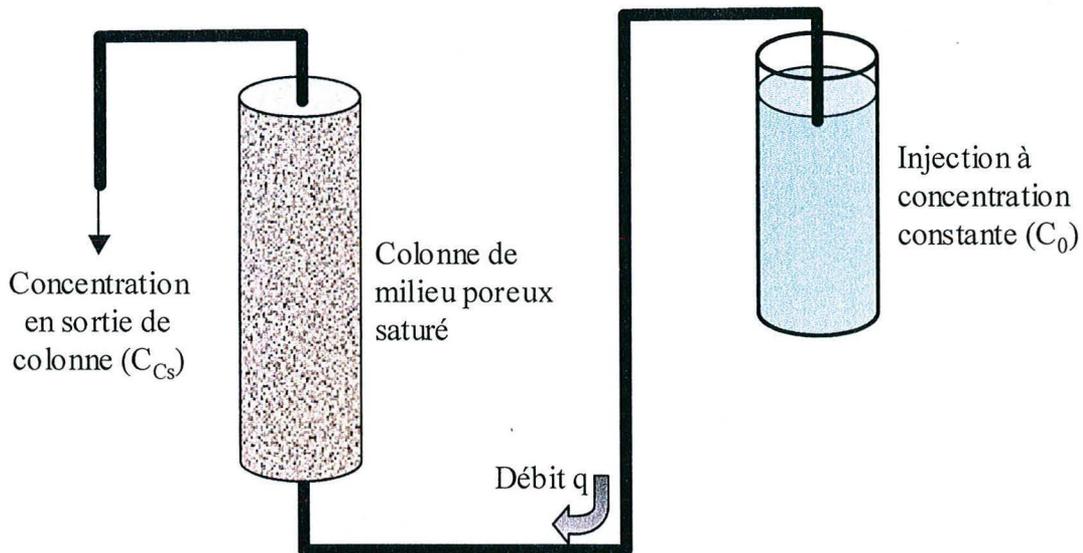


Figure 3~10 : Schéma du dispositif de l'essai en colonne ouverte

Les résultats de la solution analytique (3~22) et de la modélisation de la colonne seule (§ 3~3.3) sont présentés sur la Figure 3~11, avec en abscisses un temps réduit – volume élué (V) sur volume de pore (V_p) – et en ordonnées une concentration réduite – concentration en particules éluées ($C_{Cs}(t)$) sur concentration injectée (C_0) –. On ne peut que constater l'excellente adéquation qui existe entre la courbe théorique et les résultats obtenus numériquement par le modèle. Les oscillations sur le plateau sont fonction du nombre initial de particules. Témoin d'un processus aléatoire (modélisation de la dispersion), les amplitudes de ces oscillations diminuent d'autant plus que le nombre de particules est grand.

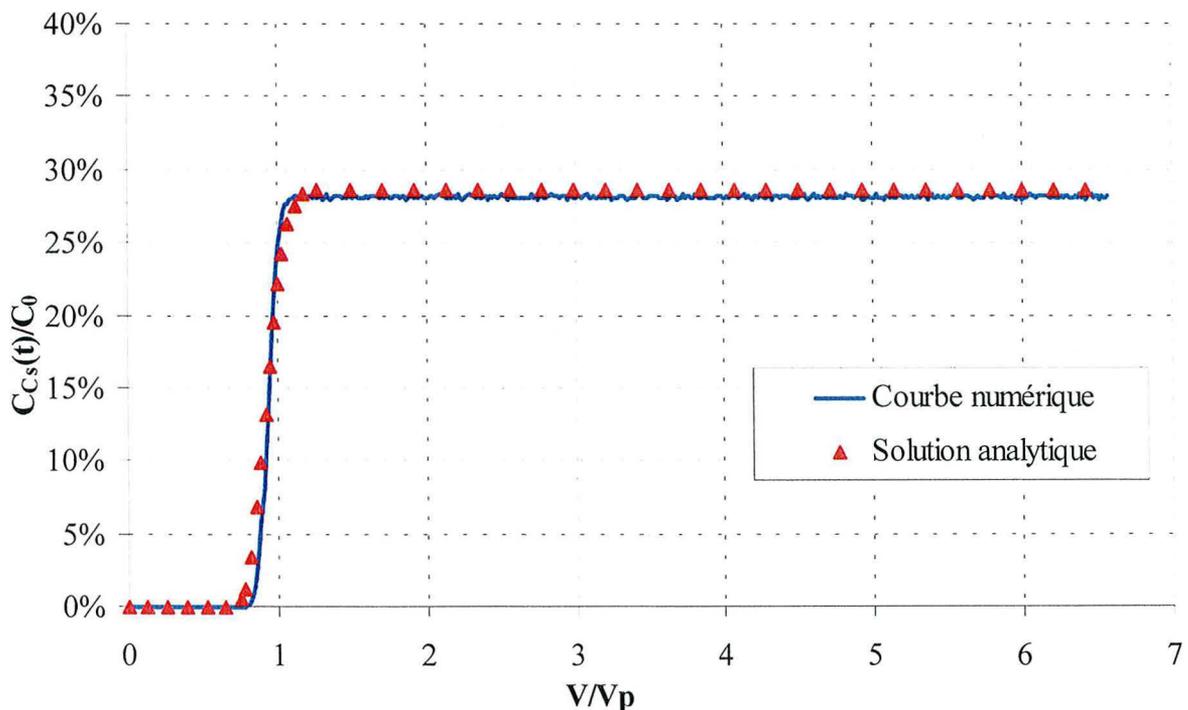


Figure 3~11 : Comparaison entre les courbes obtenues en sortie de colonne ouverte avec la méthode de résolution par marche au hasard et la solution analytique

Paramètres hydrodynamiques : $L = 0.14$ m ; $\alpha_L = 8 \times 10^{-4}$ m ; $\varepsilon = 0,32$; $q = 4,26$ ml/min ; $\lambda = 9$ m⁻¹.

Paramètres de la simulation : 10^5 particules ; $\Delta t = 1$ s.

3~5.2 - Réservoir seul : solution théorique et traçage expérimental au chlorure de sodium

En supposant que le réservoir soit assimilable à un mélangeur parfait et dans le cas d'une injection à concentration constante C_0 dans le réservoir (dont la concentration initiale est C_{R0}), il est nécessaire de distinguer deux types de fonctionnement : (i) sans prélèvement et (ii) avec prélèvements.

(i) S'il n'y a pas de prélèvement dans le réservoir, $\beta(t)$ est alors constant. L'équation (3~11) se résout simplement :

$$C_R(t) = (C_{R0} - C_0) e^{-\beta t} + C_0 \tag{3~23}$$

et si on opte pour une représentation en concentration réduite, l'équation (3~23) devient :

$$\frac{C_R(t) - C_0}{C_{R0} - C_0} = e^{-\beta t} \tag{3~24}$$

Notons qu'un cas particulier, que nous utiliserons par la suite, où $C_{R0} = 2 C_0$, permet de simplifier l'équation (3~24) :

$$\frac{C_R(t)}{C_{R0}} = \frac{1}{2} (1 + e^{-\beta t}) \tag{3~25}$$

Les résultats de l'équation analytique (3~25) et de la modélisation du mélange dans le réservoir sans prélèvement (§ 3~3.4) sont présentés sur la Figure 3~12. On observe que la simulation du réservoir est en bon accord avec la courbe théorique.

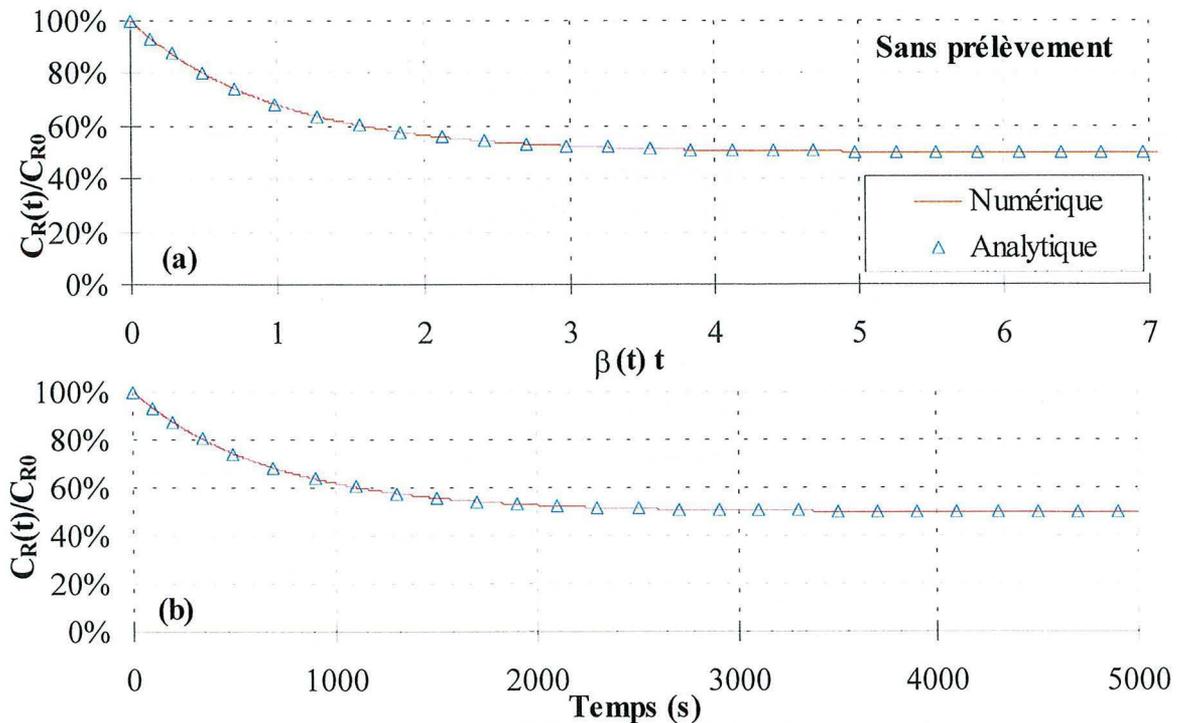


Figure 3~12 : Comparaison entre les courbes de mélange dans le réservoir sans prélèvement obtenues par la solution théorique et le modèle numérique

(a) : variables réduites ; (b) : variables dimensionnelles

Paramètres : $q = 4,26$ ml/min ; $V_R = 50$ ml ; 10^5 particules ; $\Delta t = 5$ s.

(ii) S'il y a des prélèvements dans le réservoir, alors $\beta(t)$ varie comme une fonction en palier. On peut donc résoudre l'équation (3~11) sur les intervalles où $\beta(t)$ est constant (§ 3~3.4). Les résultats de la résolution de l'équation différentielle (3~11) dans le cas d'un mélange dans le réservoir avec prélèvements et injection constante et de la modélisation (§ 3~3.4) sont présentés sur la Figure 3~13. On observe que, ici encore, la simulation du réservoir est en bon accord avec la courbe théorique. Notons que la courbe numérique représentée sur le graphique en variables réduites (Figure 3~13a) est discontinue du fait de la variation en palier de volume de réservoir $V_R(t)$ et donc de $\beta(t)$.

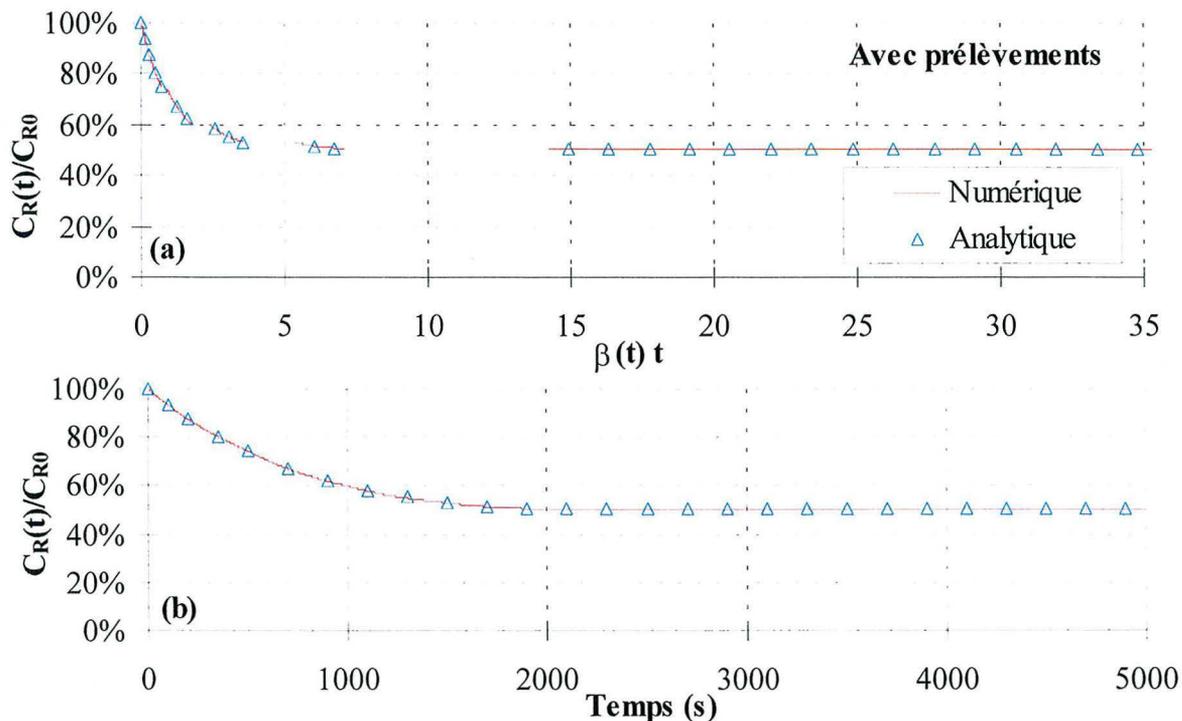


Figure 3~13 : Comparaison entre les courbes de mélange dans le réservoir avec prélèvements obtenues par la solution analytique et le modèle numérique
(a) : variables réduites ; (b) : variables dimensionnelles

Paramètres : $q = 4,26 \text{ ml/min}$; $V_R = 50 \text{ ml}$; 10^5 particules ; $\Delta t = 5 \text{ s}$.
Prélèvements de 10 ml aux temps : {500 s ; 1000 s ; 1500 s ; 2000 s}.

Nous avons aussi validé la modélisation du mélange dans le réservoir avec des résultats expérimentaux provenant d'un essai de traçage au NaCl. Pour cela, un protocole de mélange dans le réservoir avec une injection à concentration constante en NaCl (C_0) et en réalisant des prélèvements dans le réservoir a été mis en place (Figure 3~14). La concentration initiale en NaCl dans le réservoir (C_{R0}) est égale à deux fois la concentration injectée (C_0).

Cette expérimentation permet de valider la résolution numérique de l'équation (3~11) du bilan de masse dans le réservoir avec des prélèvements pour le cas particulier où la concentration entrante est constante. En effet, les points expérimentaux se superposent à la courbe obtenue numériquement (Figure 3~15). En outre, il semble que l'assimilation du réservoir à un mélangeur idéal soit raisonnable.

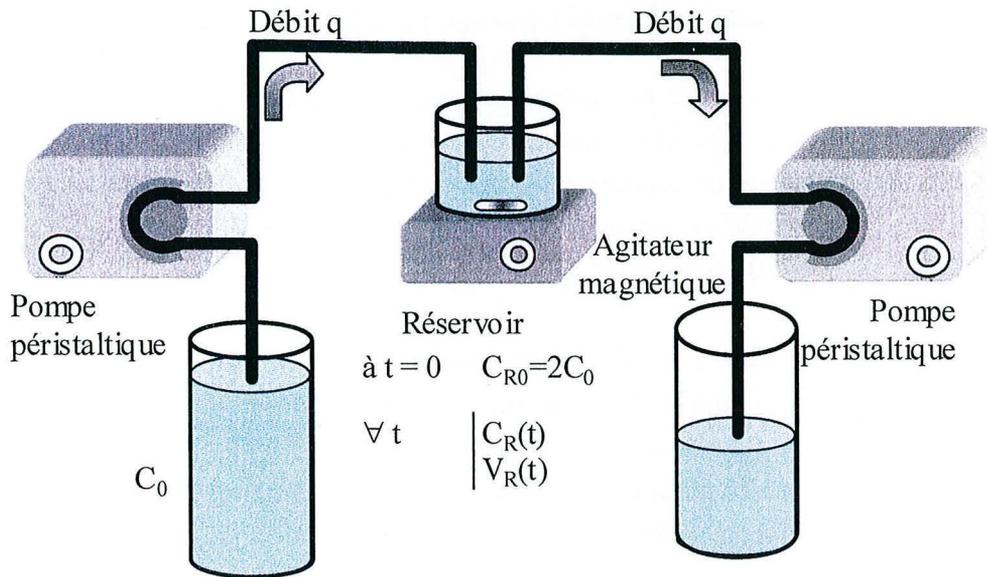


Figure 3~14 : Protocole de l'essai de validation de la modélisation du réservoir

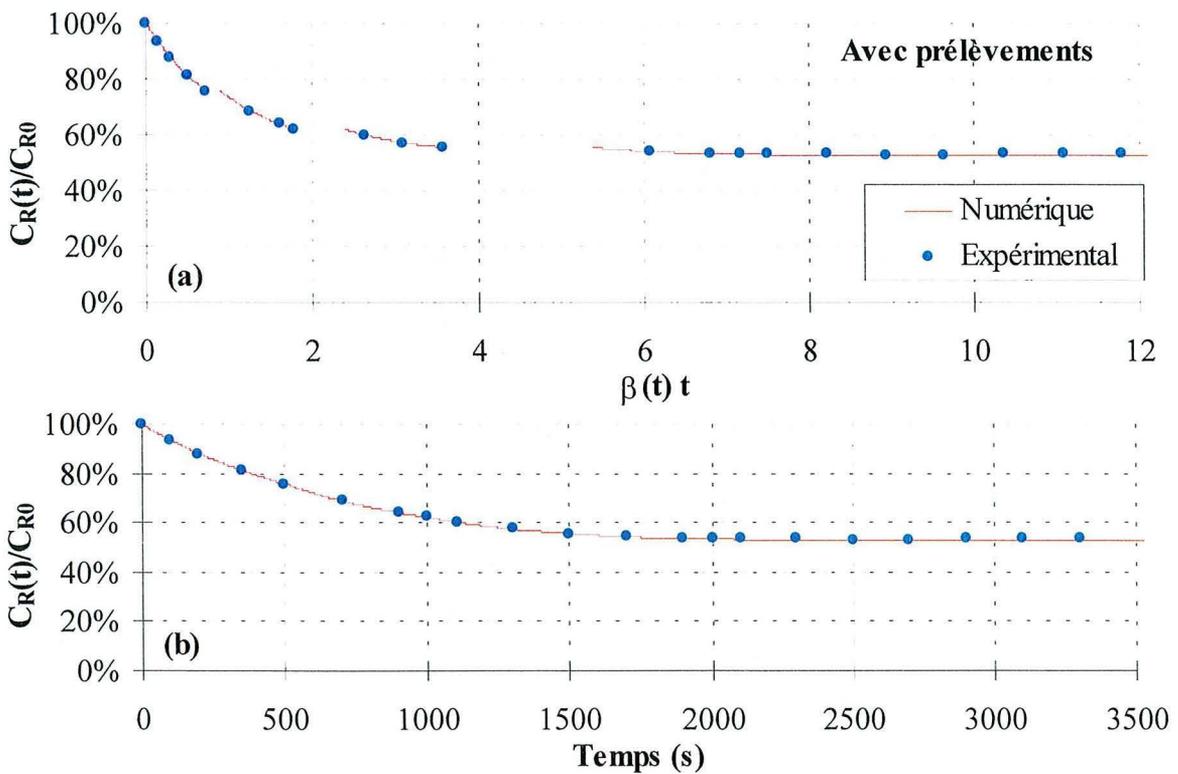


Figure 3~15 : Comparaison entre les courbes de mélange dans le réservoir obtenues par le modèle numérique et les points expérimentaux
(a) : variables réduites ; (b) : variables dimensionnelles

Paramètres : $q = 4,26 \text{ ml/min}$; $V_R = 50 \text{ ml}$; 10^5 particules ; $dt = 1 \text{ s}$.
Prélèvements de 10 ml aux temps : {500 s ; 1000 s ; 1500 s ; 2000 s}.

3~5.3 - Colonne à circulation fermée : traçage au chlorure de sodium

Nous avons réalisé une expérience en colonne à circulation fermée avec un traceur (NaCl). La concentration en NaCl éluée $C_{Cs}(t)$ a été déterminée par cellule conductimétrique montée en ligne à la sortie de la colonne. Le calage de la courbe numérique en sortie de colonne sur les points expérimentaux s’est effectué à partir de la valeur moyenne du « plateau » et des deux points encadrant la valeur à 50 % de la « percée » (Figure 3~16) (§ 3~4.2).

Une fois les paramètres ajustés, la courbe numérique obtenue et la série de points expérimentaux coïncident sur l’ensemble de la courbe. Cette bonne adéquation (alors que seulement trois valeurs, dont la valeur moyenne du « plateau », sont utilisées pour la détermination des paramètres) ainsi que la bonne correspondance des paramètres ajustés avec les paramètres expérimentaux mesurés, valident la simulation de l’essai en colonne à circulation fermée.

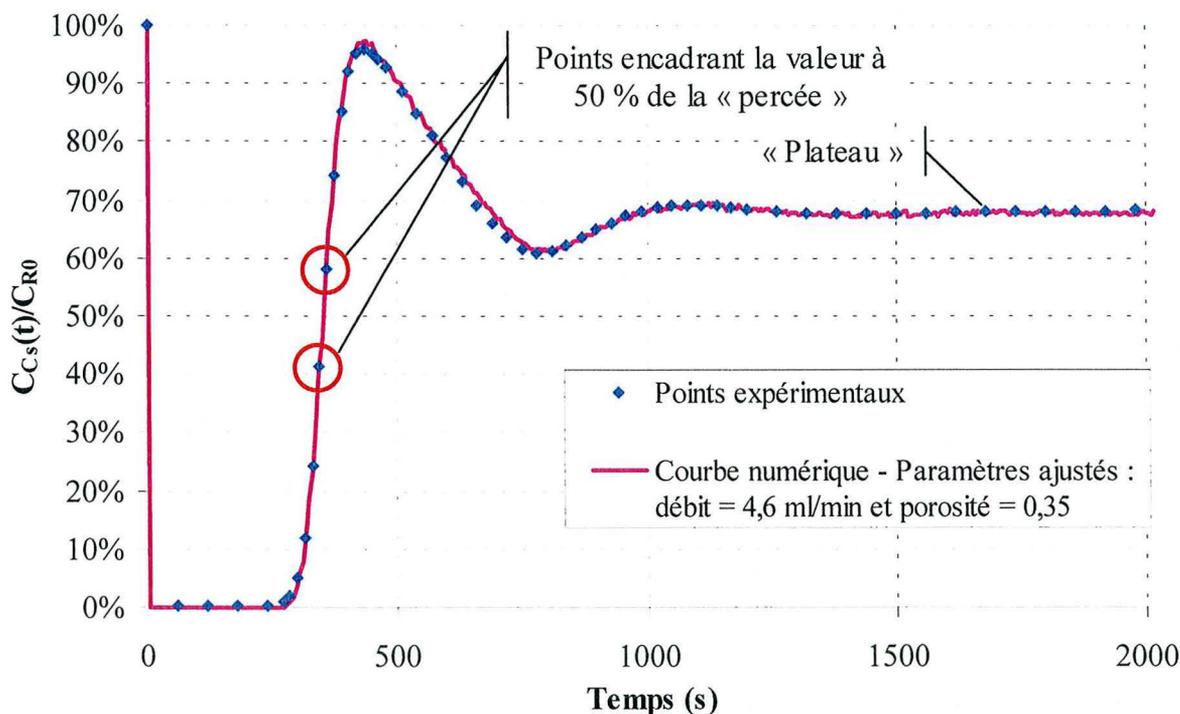


Figure 3~16 : Évolution de la concentration réduite en sortie de colonne - Comparaison entre la courbe numérique et les points expérimentaux

Paramètres de l’essai : $\alpha_L = 8 \times 10^{-4}$ m ; $V_R = 50$ ml. Paramètres de la simulation : 10^5 particules ; $\Delta t = 5$ s.

Le modèle retranscrit donc convenablement les phénomènes physiques de l’essai. Le premier point situé sur l’axe des ordonnées à 100% traduit que la solution est, initialement, homogénéisée dans les tuyaux et le réservoir. Puis, la solution, sans NaCl, contenue dans la colonne arrive au niveau de la cellule conductimétrique, ce qui implique une concentration nulle. Après un certain temps, la solution a lessivé totalement la colonne et la solution saline diluée atteint la cellule : c’est ce que nous appelons la « percée ». Enfin, la valeur de la concentration va osciller jusqu’à atteindre un « plateau » correspond à l’homogénéisation de la concentration dans l’ensemble du circuit : colonne, réservoir et tuyaux.

3-6- CONCLUSION

La validation du modèle numérique de l'essai en colonne à circulation fermée s'est donc faite en plusieurs étapes (colonne seule, réservoir, ensemble du système). En outre, la concentration en oocystes en trois points du système (à la sortie de la colonne, dans le réservoir et au niveau de la cellule conductimétrique) par pas de temps élémentaires et cela sur toute la durée de l'essai peut être connue et stockée. Avec l'hypothèse de mélangeur idéal, l'équation du bilan de masse dans le réservoir se résout par discrétisation (schéma aval) sur chaque intervalle où le volume du réservoir reste constant. Il est donc désormais possible de déterminer l'évolution de la concentration en sortie de colonne à partir de celle mesurée dans le réservoir. Enfin, le principe utilisé n'est pas d'ajuster une courbe théorique sur des points expérimentaux, mais de simuler numériquement l'ensemble de l'essai et de déterminer la courbe la plus proche des points expérimentaux, en faisant varier la porosité cinématique et le débit volumique, ou le coefficient de filtration colloïdale. Ainsi, peu de points expérimentaux sont nécessaires, à condition que la mesure soit précise. La prochaine étape consiste à développer le protocole expérimental de l'essai en colonne à circulation fermée et à définir sa mise en œuvre, afin de réaliser des essais et de déterminer la filtration des oocystes au sein d'une colonne de milieu poreux saturé.

CHAPITRE 4

ESSAIS EN COLONNE À CIRCULATION FERMÉE : ÉTUDE DE LA FILTRATION

RÉSUMÉ

Le modèle numérique de l'essai en colonne à circulation fermée étant terminé et validé, nous pouvons désormais développer le protocole expérimental. Dans un premier temps, nous avons sélectionné le matériel, puis le volume du réservoir et des prélèvements, ... Ces choix ont été réalisés en s'appuyant sur les principes de résolution de notre modèle et sur des simulations et des tests préliminaires. Notamment, il était important de mettre en place des systèmes permettant d'assurer l'hypothèse de mélangeur idéal. Dans un deuxième temps, nous avons défini la mise en œuvre du protocole, notamment les conditions de remplissage et de saturation de la colonne, afin que les essais puissent être réalisés dans des conditions équivalentes. Dans un troisième temps, nous avons mené des essais en colonne à circulation fermée afin de déterminer les paramètres qui influencent le transport des oocystes de *C. parvum* dans un milieu poreux saturé. L'ensemble des essais réalisés peut être divisé en trois séries en fonction des objectifs fixés et des résultats obtenus. La première série d'essais avait pour objectif de déterminer l'influence du débit et de la granulométrie, la deuxième série l'influence de l'âge des oocystes et la troisième série pour tenter de valider nos résultats sur un lot différents d'oocystes. Les résultats de nos essais n'indiquent pas un comportement unique des oocystes de *C. parvum*. Nous avons constaté une influence de la granulométrie et de la vitesse d'écoulement. Cependant, d'autres paramètres semblent également avoir une influence, comme l'âge des oocystes, mais aussi l'origine des oocystes, *i.e.* : le lot d'oocystes.

**C'est par l'expérience que la science et l'art
font leur progrès chez les hommes.**

ARISTOTE (384-322 av. J.-C.),
philosophe grec.

4~1 - INTRODUCTION

La première partie du développement des essais en colonne à circulation fermée a consisté à étudier la faisabilité de tels essais d'un point de vue essentiellement théorique, notamment, en ce qui concerne les techniques de dépouillement afin d'interpréter efficacement les résultats expérimentaux. Nous pouvons donc désormais développer le protocole expérimental des essais en colonne à circulation fermée. Des précautions particulières sont à prendre, comme la sélection du matériel, du volume du réservoir et des prélèvements, ... Ces choix doivent s'appuyer sur les principes utilisés dans les techniques de résolutions de notre code de calcul, ainsi que sur des résultats de simulations et de tests préliminaires. Après avoir mis au point le protocole expérimental, sa mise en œuvre doit être définie, notamment les conditions de remplissage et de saturation de la colonne, afin que les différents essais puissent être effectués dans des conditions équivalentes. Les essais pourront alors être réalisés afin de déterminer les paramètres qui influent sur le transport des oocystes de *C. parvum* dans un milieu poreux saturé. Il conviendra alors de modifier les conditions des essais afin de mettre en évidence ces paramètres.

4~2 - DÉVELOPPEMENT DU PROTOCOLE EXPÉRIMENTAL

Le protocole expérimental des essais en colonne à circulation fermée a été mis au point à partir de résultats de simulations numériques et d'expériences avec du chlorure de sodium.

4~2.1 - Choix du protocole

La solution dopée en oocystes est puisée dans un réservoir à l'aide d'une pompe péristaltique et injectée au bas de la colonne (Figure 4~1). Après transport sur la longueur de la colonne, la solution éluée en partie supérieure retourne au réservoir. La mise en place d'un shunt ou dérivation permet la saturation en fluide du circuit et l'homogénéisation de la concentration dans les tuyaux et dans le réservoir avant de mener l'essai.

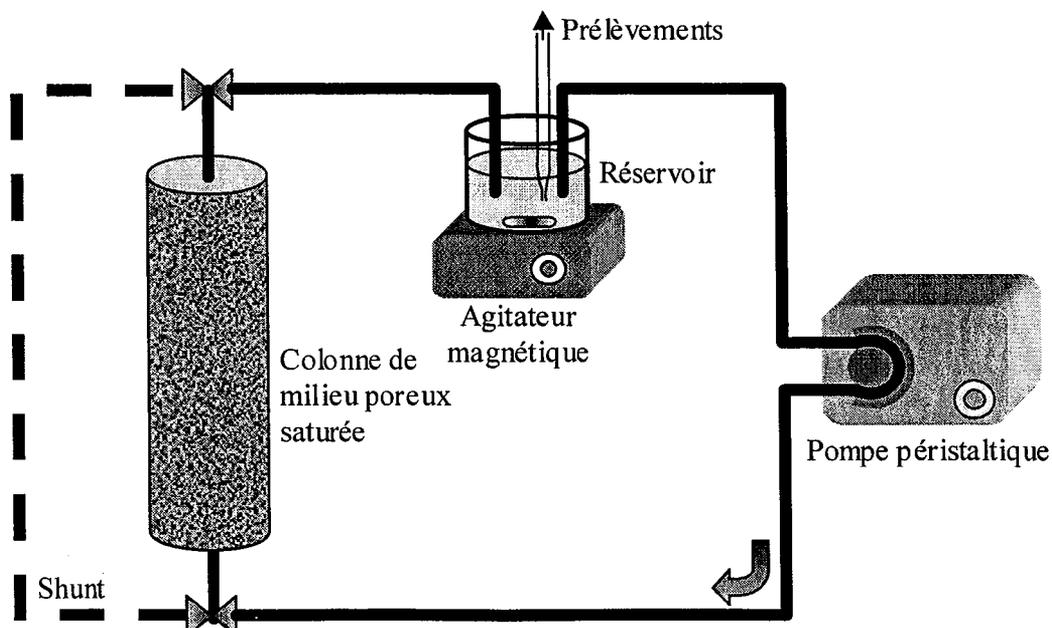


Figure 4~1 : Schéma du dispositif expérimental de l'essai en colonne à circulation fermée

À la suite de plusieurs séries d'expériences et de plusieurs simulations numériques, nous avons utilisé un volume de réservoir de 50 ml, une vitesse de rotation de l'agitateur magnétique de 200 tr/min et une masse de sable de 120 g, ce qui permet de remplir convenablement notre colonne (diamètre interne de 26 mm et longueur de 150 mm, Superformance®, Merck Corp., Darmstadt, Allemagne). Ces choix trouveront des justifications dans les paragraphes suivants.

a) Choix du volume du réservoir

Les premiers essais avec du chlorure de sodium ont soulevé un problème concernant le temps d'homogénéisation dans le réservoir. Afin de le minimiser, il est apparu judicieux de choisir un faible volume pour le réservoir. En outre, plus le volume du réservoir est faible, plus l'inertie du réservoir est petite. De plus, l'utilisation d'un agitateur magnétique, afin de s'approcher de l'hypothèse de mélangeur idéal (§ 3~3.4), nécessite quelques précautions, en particulier pour éviter :

- de créer des bulles d'air afin de maintenir la saturation en eau du circuit,
- d'altérer les oocystes par l'intermédiaire du barreau magnétique de l'agitateur.

Des tests ont été réalisés pour vérifier que des oocystes ne pouvaient pas être perdus par altération. Cinquante millilitres d'une suspension dopée en oocystes de titre connu ont été introduits dans le réservoir et soumis à une agitation de 200 tr/min avec un barreau magnétique (barreau droit à enrobage Téflon®, sans anneau central, de diamètre 4,5 mm et de longueur 12 mm) pendant 30 minutes. Les résultats de ces tests ont indiqué une perte de 5 % en oocystes, ce qui est inférieur à la précision de mesure. Il n'y a donc pas de perte détectable liée à une altération voire une destruction des oocystes par le barreau magnétique (dans ces conditions d'essai).

b) Choix du volume des prélèvements

L'importance du volume des prélèvements pour obtenir des échantillons représentatifs a déjà été soulignée précédemment (§ 2~4.3). Nous avons introduit 50 ml d'une suspension dopée en oocystes de titre connu dans un réservoir, puis réalisé des prélèvements de 1 ml et de 10 ml. Ces tests ont montré que, là encore, des prélèvements de 10 ml sont préférables (3 % d'écart par rapport à la concentration de la suspension dopée en oocystes, au lieu de 15 % pour les prélèvements de 1 ml).

En outre, une série de tests avec le modèle numérique a montré que le coefficient de filtration colloïdale peut être déterminé à partir d'un seul point expérimental, à la condition que celui-ci soit exact. Il apparaît donc que peu de points expérimentaux sont nécessaires. Ce résultat permet de combiner un réservoir de faible volume et un volume de prélèvements importants en limitant leur nombre.

c) Choix des tuyaux du circuit

Il est important que les tuyaux soient inertes vis-à-vis des oocystes. Nous avons testé des tuyaux spéciaux pour les pompes péristaltiques et adaptés aux études microbiologiques (diamètre interne de 1,60 mm et externe de 4,80 mm, Pharmed®, Norton Inc.). En outre, il est possible que les galets de

la pompe, en écrasant les tuyaux, lèsent les oocystes. Pour cela, une suspension dopée en oocystes de concentration connue a été mise en mouvement dans un réservoir par une pompe péristaltique (pompe 101 U-R, Watson-Marlow SA, Bruxelles) avec ce type de tuyaux. Les résultats de ce test ont indiqué un déficit en oocystes de 7 %, bien inférieur à la précision de mesure. Les pertes détectables dues aux tuyaux ou à l'action de la pompe, dans ces conditions d'essai, sont négligeables.

d) Choix de la concentration de la suspension en oocystes

Les résultats de simulations numériques ont montré que la quantité d'oocystes introduite dans le réservoir doit être importante. En effet, dans le cas d'une filtration très forte, la concentration dans le réservoir diminue rapidement (pour une filtration totale, il n'y a plus qu'environ 8 % de la concentration initiale au bout de 4 volumes de pores). L'utilisation d'une suspension dopée à $1,5 \times 10^4$ oocystes/ml s'est donc imposée. Avec ce niveau de concentration, une lame réalisée selon le protocole d'immunofluorescence que nous avons développé (§ 1~3.2) contient donc environ 1 500 oocystes, valeur qui se situe en limite supérieure du domaine d'application de ce protocole (§ 1~3.3a).

Avec ce niveau de concentration, l'effet du dépôt des oocystes sur les caractéristiques du milieu poreux (porosité cinématique et diamètre moyen des grains) est effectivement négligeable (§ 3~3.3). En effet, le volume des oocystes introduits pour un volume de réservoir de 50 ml est égal à $4,9 \times 10^{-11} \text{ m}^3$. Or, pour la colonne et les sables utilisés, le volume de pores du milieu poreux est de l'ordre de $2,5 \times 10^{-5} \text{ m}^3$.

4~2.2 - Mise en œuvre du protocole

Le dispositif expérimental de l'essai en colonne à circulation fermée est présenté en Figure 4~2. La mise en œuvre se déroule en deux étapes : la détermination des paramètres hydrodynamiques avec un traçage au chlorure de sodium (NaCl) et l'essai proprement dit avec la solution dopée en oocystes permettant la détermination du coefficient de filtration colloïdale. Ce dernier est réalisé séparément du traçage afin d'éviter une quelconque perturbation du comportement des oocystes par le milieu salin.

a) Montage du dispositif

La colonne est remplie avec le matériau d'étude (sables, § 2~3). Il convient de s'assurer que le sable soit bien saturé en eau et bien tassé, afin d'éviter la présence de macropores ou de strates. Ceux-ci créeraient des écoulements préférentiels et perturberaient de surcroît l'étude du transport des oocystes. Pour cela la colonne est remplie au préalable d'eau, permettant une meilleure saturation, et le sable est ajouté par petites doses en donnant de légers coups sur les parois de la colonne entre chaque ajout. Ce procédé, équivalant à l'utilisation d'une table vibrante, permet l'aménagement optimal des grains, minimisant alors le volume des vides. Nous n'avons pas rempli la colonne par compactage avec, par exemple, un piston vertical, car, avec un sable de cette classe

granulométrique, cette technique induit des tassements différentiels (compactage plus important au contact avec le piston), d'où la création de micro-couches [EMONET, 2001].

En bas de colonne, un lit de billes de verre permet de répartir l'injection sur l'ensemble de la section. Des filtres de 25 μm de diamètre de pores sont placés en entrée et en sortie de colonne afin d'éviter l'intrusion de grains de sables dans les tuyaux. Tout risque de colmatage est ainsi évité.

Une fois la colonne emplie, la longueur du milieu poreux est mesurée (L) et la colonne est placée dans le dispositif (Figure 4~2) pour être rincée à l'eau déminéralisée et distillée. L'indicateur de qualité de rinçage est la conductivité électrique de l'eau en sortie de colonne.

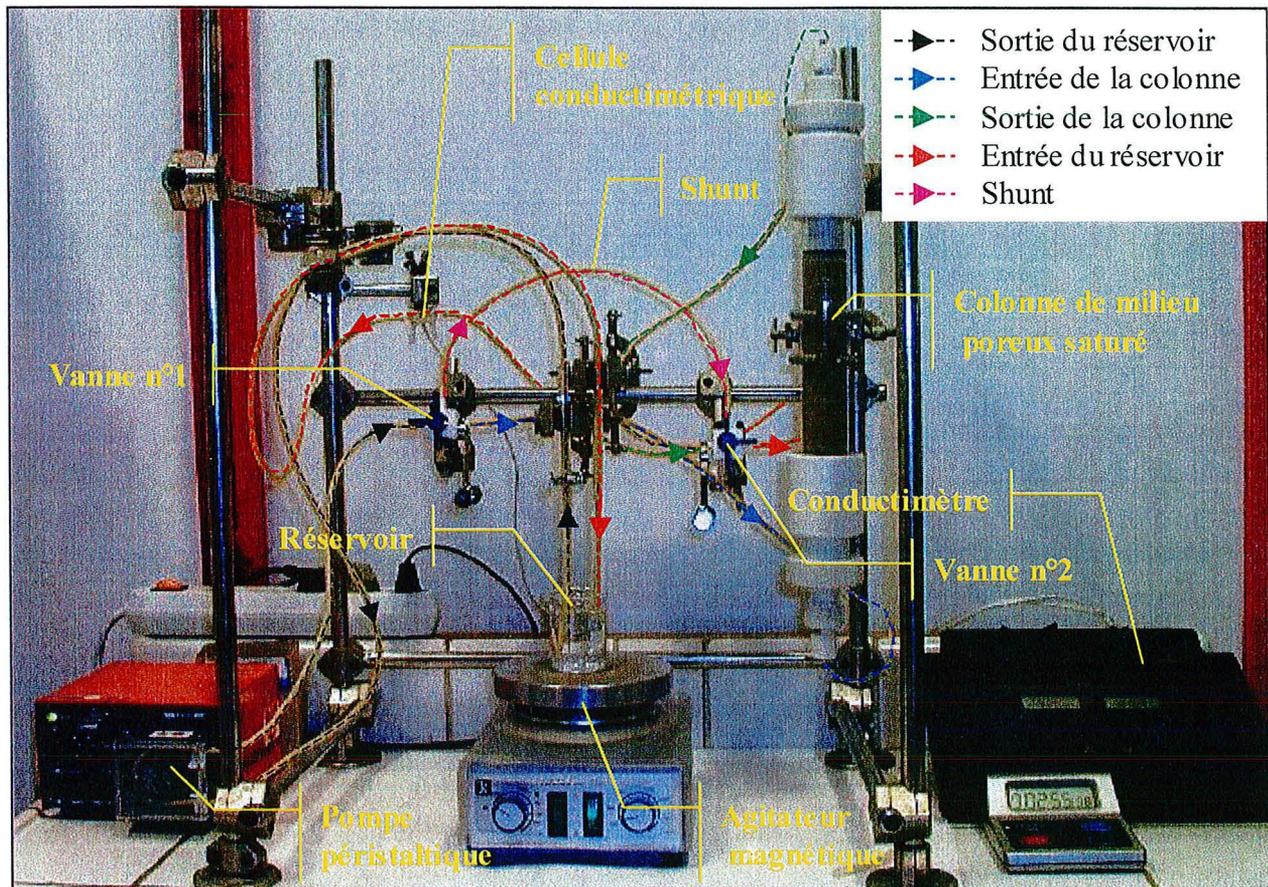


Figure 4~2 : Photo du dispositif expérimental de l'essai en colonne à circulation fermée

b) Traçage au NaCl

Il est indispensable d'estimer les paramètres hydrodynamiques du milieu poreux (volume volumique, porosité cinématique et coefficient de dispersivité longitudinale). Pour cela, on utilise un traçage au NaCl et une mesure par conductimétrie (conductimètre à microprocesseur, LF 537, W.T.M.) à l'aide de la cellule montée en ligne à la sortie de la colonne (Figure 4~2). Après homogénéisation de la solution en NaCl dans le réservoir et le shunt, le circuit incluant la colonne (saturée en eau déminéralisée et distillée après la phase de rinçage du sable) est ouvert. La mesure de la conductivité se poursuit jusqu'à homogénéisation de la concentration dans le circuit.

L'interprétation des mesures de conductivité électrique en sortie de colonne en fonction du temps avec le modèle numérique de l'essai permet la détermination des paramètres hydrodynamiques (§ 3~4).

Après l'essai, un rinçage à l'eau déminéralisée et distillée de la colonne est indispensable pour retrouver un milieu électriquement neutre.

c) Essai avec oocystes

Une fois les paramètres hydrodynamiques de la colonne connus et le rinçage de l'ensemble du circuit réalisé, l'essai se déroule avec une solution dopée en oocystes. Cette solution est préparée afin que la concentration soit autour de $1,5 \times 10^4$ oocystes/ml, puis elle est homogénéisée sur table à agitation rotative à 300 tr/min pendant 20 minutes. Le réservoir est alors rempli, puis la suspension est mise en mouvement dans le circuit shunté pendant quelques minutes afin d'obtenir une bonne homogénéisation de la solution dans le circuit. Ensuite, le circuit incluant la colonne est ouvert et des prélèvements de 10 ml sont réalisés selon une chronologie déterminée à l'avance à l'aide du traçage au NaCl, établie de manière à ce que les concentrations dans les échantillons soient, même en cas de filtration totale, dans le domaine d'application de notre protocole d'immunofluorescence (§ 1~3.3). Le volume initial du réservoir garantit la possibilité de faire 4 prélèvements.

Des échantillons de 10 ml sont prélevés dans le réservoir. Ils sont ensuite vortexés et, comme pour l'analyse des échantillons des essais batch, on réalise deux sous-échantillons de 1 ml. Le titrage, réalisé par immunofluorescence, peut ainsi se faire sur deux sites différents : l'un au Laboratoire Environnement, Géomécanique et Ouvrages (LAEGO) et l'autre au Laboratoire de Bactériologie - Parasitologie.

4~2.3 - Détermination de la rétention significative

Il a déjà été mis en évidence qu'il existe une source d'erreur liée à la précision du titrage. Supposons que lors d'un essai en colonne à circulation fermée il ne se produise aucune rétention. Alors, nous observerons seulement une dilution de la suspension en oocystes du réservoir par l'eau contenue dans le volume de pores de la colonne de milieu poreux saturé. Dans le cas d'un volume de réservoir de 50 ml avec une suspension en oocystes de concentration initiale $1,5 \times 10^4$ oocystes/ml, après obtention de l'équilibre, la concentration dans l'ensemble du circuit serait d'environ 10^4 oocystes/ml (pour la colonne et les sables utilisés, le volume de pores du milieu poreux est de l'ordre de $2,5 \times 10^{-5} \text{ m}^3$). L'évaluation de notre protocole d'immunofluorescence (§ 1~3.3) a montré que, pour une concentration de cet ordre de grandeur, les titrages sont obtenus avec une erreur maximale de $\pm 10 \%$ par rapport à la valeur moyenne (§ 1~3.3). Il serait alors possible de titrer la suspension initiale autour de $1,6 \times 10^4$ oocystes/ml et un échantillon prélevé au début de l'équilibre autour de 9×10^3 oocystes/ml. Une simulation numérique réalisée dans ces conditions a fourni un coefficient de filtration colloïdale de l'ordre de $1,3 \text{ m}^{-1}$. Par conséquent, si le coefficient de filtration

colloïdale obtenu par la simulation numérique est inférieur à $1,3 \text{ m}^{-1}$, il n'est pas possible de conclure s'il y a bien eu filtration dans le milieu poreux ou s'il s'agit d'une erreur de mesure.

En outre, des pertes en oocystes sont possibles durant l'essai en colonne à circulation fermée. Certaines possibilités de pertes ont déjà été indiquées (§ 4-2.1) et, bien qu'elles aient été jugées négligeables individuellement, elles pourraient ensemble devenir importantes. Il est aussi possible que les filtres placés en entrée et en sortie de colonne induisent une rétention significative des oocystes. Pour cette raison, nous avons réalisé un essai sans mettre de sable dans la colonne. Celle-ci est alors seulement emplie d'eau. S'il n'y a pas de perte, la simulation numérique montre qu'au bout de 2 heures la concentration dans le circuit se stabilise à environ 43 % de la concentration initiale (Figure 4-3). Un échantillon a été prélevé au bout de 2h30 et il a indiqué une concentration égale à environ 31 % de la concentration initiale. Il semble donc qu'il y ait eu une légère perte en 2h30. Nous avons alors déterminé que le coefficient de filtration colloïdale qui correspondrait à cette rétention est égal à environ $0,5 \text{ m}^{-1}$ (Figure 4-3). Cette valeur n'est donc pas significative par rapport à la précision du titrage. Ainsi, s'il y a des pertes en oocystes, elles sont faibles et notre protocole ne permet pas de les prendre en compte.

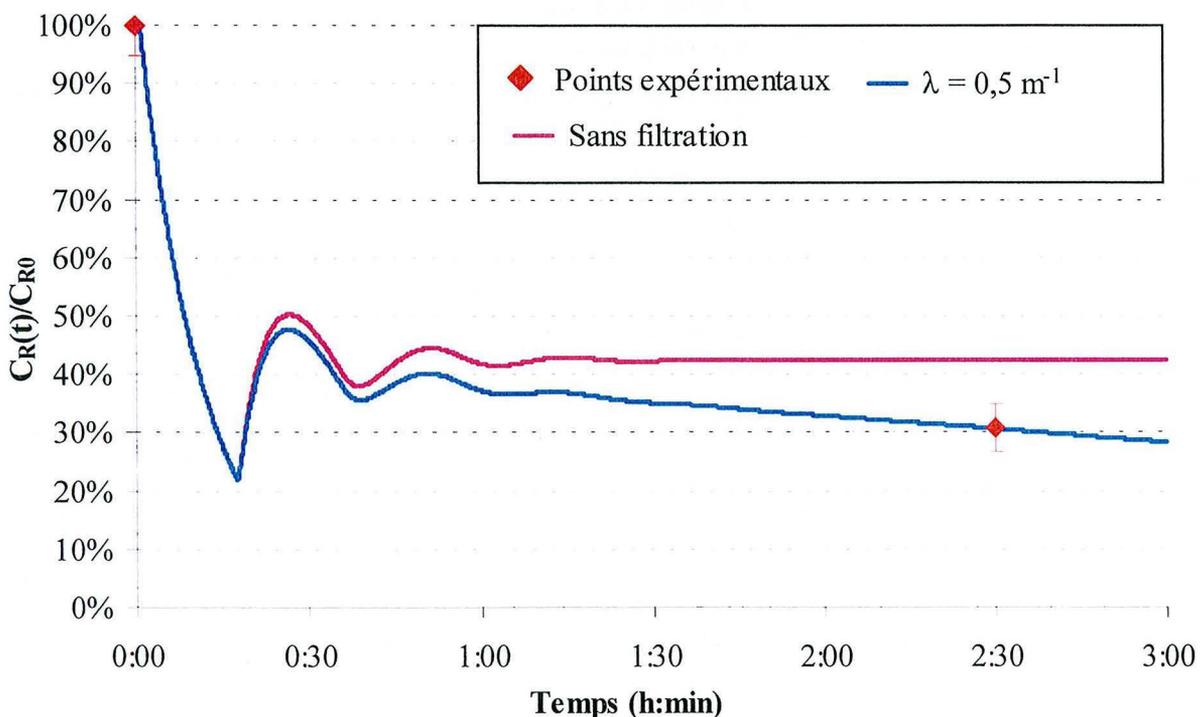


Figure 4-3 : Évolution de la concentration réduite dans le réservoir pour un essai en colonne à circulation fermée sans sable

Paramètres de l'essai : $q = 4,5 \text{ ml/min}$; $\varepsilon = 1$; $L = 0,140 \text{ m}$; $\alpha_L \approx 0 \text{ m}$; $V_R = 50 \text{ ml}$.

Paramètres de la simulation : 10^5 particules ; $\Delta t = 5 \text{ s}$.

La principale source d'erreur reste donc la précision du titrage. On peut donc considérer que notre protocole ne permet pas de détecter une rétention dans la colonne dont le coefficient de filtration colloïdale est inférieur à $1,3 \text{ m}^{-1}$.

4~3 - RÉSULTATS ET INTERPRÉTATIONS DES ESSAIS

L'ensemble des essais en colonne à circulation fermée réalisés peut être divisé en trois séries en fonction des objectifs fixés et des résultats obtenus.

4~3.1 - Première série d'essais

Cette première série d'essais avait pour objectif de déterminer l'influence du débit et de la granulométrie, phénomène mis en évidence par d'autres travaux [MINNIEFIELD, 1997 ; HARTER *et al.*, 2000]. Trois essais, dans des conditions différentes, ont été menés avec le sable siliceux traité. Les deux premiers ont été pratiqués à faible et fort débit et le troisième à fort débit mais avec une granulométrie plus « homogène » [MARLY *et al.*, 2001].

a) Essai à faible débit

Après réception d'un lot d'oocystes, celui-ci est purifié par la méthode de WEBER *et al.* (1992) (§ 1~2.2). Nous avons ensuite réalisé un essai avec une valeur de débit correspondant aux vitesses moyennes d'écoulement dans les aquifères sableux, *i.e.* : environ 10 m/j. Les oocystes étaient alors âgés de 12 jours. Les résultats des mesures en oocystes dans le réservoir et des simulations numériques sont présentés sur la Figure 4~4. À ce débit, les points expérimentaux semblent se situer au niveau de la courbe de filtration totale. Il semble donc que, dans ces conditions expérimentales, à faible débit, il y ait filtration totale des oocystes.

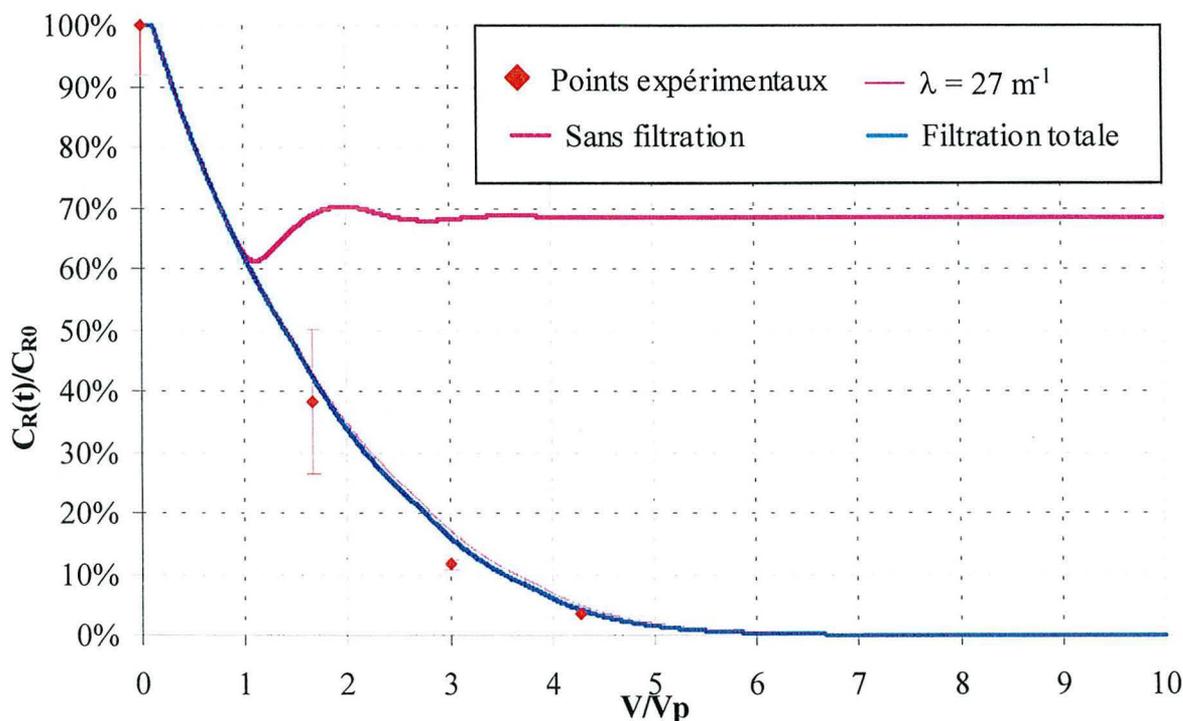


Figure 4~4 : Résultat au niveau du réservoir d'un essai en colonne à circulation fermée à faible débit avec le sable siliceux traité (0,495-1,250 mm)

Paramètres de l'essai : $q = 1,2$ ml/min ; $u \# 10$ m/j ; $\varepsilon = 0,34$; $L = 0,135$ m ; $\alpha_L = 8 \times 10^{-4}$ m ; $V_R = 50$ ml.
Paramètres de la simulation : 10^5 particules ; $\Delta t = 5$ s.

On note cependant que la position des points expérimentaux est légèrement sous la courbe de filtration totale ce qui est physiquement impossible. Cette erreur pourrait être liée en grande partie à la dissolution des gaz atmosphériques dans la solution de NaCl durant le traçage. En effet, cette solution est réalisée avec de l'eau déminéralisée et distillée et n'est pas en équilibre physico-chimique avec l'atmosphère. Ainsi, cette dissolution peut entraîner une augmentation de la conductivité électrique et créer des interférences sur la mesure pendant l'essai de traçage au NaCl, ce qui implique de plus grandes incertitudes sur la détermination des paramètres hydrodynamiques (§ 3~4). Ainsi, si la valeur du « plateau » déterminée expérimentalement était majorée, les paramètres hydrodynamiques seraient différents de ceux donnés par le code de calcul et les points expérimentaux de l'essai avec la suspension en oocystes seraient plus près de la courbe de filtration totale (Figure 4~5).

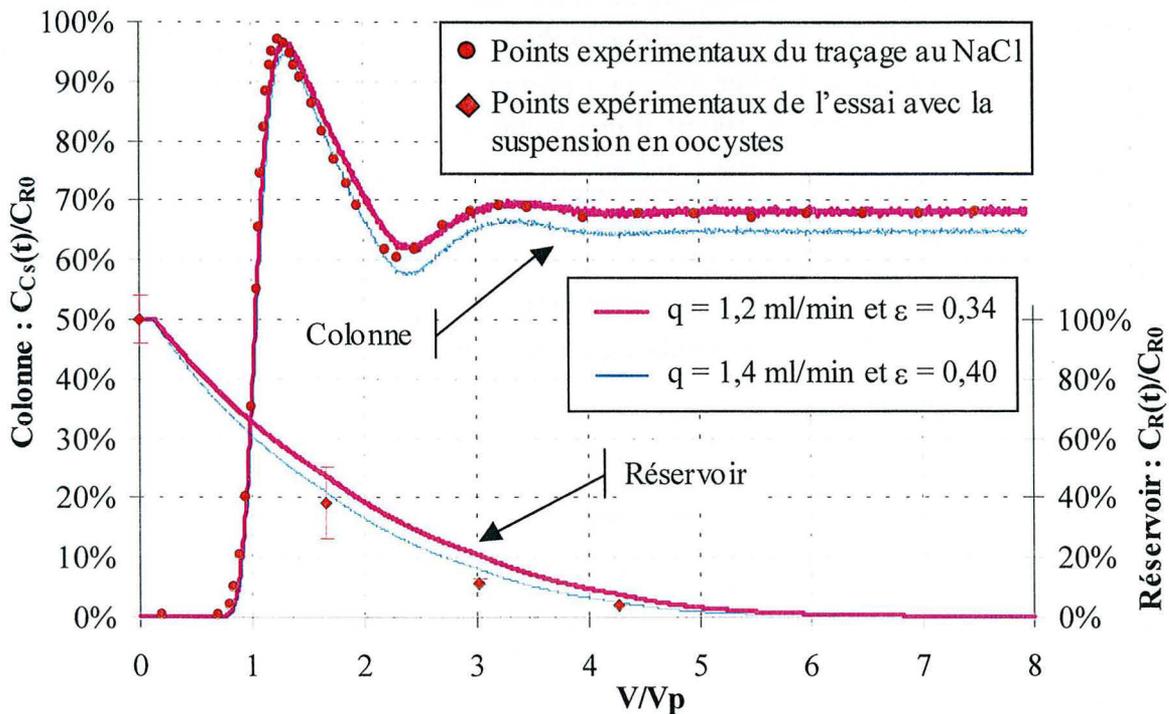


Figure 4~5 : Évolution de la concentration réduite dans le réservoir et en sortie de colonne - Effets des interférences sur la mesure de la conductivité électrique

Afin de valider le résultat de cet essai en colonne à circulation fermée, un essai en colonne ouverte a été mené dans les mêmes conditions hydrodynamiques et avec une concentration constante en entrée identique à la concentration initiale dans le réservoir lors de l'essai en colonne à circulation fermée. L'injection a été menée durant environ 45 minutes. Toute la solution (65 ml) a été collectée en sortie de la colonne. Ce test a été rendu possible par le faible débit de l'essai. Nous n'avons pas concentré cette solution par centrifugation, afin d'éviter tout risque de perte en oocystes [LECHEVALIER *et al.*, 1995]. Nous l'avons donc filtrée avec notre unité sous vide sur une membrane en polycarbonate de $0,8 \mu\text{m}$ de diamètre de pore (§ 1~3.2a). Cette membrane a ensuite été placée dans un tube à essai contenant 10 ml d'une solution à 0,5 % de Tween® 80 et de sodium dodécylsulfate (SDS). Ces produits sont des chaotropes, *i.e.* : ils perturbent les interactions (notamment les interactions hydrophobiques) [MUSIAL *et al.*, 1987]. Le tube a été agité avec un agitateur à retournement à 5 tr/min pendant 30 minutes. Le titrage a été réalisé ensuite par immunofluorescence. La concentration de la solution collectée en sortie de colonne ne représentait que 3 % de la concentra-

tion d'entrée. Ce qui équivaut à un coefficient de filtration colloïdale de 27 m^{-1} (Figure 4~4). La filtration qui s'est donc produite au sein de la colonne lors de cet essai est quasi totale. Ce résultat confirme donc celui déterminé avec l'essai en colonne à circulation fermée.

b) Essai à fort débit

Un deuxième essai a été réalisé en augmentant le débit dans l'optique éventuelle de diminuer la filtration. En effet, lorsque le milieu est saturé en eau, la proportion de particules adsorbées dépend des paramètres de l'advection. Ainsi, si la vitesse d'écoulement est importante, la quantité adsorbée diminue du fait de la diminution du temps de contact entre les micro-organismes et la phase solide du milieu poreux. En outre, l'augmentation du débit diminue les interférences dues à la dissolution des gaz atmosphériques dans la solution, puisque la durée de l'essai passe alors d'environ 1h30 à environ 35 minutes. Enfin, pour vérifier qu'aucun phénomène d'adsorption ne vient s'ajouter au processus de filtration, on a injecté $100 \mu\text{l}$ d'une solution de Tween® 80 et de SDS après le troisième prélèvement. Nous avons utilisé la même suspension stock que pour l'essai précédent. Les oocystes étaient alors âgés de 58 jours.

Les résultats des mesures en oocystes dans le réservoir et des simulations numériques sont présentés sur la Figure 4~6. Là encore, les points expérimentaux se situent au niveau de la courbe de filtration totale.

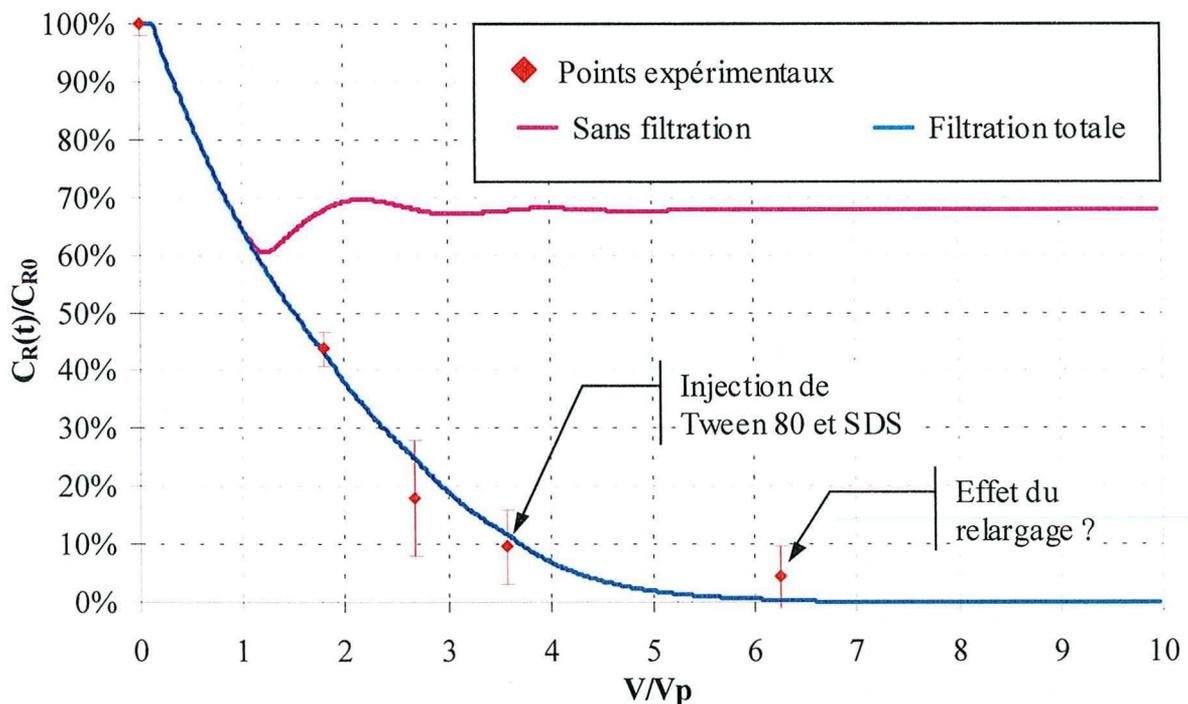


Figure 4~6 : Résultat au niveau du réservoir d'un essai en colonne à circulation fermée à fort débit avec le sable siliceux traité (0,495-1,250 mm)

Paramètres de l'essai : $q = 4,5 \text{ ml/min}$; $u \# 35 \text{ m/j}$; $\varepsilon = 0,35$; $L = 0,135 \text{ m}$; $\alpha_L = 6,5 \times 10^{-4} \text{ m}$; $V_R = 50 \text{ ml}$.
Paramètres de la simulation : 10^5 particules ; $\Delta t = 5 \text{ s}$.

L'ajout de chaotropes semble révéler un phénomène de « relargage » (dernier point expérimental au-dessus de la courbe). Mais ce dernier n'est pas assez significatif pour être quantifié voire attribué à un quelconque processus d'adsorption. En outre, les chaotropes, augmentant la viscosité dynamique de l'eau, peuvent avoir une influence sur l'efficacité de la filtration. En effet, on peut supposer que les oocystes retenus par des pores de dimension juste inférieure à la taille des oocystes, puissent être libérés par un phénomène du type réduction de frottement ou phénomène TOMS (1948).

Par conséquent, même à fort débit (plus de 35 m/j), il semble que la filtration au sein d'une colonne (longueur 14 cm) remplie de sable siliceux traité soit totale.

c) Essai à fort débit et granulométrie « homogène »

HARTER *et al.* (2000), qui ont assimilé les oocystes à des colloïdes biologiques et leur ont appliqué la théorie de la filtration colloïdale, ont réalisé des essais colonne (10 cm de longueur et 5 cm de diamètre), pour un fort et un faible débit (1,4 et 14,8 m/j), avec trois sables traités de granulométries différentes (entre 1,4 et 2,4 mm, entre 0,42 et 0,5 mm et entre 0,18 et 0,25 mm). Par calage grâce à un code de calcul intégrant un modèle de sorption linéaire et une filtration sans relargage, ils ont déterminé le coefficient de filtration colloïdale. Ils ont trouvé dans leurs conditions expérimentales des valeurs du coefficient de filtration colloïdale allant de 3 à 16 m⁻¹. Après les essais, ils ont détruit les colonnes, puis ils ont déterminé la distribution des oocystes. La majorité était retenue dans les premiers centimètres.

Les valeurs du coefficient de filtration évaluées par HARTER *et al.* (2000) ne sont pas en accord avec nos résultats. Néanmoins, comme ils travaillaient avec des sables aux granulométries plus « homogènes », on peut donc supposer que la granulométrie a une influence sur le processus de filtration. En effet, plus la granulométrie est étendue, plus la taille des pores est petite et moins uniforme et donc plus propice à la filtration.

Nous avons donc réalisé un essai en colonne à circulation fermée avec le sable siliceux traité dont nous avons modifié la granulométrie, afin de la rendre plus « homogène ». Ainsi, elle a été ramenée entre 0,630 et 0,701 mm au lieu de 0,495 à 1,250 mm. Le débit est le même que celui de l'essai précédent, *i.e.* : voisin de 4,5 ml/min. Nous avons utilisé la même suspension stock que les premiers essais de cette série. Les oocystes étaient alors âgés de 68 jours.

Les résultats de cet essai et des simulations numériques sont présentés sur la Figure 4~7. Dans ce cas, le coefficient de filtration colloïdale déterminé par le code de calcul est égal à 20 m⁻¹, *i.e.* : très proche d'une filtration totale. Un essai en colonne ouverte dans le cas d'une injection constante qui aurait été réalisé dans les mêmes conditions expérimentales indiquerait une filtration d'environ 93 % (déterminée avec l'équation 3~22, § 3~5.1).

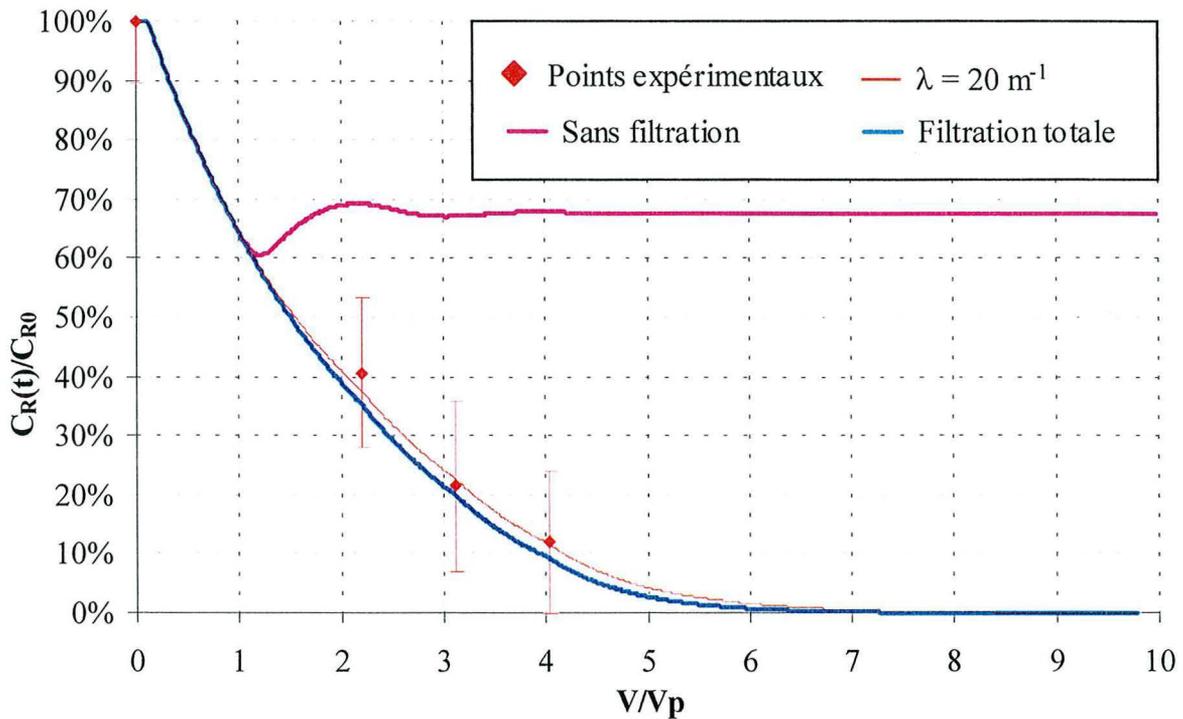


Figure 4~7 : Résultat au niveau du réservoir d'un essai en colonne à circulation fermée à fort débit avec le sable siliceux traité (0,630-0,701 mm)

Paramètres de l'essai : $q = 4,6$ ml/min ; $u \# 35$ m/j ; $\varepsilon = 0,35$; $L = 0,133$ m ; $\alpha_L = 6,5 \times 10^{-4}$ m ; $V_R = 50$ ml.
Paramètres de la simulation : 10^5 particules ; $\Delta t = 5$ s.

d) Interprétations des résultats de la première série d'essais

Au vu des résultats de la première série d'essais, il semble que la filtration soit totale sur la longueur de la colonne pour un sable dont la taille des grains varie de 0,495 à 1,250 mm, aussi bien à faible et fort débit. Un phénomène de relargage non quantifiable et non identifiable a été provoqué par l'injection de chaotropes. En effet, il serait possible que ce relargage soit dû à une désorption, mais aucune adsorption des oocystes sur les sables n'a été révélée lors des essais batch (§ 2~5) et d'autres phénomènes (*e.g.* : phénomène TOMS) peuvent expliquer ce relargage. Enfin, avec des tailles de grains plus homogènes (0,630-0,701 mm), la filtration ne semble plus être totale, mais reste très élevée.

Nos résultats sont en accord avec ceux d'autres équipes de recherche, qui ont également mis en évidence des pourcentages de filtration importants avec des protozoaires dans des conditions expérimentales différentes. HARVEY *et al.* (1995) ont réalisé des essais en colonne (60 cm de longueur et 4,8 cm de diamètre) sur un sable de granulométrie comprise entre 0,5 et 1 mm avec des protozoaires flagellés et différentes tailles de microsphères (0,7 μm , 1,7 μm , 2,8 μm et 6,2 μm). Les protozoaires sont quasiment tous filtrés par le milieu poreux contenu dans la colonne, ainsi que les microsphères de tailles supérieures à 2,8 μm .

De même, MINNIEFIELD (1997) a obtenu une rétention importante lors de ces essais en colonne avec des sédiments (§ 2~2.2). Cependant, cet auteur n'a trouvé qu'une légère filtration avec un sable siliceux et des débits plus faibles (§ 0~6). Néanmoins, des dissemblances existent dans les pro-

toques expérimentaux. La principale est la technique de remplissage des colonnes. Elles sont emplies par couche de milieu poreux de 2 cm compacté avec de légères tapes, ce qui laisse présager l'existence de tassements différentiels (§ 4~2.2a). En outre, il met en eau après avoir rempli la colonne de sable, ce qui généralement ne permet pas de saturer correctement un milieu poreux sableux, notamment s'il a été introduit par compactage en plusieurs couches. Enfin, selon les travaux de BENNETT *et al.* (1999), la technique de titrage des suspensions en oocystes utilisée par cet auteur (§ 2~2.2) fournit une très faible précision.

De même, nos résultats diffèrent de ceux de HARTER *et al.* (2000) (§ 4~3.1c). Toutefois, ces auteurs ont employé une technique de remplissage pour leurs colonnes équivalente à celle de MINNIEFIELD (1997). En outre, avec leur code de calcul, ils n'ont pas déterminé le coefficient de filtration colloïdale, mais l'efficacité de collision. Ensuite, ils ont calculé l'efficacité de capture à partir de la formule de RAJAGOPALAN & TIEN (1976), puis enfin le coefficient de filtration colloïdale à partir de la formule de YAO *et al.* (1971) (Encadré 7). Nous avons calculé les coefficients de filtration colloïdale donnés par cette méthode, ainsi que ceux déterminés avec la formule de l'efficacité de capture de YAO *et al.* (1971) (Encadré 7). Ces calculs contiennent des paramètres dont les valeurs sont comprises dans un intervalle (*e.g.* : le diamètre des grains, le diamètre des oocystes). Dans ce cas, nous avons alors sélectionné les extrêmes qui maximalisent la valeur du coefficient de filtration. Ainsi, nous avons trouvé des valeurs maximales comprises entre 5 et 6 m⁻¹ pour l'essai avec une granulométrie « homogène », alors que notre code de calcul nous a fourni une valeur de 20 m⁻¹ (§ 4~3.1c). Cette différence nous conforte, entre autre, sur le choix de caler directement la valeur du coefficient de filtration colloïdale (§ 3~3.3). Enfin, les colonnes utilisées par HARTER *et al.* (2000) ont un diamètre de 5 cm et une longueur 10 cm (élancement de 2). Ces auteurs ont utilisé un code de calcul pour un écoulement 1D. Étant donné les dimensions de leurs colonnes, les phénomènes de transport dans le plan perpendiculaire à l'écoulement ne doivent pas être négligeables. Cette dimension de colonnes est donc inadaptée à l'hypothèse d'un écoulement 1D.

4~3.2 - Deuxième série d'essais

Cette deuxième série d'essais avait pour objectif de déterminer l'influence de l'âge des oocystes. En effet, MINNIEFIELD (1997) a réalisé ses essais en colonne avec trois groupes d'oocystes d'âges différents (7 à 14 jours, 49 à 56 jours et 91 à 98 jours). Il a trouvé des résultats différents avec les oocystes âgés de 91 à 98 jours. Tous les essais ont été réalisés sous les mêmes conditions que l'essai en colonne à circulation fermée avec une granulométrie « homogène » (§ 4~3.1c), mais avec un autre lot d'oocystes.

a) Essais avec des oocystes âgés de plus de 4 mois

Après réception du lot d'oocystes, celui-ci a été purifié par la méthode de WEBER *et al.* (1992) (§ 1~2.2) et stocké plus de 4 mois à 4°C. Lors de la purification, il a été nécessaire de réaliser deux flottations au NaCl afin de diminuer convenablement la turbidité de la suspension. Nous avons réalisé un essai avec cette suspension stock constituée d'oocystes alors âgés de 135 jours. En outre,

pour vérifier que le seul mécanisme de rétention qui intervient est la filtration, nous avons injecté 10 ml d'une solution de NaCl à 0,1 g/ml après le troisième prélèvement. En effet, la filtration correspondant au blocage des micro-organismes transportés par des pores et canalicules plus petits, la force ionique ne devrait pas avoir beaucoup d'influence. Par contre, nous avons montré son influence sur le comportement des oocystes vis-à-vis de l'adsorption (§ 2~5.3a). Les résultats de cet essai et des simulations numériques sont présentés sur la Figure 4~8. Le coefficient de filtration colloïdale déterminé par le code de calcul est égal à $4,3 \text{ m}^{-1}$. Un essai en colonne ouverte dans le cas d'une injection constante qui aurait été réalisé dans les mêmes conditions expérimentales indiquerait une filtration d'environ 45 % (déterminée avec l'équation 3~22, § 3~5.1).

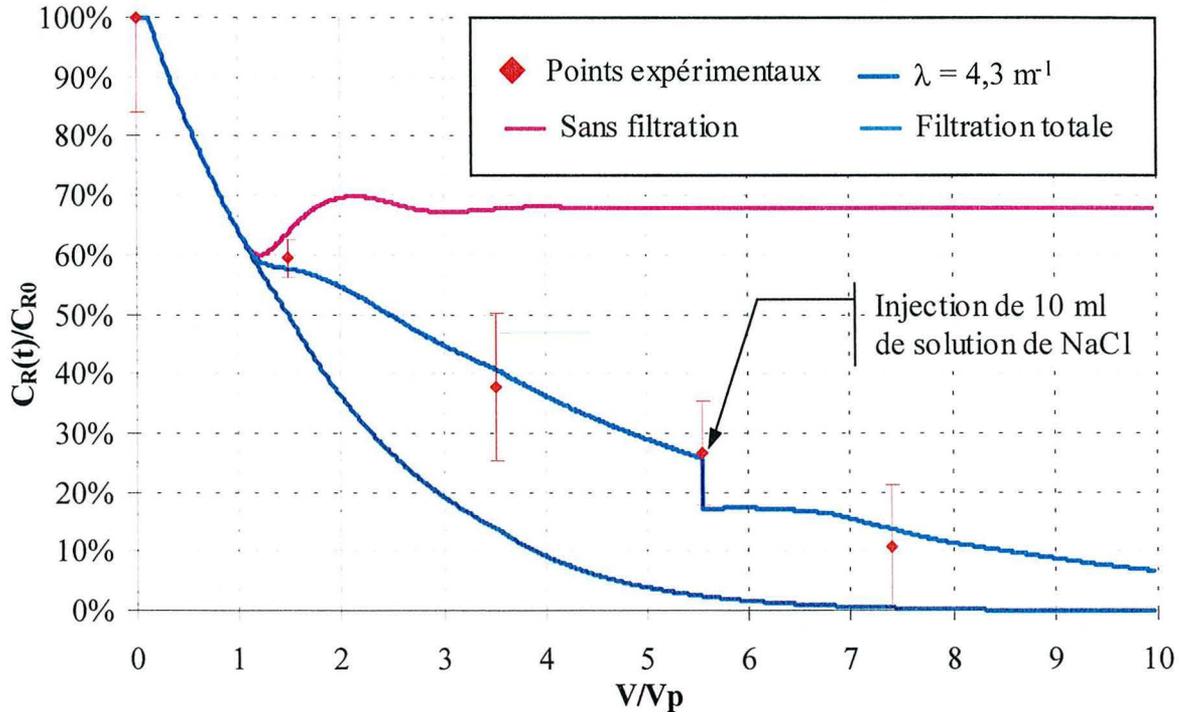


Figure 4~8 : Résultat au niveau du réservoir d'un essai en colonne à circulation fermée avec le sable siliceux traité (0,630-0,701 mm)

Paramètres de l'essai : $q = 4,7 \text{ ml/min}$; $u \# 35 \text{ m/j}$; $\varepsilon = 0,34$; $L = 0,140 \text{ m}$; $\alpha_L = 6,5 \times 10^{-4} \text{ m}$; $V_R = 50 \text{ ml}$.
Paramètres de la simulation : 10^5 particules ; $\Delta t = 5 \text{ s}$.

Bien que les conditions soient semblables, les résultats de cet essai diffèrent fortement de ceux de la première série (§ 4~3.1c). Cette différence pourrait être due à l'âge des oocystes. En effet, on peut supposer que la paroi des oocystes se dégrade avec le temps, induisant d'ailleurs à terme la mort du micro-organisme. Ainsi, la paroi serait alors de plus en plus déformable avec le temps et, par conséquent, la filtration diminuerait. Les résultats de cet essai ne montrent pas d'influence notable de l'injection de la solution de NaCl (excepté celle due à la dilution). Or, la modification de la force ionique influe sur la valeur du potentiel zêta des oocystes (Encadré 3) et, par conséquent, sur l'importance des forces électrostatiques (Encadré 4). Donc, les forces électrostatiques, mécanisme important de l'adsorption, ne semblent pas être responsables de la rétention observée lors de cet essai. Ceci tendrait à laisser penser que, si plusieurs mécanismes de rétention se sont produits au cours de cet essai, le seul suffisamment important pour être détectable par notre protocole expérimental est la filtration.

Dans le but de confirmer ce résultat, nous avons réalisé un nouvel essai avec cette suspension stock, renfermant alors des oocystes âgés de 143 jours. Les résultats de cet essai et des simulations numériques, présentés sur la Figure 4~9, confirment les données obtenues lors du premier essai. Le coefficient de filtration colloïdale déterminé par le code de calcul est de nouveau égal à $4,3 \text{ m}^{-1}$. La filtration dans un essai en colonne ouverte, qui correspondrait à ce coefficient, serait alors d'environ 44 % (déterminée avec l'équation 3~22, § 3~5.1).

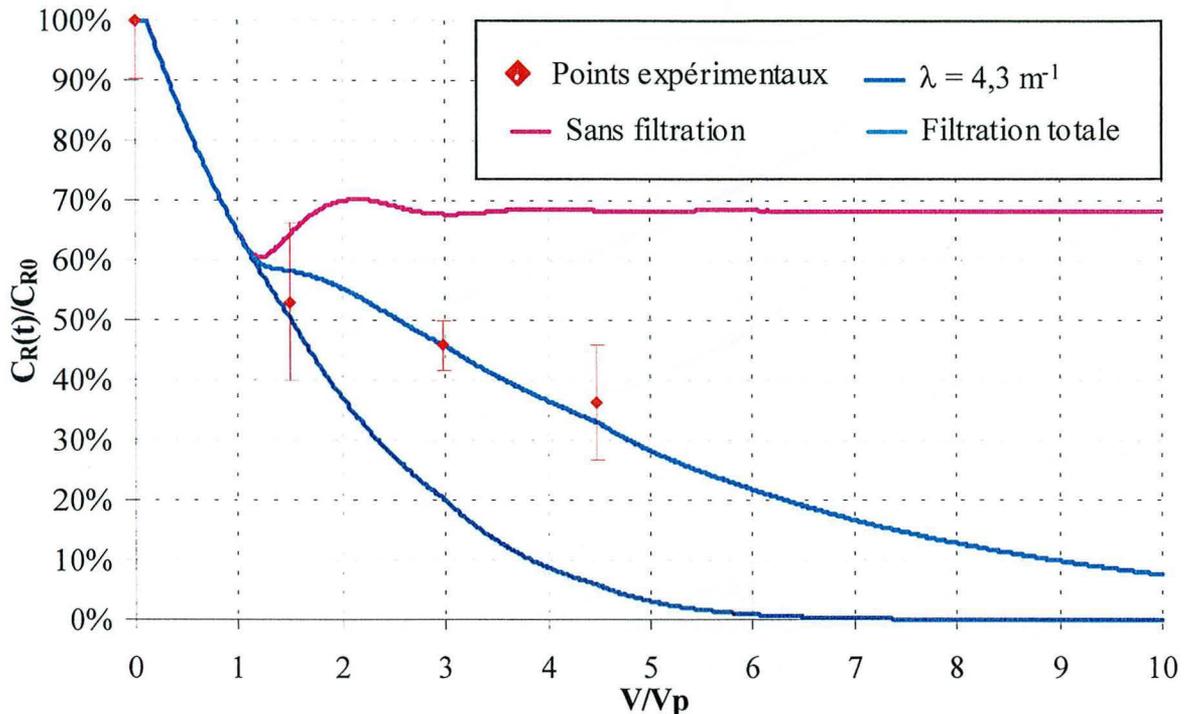


Figure 4~9 : Résultat au niveau du réservoir d'un essai en colonne à circulation fermée avec le sable siliceux traité (0,630-0,701 mm)

Paramètres de l'essai : $q = 4,6 \text{ ml/min}$; $u \# 35 \text{ m/j}$; $\varepsilon = 0,34$; $L = 0,137 \text{ m}$; $\alpha_L = 6,5 \times 10^{-4} \text{ m}$; $V_R = 50 \text{ ml}$.
Paramètres de la simulation : 10^5 particules ; $\Delta t = 5 \text{ s}$.

Rappelons que la suspension stock utilisée pour ces deux essais avait nécessité deux flottations au NaCl lors de la purification. L'influence de la charge ionique sur le comportement des oocystes a déjà été soulignée précédemment (§ 2~5.3a). Il est alors possible que la deuxième flottation au NaCl ait eu une légère influence. C'est pourquoi nous avons de nouveau réalisé cet essai, avec le même lot d'oocystes, mais avec une nouvelle suspension stock ayant subi une seule flottation au NaCl.

b) Essais avec des oocystes âgés de plus de 4 mois issus d'une autre suspension stock

Dans le but de vérifier cette hypothèse, nous avons donc réalisé un nouvel essai en colonne à circulation fermée avec une autre suspension stock issue du même lot d'oocystes dont la purification n'a comporté qu'une seule flottation au NaCl, renfermant alors des oocystes âgés de 177 jours. Les résultats de cet essai et des simulations numériques, présentés sur la Figure 4~10, confirment ceux obtenus lors des deux essais précédents. Le coefficient de filtration colloïdale déterminé par le code

de calcul est de nouveau égal à $4,3 \text{ m}^{-1}$. La filtration dans un essai en colonne ouverte qui correspondrait à ce coefficient, serait alors d'environ 45 % (déterminée avec l'équation 3~22, § 3~5.1).

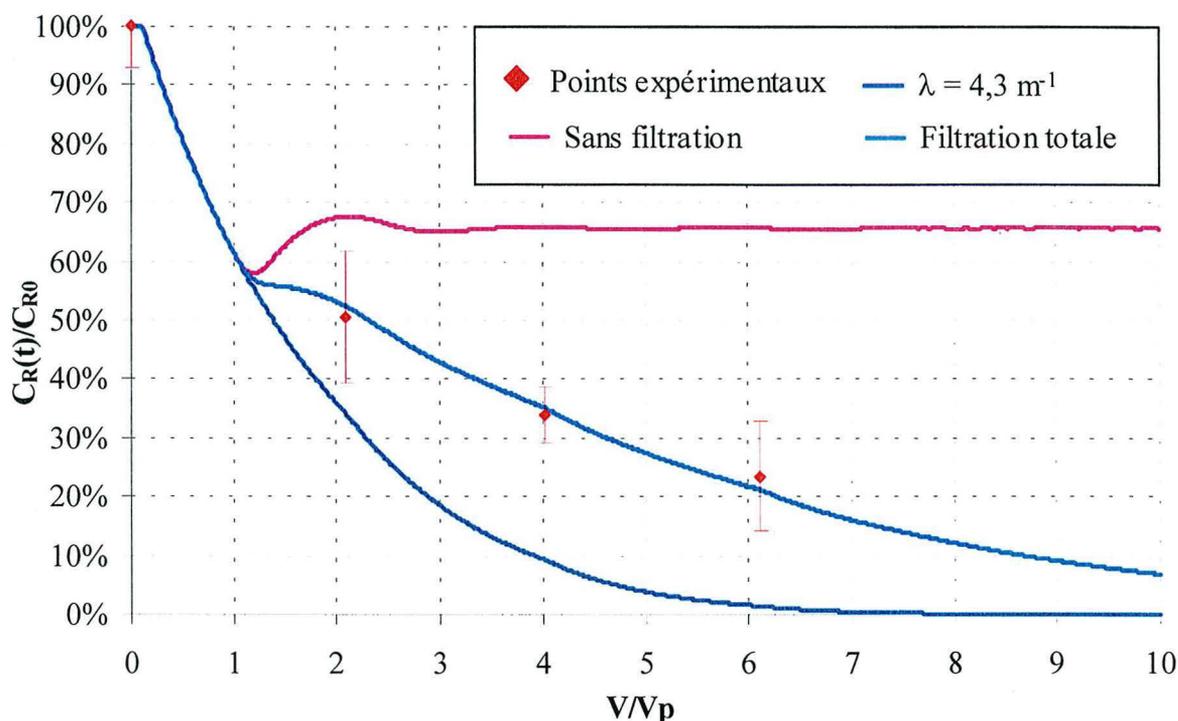


Figure 4~10 : Résultat au niveau du réservoir d'un essai en colonne à circulation fermée avec le sable siliceux traité (0,630-0,701 mm)

Paramètres de l'essai : $q = 4,7 \text{ ml/min}$; $u \# 35 \text{ m/j}$; $\varepsilon = 0,36$; $L = 0,142 \text{ m}$; $\alpha_L = 6,5 \times 10^{-4} \text{ m}$; $V_R = 50 \text{ ml}$.
Paramètres de la simulation : 10^5 particules ; $\Delta t = 5 \text{ s}$.

c) Interprétations des résultats de la deuxième série d'essais

Notons tout d'abord que, dans cette série d'essais, les valeurs du coefficient de filtration déterminé correspondent aux valeurs calculées à partir des formules de RAJAGOPALAN & TIEN (1976) et de YAO *et al.* (1971) (Encadré 7 et § 4~3.1d).

La première série d'essais a montré que pour des oocystes avec un stockage relativement court, entre 12 et 67 jours, la filtration est quasi totale. Par contre, la deuxième série met en avant que pour des oocystes stockés plus de 4 mois, entre 134 et 177 jours, la filtration n'est plus totale, mais d'environ 50 %. On peut donc supposer, comme nous l'avons dit, que cette différence soit liée à l'âge des oocystes. En effet, on peut arguer que la paroi des oocystes se dégrade avec le temps. Ainsi, la paroi serait alors de plus en plus déformable et, par conséquent, la filtration diminuerait. Cette différence peut aussi être liée à la quantité d'oocystes viables. En effet, plus les oocystes sont âgés plus le pourcentage d'oocystes viables est faible, et, comme l'ont montré WALKER & MONTEMAGNO (1999) concernant l'adsorption, le comportement des oocystes non viables n'est pas le même que celui des oocystes viables (§ 2~2.3).

Nous avons montré que les oocystes (viables et/ou non viables présents dans nos suspensions) sont sensibles à la charge ionique (§ 2~5.3a), en accord avec les travaux de BRUSH (1997),

MINNIEFIELD (1997) et HSU *et al.* (2001). Précisons que les lots d'oocystes sont stockés dans une solution à 2,5 % de bichromate de potassium et que BRUSH (1997) émet l'hypothèse que le potentiel zêta négatif trouvé par des équipes de recherche proviendrait notamment de l'action du bichromate de potassium sur les oocystes (§ 2~2.3). Or, dans les essais de cette deuxième série, la suspension stock des deux premiers essais renfermait des oocystes avec un séjour relativement bref dans la solution de bichromate de potassium. Par contre, celle utilisée dans le dernier essai était constituée d'oocystes avec plus de 4 mois au contact du bichromate de potassium. Comme les résultats de nos essais ne montrent pas de différence significative, nous infirmons l'hypothèse d'un rôle du bichromate de potassium, à moins que l'action de cet oxydant sur les oocystes soit rapide.

Par la suite, nous avons décidé de valider les résultats expérimentaux de cette deuxième série, *i.e.* : sur l'influence de l'âge des oocystes.

4~3.3 - Troisième série d'essais

Cette troisième série d'essais avait donc pour objectif de valider une éventuelle influence de l'âge des oocystes en utilisant un autre lot d'oocystes. Tous les essais ont été réalisés sous les mêmes conditions que ceux de la deuxième série.

a) Essais avec des oocystes stockés plus de 4 mois issus d'un autre lot d'oocystes

Nous avons donc réalisé un essai avec une suspension stock issue d'un autre lot d'oocystes, stocké à 4°C pendant un peu plus de 4 mois avant d'être purifié. Les oocystes étaient alors âgés de 130 jours. Les résultats de cet essai et des simulations numériques sont présentés sur la Figure 4~11. Le coefficient de filtration colloïdale déterminé par le code de calcul est égal à 2,1 m⁻¹. La filtration dans un essai en colonne ouverte qui correspondrait à ce coefficient, déterminée avec la solution théorique dans le cas d'une injection constante (équation 3~22, § 3~5.1), serait d'environ 26 %. Ces résultats diffèrent de ceux obtenus dans la deuxième série où nous avons déterminé un coefficient de filtration colloïdale de 4,3 m⁻¹ pour trois essais réalisés, alors que les conditions expérimentales étaient similaires. Néanmoins il confirme bien la tendance d'une filtration plus faible pour des oocystes plus âgés.

Devant de telles discordances inexplicables, nous avons décidé de réaliser une expérimentation à l'identique avec des oocystes alors affectant 137 jours de stockage. Les résultats de cet essai et des simulations numériques présentés sur la Figure 4~12 montrent que le coefficient de filtration colloïdale déterminé par le code de calcul est égal à 7,2 m⁻¹. La filtration dans un essai en colonne ouverte qui correspondrait à ce coefficient, serait alors d'environ 62 %. Ce résultat totalement différent de tous ceux déjà présentés méritait d'être confirmé ou infirmé par une nouvelle expérimentation réalisée dans les mêmes conditions, avec la même suspension renfermant alors des oocystes stockés 145 jours.

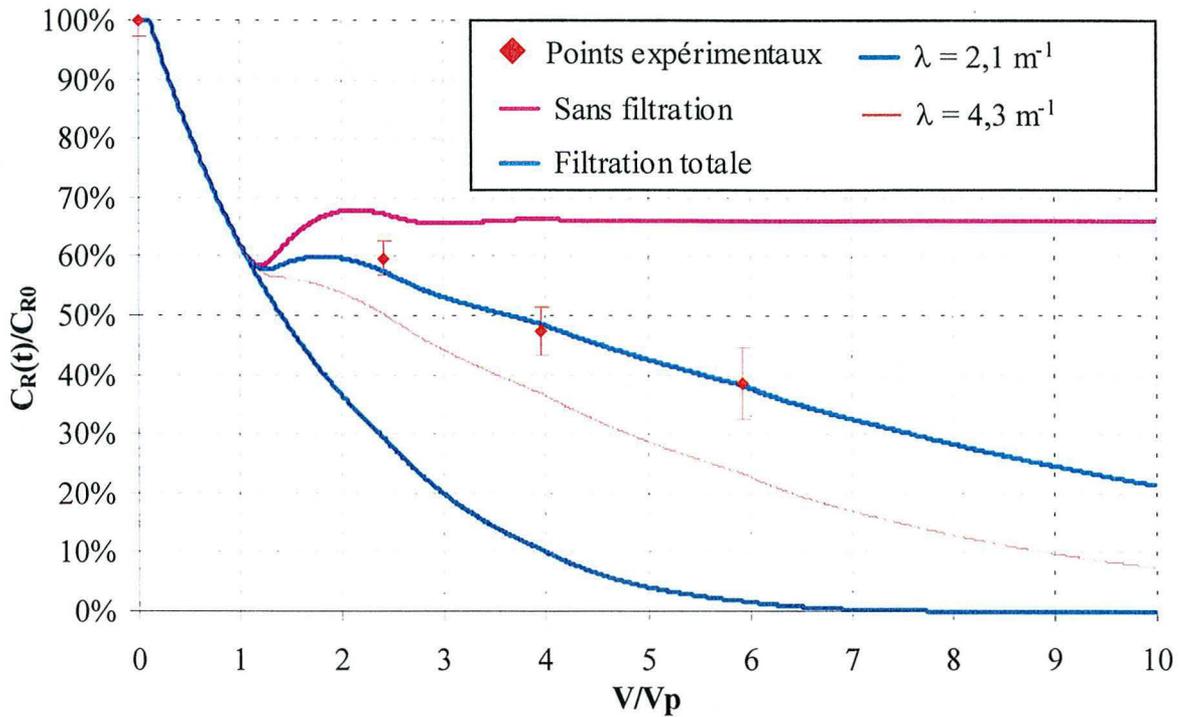


Figure 4~11 : Résultat au niveau du réservoir d'un essai en colonne à circulation fermée avec le sable siliceux traité (0,630-0,701 mm)

Paramètres de l'essai : $q = 4,6 \text{ ml/min}$; $u \# 35 \text{ m/j}$; $\varepsilon = 0,37$; $L = 0,137 \text{ m}$; $\alpha_L = 6,5 \times 10^{-4} \text{ m}$; $V_R = 50 \text{ ml}$.
Paramètres de la simulation : 10^5 particules ; $\Delta t = 5 \text{ s}$.

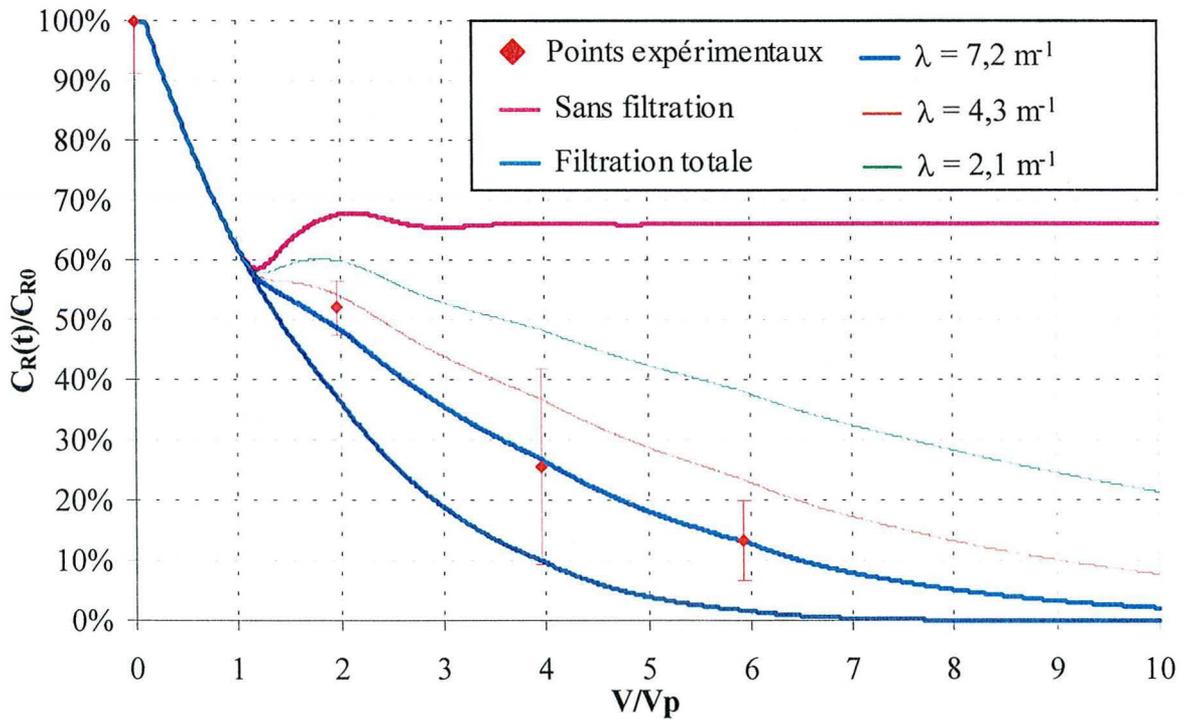


Figure 4~12 : Résultat au niveau du réservoir d'un essai en colonne à circulation fermée avec le sable siliceux traité (0,630-0,701 mm)

Paramètres de l'essai : $q = 4,6 \text{ ml/min}$; $u \# 35 \text{ m/j}$; $\varepsilon = 0,37$; $L = 0,135 \text{ m}$; $\alpha_L = 6,5 \times 10^{-4} \text{ m}$; $V_R = 50 \text{ ml}$.
Paramètres de la simulation : 10^5 particules ; $\Delta t = 5 \text{ s}$.

Les résultats de cet essai et des simulations numériques sont présentés sur la Figure 4~13. Le coefficient de filtration colloïdale déterminé par le code de calcul est égal à $3,6 \text{ m}^{-1}$. La filtration,

dans un essai en colonne ouverte qui correspondrait à ce coefficient, serait alors d'environ 39 %. Devant ces variations extrêmement importantes et devant l'absence de reproductibilité des résultats, il ne nous est pas apparu raisonnable de poursuivre cette série d'essais consommateurs de temps, mais plutôt de tenter de proposer une interprétation à « cette variabilité ».

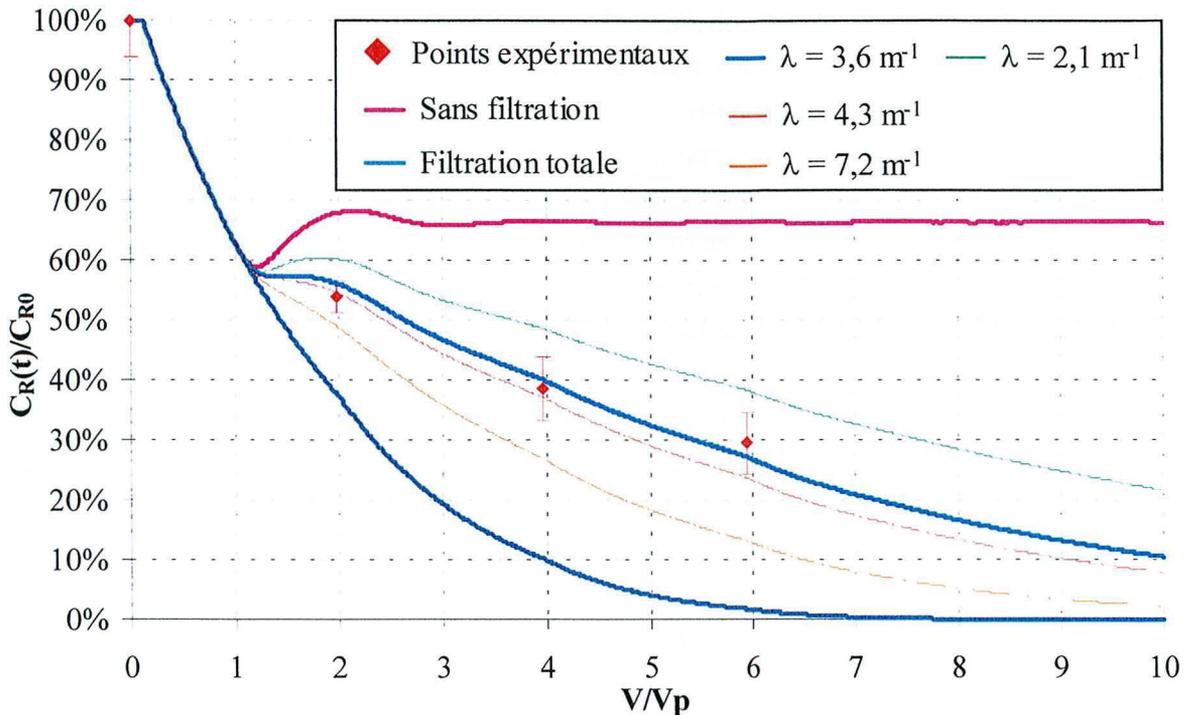


Figure 4~13 : Résultat au niveau du réservoir d'un essai en colonne à circulation fermée avec le sable siliceux traité (0,630-0,701 mm)

Paramètres de l'essai : $q = 4,5 \text{ ml/min}$; $u \# 35 \text{ m/j}$; $\varepsilon = 0,37$; $L = 0,136 \text{ m}$; $\alpha_L = 6,5 \times 10^{-4} \text{ m}$; $V_R = 50 \text{ ml}$.
Paramètres de la simulation : 10^5 particules ; $\Delta t = 5 \text{ s}$.

b) Interprétations des résultats de la troisième série d'essais

Les résultats des trois essais de cette troisième série, bien que réalisés dans des conditions semblables aux essais de la deuxième série, ne fournissent pas les mêmes résultats, ni entre eux, ni avec ceux de la deuxième série. Notons cependant que les résultats du dernier essai de cette série sont proches de ceux de la deuxième série (compris dans la zone d'incertitude), ce qui n'est pas le cas des deux autres essais de cette série. On peut supposer que, à durée de stockage identique, le pourcentage d'oocystes viables soit différent dans les deux séries et soit à l'origine des différences entre les résultats des essais de la deuxième série et ceux de la troisième série. En effet, les oocystes utilisés proviennent de lots différents. Cependant cette hypothèse n'explique pas pourquoi les résultats des essais de cette série sont différents entre eux. Il se peut qu'un ou plusieurs autres paramètres aient eu une influence sur la filtration. Ce pourrait être le cas du pH et de la force ionique [HSU *et al.*, 2001], bien que ces grandeurs ne soient pas suivies pendant nos essais puisque celles-ci sont essentiellement induites par le milieu poreux. Par ailleurs, nous avons préalablement déterminé les valeurs du pH induites par les sables (§ 2~5.2) et, avant de mener les essais avec les suspensions en oocystes, le sable contenu dans la colonne est rincé avec de l'eau déminéralisée et distillée jusqu'à ce que la conductivité électrique soit quasiment nulle (§ 4~2.2c). En conséquence, cette interpréta-

tion ne peut pas être cautionnée d'autant plus que tous les essais de la deuxième et de la troisième série ont été réalisés avec le même sable, *i.e.* : *a priori* avec les mêmes valeurs du pH et de la force ionique. En outre, il n'y a pas de variabilité des résultats dans les essais de la deuxième série.

Il est vrai que le comportement des colloïdes n'est pas forcément équivalent à celui du fluide, ce qui peut induire une variabilité dans les résultats. BRUSH (1997) a mené des essais en colonne (11,5 cm de longueur et 3,8 cm de diamètre) sur trois substrats différents (sable, billes de verre et agrégats schisteux). Son but a été de déterminer le coefficient de filtration, le facteur de retard et le coefficient de dispersion. Pour cela, il a calé les résultats en sortie de colonne avec un code de calcul basé sur la solution analytique de l'équation d'advection-dispersion monodimensionnelle et sous l'hypothèse d'un partage linéaire pour l'adsorption et d'une filtration sans relargage. Il n'a obtenu aucune adsorption probante, bien que beaucoup d'oocystes aient été retenus dans la colonne. En effet, les pourcentages moyens d'oocystes récupérés en sortie de la colonne sont de 58,5 %, 48,4 % et 56,3 % respectivement pour les colonnes emplies de billes de verres, de sable et d'agrégats schisteux. Il a également trouvé que la dispersion estimée des oocystes est plus faible que celle du traqueur dans les trois types de milieux poreux. Il a alors supposé que, dans ces trois milieux, les oocystes subissent moins de « turbulences » que l'eau elle-même.

Ce dernier phénomène avait été également observé par HARVEY *et al.* (1995) lors de leurs essais avec les microsphères de différentes tailles (§ 4~3.1d). Alors que les microsphères de tailles supérieures à 2,8 μm sont toutes filtrées, les microsphères de très petites tailles (0,7 μm) sont davantage retenues dans la colonne que celles de 1,7 μm . Ils ont supposé que le mouvement dispersif des particules dans ces ordres de grandeur et la probabilité de contact entre les grains et les microsphères sont régis en grande partie par la diffusion dont la contribution augmente quand la taille des colloïdes diminue [HARVEY *et al.*, 1993]. C'est ce phénomène qui expliquerait leurs comportements différents. Ils ont également conclu que la taille critique des pores était proche de 1,7 μm , ce qui expliquerait que les microsphères de grande taille sont retenues.

La variabilité des résultats de cette troisième série peut aussi être liée aux oocystes. Il s'agit en effet d'êtres vivants et la non-constance des résultats d'essais avec des micro-organismes est un phénomène fréquemment rencontré dans ce genre d'étude. En ce qui concerne les caractéristiques biologiques, nous avons cité des déterminations différentes de la dose moyenne infectante (§ 0~4.1), de la résistance aux basses températures (§ 0~4.2c) et surtout du potentiel zêta (§ 2~2.3). MINNIEFIELD (1997) a obtenu des résultats différents lors de ces essais en colonne entre des oocystes et des microsphères carboxylées (ayant des caractéristiques assez similaires aux oocystes), selon que le milieu poreux soit un sable homogène ou hétérogène (§ 0~6). Pour expliquer ce résultat, il a avancé l'hypothèse de propriétés de surface extracellulaires des oocystes favorisant la rétention des oocystes en milieux riches en minéraux. L'existence de ce type de propriétés n'a pas pour l'instant été prouvée. De même, lors des travaux de HARTER *et al.* (2000) (§ 4~3.1c), un phénomène de relargage est apparu. Les auteurs ne fournissent pas d'explication à ce phénomène. Enfin, pour expliquer leurs résultats, WALKER & MONTEMAGNO (1999) supposent que les oocystes intacts se comportent comme des colloïdes biologiques sans réel site de fixation, contrairement à des oocystes

morts (§ 2~2.3). Mais, ils ne fournissent aucune explication biologique sur la pertinence de ce phénomène.

4~4 - CONCLUSION

D'un point de vue pratique, l'essai en colonne à circulation fermée est un protocole approprié pour l'étude du transport d'éléments pathogènes comme les oocystes de *C. parvum*. En outre, la mise en œuvre de ce protocole ne présente pas de difficultés importantes. Concernant le transport en milieu poreux saturé, les résultats de nos essais n'indiquent pas un comportement unique des oocystes de *C. parvum*. Nous avons en effet constaté l'influence de la granulométrie et de la vitesse d'écoulement dans les mécanismes de transport, ainsi que l'ont remarqué d'autres équipes de recherche [MINNIEFIELD, 1997 ; HARTER *et al.*, 2000]. Cependant, d'autres paramètres semblent également avoir une influence, comme l'âge des oocystes. En effet, plus les oocystes sont âgés, plus le pourcentage de viabilité diminue. Or, comme le mentionnent WALKER & MONTEMAGNO (1999), les oocystes non-viables n'ont pas le même comportement que les oocystes viables. En outre, on peut supposer que plus les oocystes sont âgés, plus les parois se détériorent et donc deviennent déformables, ce qui diminuerait alors la rétention par filtration. Une variabilité en fonction des lots d'oocystes pourrait expliquer certains résultats divergents. Cette hétérogénéité des lots d'oocystes pourrait correspondre à des pourcentages d'oocystes viables différents et/ou à des altérations biologiques plus ou moins marquées. Par conséquent, même si notre étude n'apporte pas une description complète du transport des oocystes de *Cryptosporidium* dans les milieux poreux saturés, elle apporte un certain nombre d'informations et, surtout, elle fournit des méthodes de recherches adaptées et ouvre des perspectives pour des recherches ultérieures dans ce domaine.

CONCLUSIONS GÉNÉRALES ET PERSPECTIVES

**Le savant n'est pas l'homme qui fournit les vraies réponses ;
c'est celui qui pose les vraies questions.**

Claude LÉVI-STRAUSS (1908-),
ethnologue français.

Extrait de *Le Cru et le Cuit* (1964).

Le cadre général de cette étude était de chercher les paramètres qui influencent le transport des oocystes de *C. parvum* dans les aquifères à l'aide d'essais en laboratoire. Ce travail se positionnait dans une thématique de protection efficace des ressources en eau vis-à-vis de la contamination par des oocystes de *C. parvum*, avec *in fine* le dimensionnement optimal des périmètres de protection autour des ouvrages de captage. Bien que notre étude ne fournisse pas une réponse précise sur cet aspect de terrain, nous avons en revanche obtenu des résultats notables dans plusieurs domaines à l'échelle du laboratoire.

Ainsi, une des principales difficultés de cette étude a été d'élaborer une technique de titrage des suspensions en oocystes précise, mais également relativement simple en mettre en œuvre, même pour un non-microbiologiste. Nous avons alors, en collaboration avec le laboratoire de Bactériologie-Parasitologie de la Faculté de Pharmacie de Nancy, modifié le protocole classique d'immunofluorescence, afin qu'il corresponde à nos exigences.

Un des autres objectifs de notre travail était de mettre au point des protocoles expérimentaux adaptés à l'étude du transport des oocystes de *C. parvum*. Nous avons ainsi développé un protocole d'essai en colonne original, l'essai en colonne à circulation fermée. Les interprétations des résultats de cet essai sont cependant plus ardues que celles des résultats d'un essai classique en colonne ouverte. C'est pourquoi, nous avons développé un modèle numérique de l'essai en colonne à circulation fermée. La validation du modèle a montré que notre code de calcul fournit des résultats très satisfaisants. En outre, nous pouvons remarquer que notre technique de résolution nous permet de reproduit convenablement le comportement des oocystes lors des essais. Cette remarque valide notamment l'assimilation des oocystes de *C. parvum* à des colloïdes biologiques. Ainsi, notre technique de résolution pourrait être intégrée dans un programme existant sur la délimitation des périmètres de protection, lui permettant ainsi de prendre en compte le risque de contamination par des oocystes de *C. parvum*. Cet ajout au modèle serait d'autant plus facile s'il s'agit d'un programme qui utilise déjà la technique de marche au hasard, comme celui de CHEVALIER *et al.* (2001).

En outre, le principe utilisé dans notre modèle numérique n'est pas d'ajuster une courbe théorique sur des points expérimentaux, mais de simuler numériquement l'ensemble de l'essai et de déterminer la courbe numérique la plus proche des points expérimentaux. Ainsi, peu de points expérimentaux sont nécessaires, à condition que la mesure soit précise. Cette particularité atténue donc le principal inconvénient de notre protocole d'immunofluorescence, à savoir que sa durée d'exécution est longue. Par conséquent, l'association de notre protocole d'essai en colonne à circulation fermée et de notre protocole de titrage par immunofluorescence constitue un outil particulièrement bien adapté et performant pour l'étude du transport des oocystes de *C. parvum* dans un milieu poreux saturé. En outre, du fait de sa circulation fermée et de son faible encombrement, ce type d'essai ouvre de nouvelles possibilités, comme (i) son utilisation dans une enceinte climatisée, (ii) la réalisation d'un essai de très longue durée (particulièrement intéressant pour l'étude de la biodégradation), (iii) ...

Concernant la recherche des caractéristiques de transport, notre étude sur l'adsorption des oocystes a montré que celle-ci est très faible, voire inexistante, que ce soit sur un substrat siliceux, calcaire, feldspathique, argileux ou alumineux, sous des conditions salines ou non. Ces résultats sont d'ailleurs en accord avec les travaux de WALKER & MONTEMAGNO (1999), qui ont utilisé une technique expérimentale différente (essais en flux laminaire à faible débit). Ils ont obtenu une très faible adsorption sur de l'alumine de synthèse avec des oocystes viables et aucune adsorption sur d'autres oxydes métalliques de synthèse. Notre étude sur la filtration a montré que celle-ci varie plus ou moins fortement en fonction de certains paramètres. La granulométrie et la vitesse d'écoulement semblent avoir une influence importante, résultat également obtenu par d'autres équipes de recherche avec des essais en colonne classiques [MINNIEFIELD, 1997 ; HARTER *et al.*, 2000]. D'autres paramètres tel que l'âge des oocystes, difficilement accessibles dans des conditions naturelles, semblent avoir une importance. L'influence de l'âge des oocystes sur le transport avait d'ailleurs déjà été évoquée dans les travaux de MINNIEFIELD en 1997. Lors des derniers essais, menés dans des conditions expérimentales similaires, nous avons obtenu des résultats différents, augurant donc qu'un ou plusieurs autres paramètres aient eu une influence sur la filtration. Il est possible que ces paramètres soit d'origines biologiques. En effet, aucune caractéristique biologique n'a été déterminée au cours de nos essais. En outre, des caractéristiques parfois fortement contradictoires ont été soulevées par différentes équipes de recherches. L'exemple le plus flagrant est la détermination du potentiel zêta des oocystes. Ce problème se rencontre également sur la détermination de la dose moyenne infectante ou de la résistance aux basses températures.

Il serait donc intéressant de coupler la recherche des paramètres qui influencent le transport des oocystes de *C. parvum* dans les aquifères avec la détermination des caractéristiques biologiques des oocystes : (i) le pourcentage de viabilité, (ii) le potentiel zêta, (iii) des indications sur la taille et la déformabilité avec, par exemple, un « tamisage » sur l'unité filtration sous vide avec des membranes de filtration de diamètres de pores décroissants, (iv)...

L'ensemble des travaux de recherches présentées dans ce mémoire permet d'attirer l'attention sur les risques de contaminations des ressources en eau par des eaux usées. En effet, ce type de contamination a été à l'origine d'épidémies liées à la consommation d'eau potable [D'ANTONIO *et al.*, 1985 ; SMITH *et al.*, 1989 ; DWORKIN *et al.*, 1996 ; KUROKI *et al.*, 1996]. Cette observation est en accord avec de récentes études génétiques, qui ont mis en évidence que la majorité des infections humaines libère des oocystes de génotype 1, strictement humain [WIDMER *et al.*, 1998 ; MCLAUHLIN *et al.*, 2000]. En outre, nos résultats indiquent le risque d'une faible rétention des oocystes dans les aquifères, avec une adsorption quasi inexistante et une filtration pouvant être faible. Enfin, la dégradation des oocystes dans le milieu naturel est très faible, de l'ordre de plusieurs centaines de jours. Il en découle qu'il est impératif de mettre en œuvre toutes les mesures préventives nécessaires afin d'éviter tout risque de contamination des ressources en eau par des eaux usées. Ce dernier résultat doit une recommandation forte pour la délimitation des périmètres de protection autour des ouvrages de captage.

GLOSSAIRE

Ce glossaire a été établi à partir de plusieurs sources :

- l'encyclopédie Hachette Multimédia 2001 en ligne <<http://www.encyclo.voila.fr>> ,
- l'encyclopédie Microsoft® Encarta® 2002 en ligne <<http://encarta.msn.fr>> ,
- le grand Robert de la langue française, 2^{ème} édition, 1985, ed. Le Robert, Paris,
- le dictionnaire de géologie, par FOULCAULT A. & RAOULT J-F., 2^{ème} édition, 1984, ed. Masson, Paris.

Les mots soulignés correspondent à des mots dont la définition est donnée dans ce glossaire.

Mot	Définition
Allèle (n. m.)	Dans une même espèce, nom donné à chacune des différentes séquences codantes d'un même gène occupant un <i>locus</i> homologue (même emplacement sur le chromosome) mais n'ayant pas forcément des effets identiques sur le même caractère. Un gène peut donc exister sous des formes différentes (<u>alléliques</u>) qui dérivent les unes des autres par mutations successives.
Allélique (adj.)	V. <u>allèle</u> .
[Ⓜ] Anthropozoonose (n. f.)	Toute maladie infectieuse ou parasitaire qui affecte l'homme et les animaux.
[Ⓜ] Anticorps (n. m.)	Substance spécifique du sérum sanguin synthétisée par les <u>plasmocytes</u> (cellules issues des <u>lymphocytes</u>) après l'introduction d'un <u>antigène</u> et réagissant spécifiquement avec celui -ci, le plus souvent pour le détruire. Les anticorps jouent un rôle important dans la défense de l'organisme contre les infections (immunité), mais peuvent aussi être responsables de l'allergie.
[Ⓜ] Anticorps monoclonal	Les anticorps monoclonaux sont des anticorps synthétisés par un clone de <u>plasmocytes</u> , c'est-à-dire un groupe de cellules dérivées d'un seul et unique <u>lymphocyte B</u> . Ils sont strictement identiques entre eux, et actifs contre un seul antigène.
Antigène (n. m.)	Toute substance qui, introduite dans l'organisme, est susceptible de susciter une réponse immunitaire spécifique en commandant la formation d'un <u>anticorps</u> .
[Ⓜ] Asthénie (n. f.)	Affaiblissement de l'état général sans rapport avec le travail ou l'effort. Il est ressenti par le sujet comme une intense lassitude qu'un repos normal ne parvient pas à surmonter. Son origine peut être <u>somatique</u> ou psychique, mais plus souvent psychosomatique.
[Ⓜ] Céphalée (n.f.)	Douleur diffuse ou localisée dans la voûte crânienne. Les causes de céphalées sont diverses et multiples (fièvre, hypertension artérielle, troubles de la vue, syndrome méningé, tumeurs cérébrales, ...).
Chloroplaste (n.m.)	Organite de la cellule végétale, contenant la chlorophylle et siège de la photosynthèse.
[Ⓜ] Clivage (n. m.)	Aptitude pour un minéral ou pour une roche à se fendre facilement suivant une famille de plans parallèles bien définis.

Coprologie (n. f.)	Examen macroscopique et analyse microscopique et chimique des selles, qui permet de dépister des maladies parasitaires ou de localiser d'éventuelles perturbations des processus digestifs.
^m Coprologique (adj.)	Relatif à la <u>coprologie</u> .
^m Cosmopolite (adj.)	Qui est distribué sur toute (ou presque) la surface du globe.
^m Cristallin, e (adj.)	Se dit des roches formées de cristaux ; en pratique, on désigne comme roche cristalline une roche formée de cristaux visibles à l'œil, qui est le plus souvent une <u>roche plutonique</u> (e.g. : granite), mais parfois une <u>roche métamorphique</u> (e.g. : calcaire cristallin).
Cytoplasme (n. m.)	Ensemble des structures de la cellule vivante renfermées dans sa membrane, à l'exclusion du noyau. Il comporte le hyaloplasme, sans structure visible même au microscope électronique, et les organites qui y sont inclus (réticulum endoplasmique et ribosomes, mitochondries, appareil de Golgi, lysosomes, vacuoles, plastes). L'essentiel du métabolisme cellulaire (respiration, sécrétions, photosynthèse, ...) se déroule au sein du cytoplasme.
^m Diaclase (n. f.)	Cassure de roches ou de terrains sans déplacement relatif des parties séparées.
^m DIC (abrev.)	Microscopie en contraste de phase : Cette technique permet d'observer les cellules sans préparation ni coloration dans leur milieu d'origine. C'est donc l'une des rares techniques qui permet d'observer des cellules vivantes. Le principe est basé sur le fait que les structures biologiques sont transparentes, mais qu'elles ont un indice de réfraction différent. Les rayons lumineux vont donc subir des déviations en passant d'un milieu à un autre, cela se traduit par un déphasage entre les rayons. En supprimant les rayons lumineux en fonction de leur déphasage, on obtient une image en niveau de gris qui visualise tous les changements de milieu à l'intérieur de l'objet observé. En pratique, on supprime ces rayons déphasés en plaçant des diaphragmes qui bloquent la lumière dans l'axe de l'objectif, mais laissent passer ceux de la périphérie.
Diploïde (adj.)	Qui possède un nombre double de chromosomes par rapport à leur nombre dans les gamètes du même être.
^m Effusif, ive (adj.)	Qui atteint la surface et se répand à l'état fondu ; les roches effusives sont les laves.
^m Entérocyte (n. f.)	Cellule de l'intestin.
^m Épithélial, ale, aux (adj.)	Relatif à l' <u>épithélium</u> .
Épithélium (n. m.)	Membrane ou tissu formé de cellules juxtaposées, disposées de façon continue en une ou plusieurs couches (épithélium simple ou stratifié).

Eucaryote (n. m.)	Se dit d'une cellule caractérisée par un noyau individualisé par une enveloppe, qui renferme le matériel génétique. Le <u>génome</u> des espèces eucaryotes est réparti entre le noyau et certains organites du <u>cytoplasme</u> .
Eucaryotes (n. m. plur.)	Ensemble des espèces vivantes formées de cellules <u>eucaryotes</u> .
Extracytoplasmique (adj.)	À l'extérieur du <u>cytoplasme</u> .
Génome (n. m.)	Ensemble des gènes d'une cellule et, par extension, d'un individu.
Génotype (n. m.)	Ensemble des caractères contenus dans le <u>génome</u> d'un individu. Certains d'entre eux seront exprimés dans son <u>phénotype</u> , d'autres pourront l'être dans sa descendance. Un gène récessif, par exemple, contenu dans le génotype d'un sujet <u>hétérozygote</u> , n'est pas exprimé dans son <u>phénotype</u> , mais le sera dans celui de son descendant, à condition qu'il soit <u>homozygote</u> pour ce gène.
Gonade (n.f.)	Chez les animaux, organe où se forment les gamètes par division de cellules mères accompagnées de réduction chromatique. Les gonades sont improprement appelées « glandes » sexuelles (les glandes ne libèrent pas de cellules, mais les produits de l'activité de cellules sécrétrices).
Haploïde (adj.)	Se dit d'un noyau qui possède un nombre de chromosomes correspondant à la moitié de celui qui est contenu dans le noyau des cellules <u>somatiques</u> et d'une cellule qui présente un tel noyau, ou d'un individu dont les cellules sont ainsi dotées.
Hématocytomètre ou Hémocytomètre (n. m.)	Appareil utilisé pour compter les cellules, notamment celles du sang. Il s'agit d'une lame spéciale qui possède des grilles de mailles 1 mm sur 1 mm, avec une profondeur de 0,1 mm. Lorsque la lamelle est placée sur cette lame, chaque maille a alors un volume de 1 mm ³ . Les cellules sont donc comptées avec un microscope optique dans ce volume, ce qui permet alors de calculer la concentration.
Hématocytométrie (n. f.)	Technique de titrage utilisant un <u>hématocytomètre</u> .
Hétérozygote (adj. et n. m.)	Se dit d'un être vivant dont un caractère héréditaire au moins est présent sous deux formes <u>alléliques</u> différentes, correspondant aux deux gènes de <i>locus</i> homologues d'une paire de chromosomes. En général, un seul de ces états se manifeste, du fait de sa dominance.
Homozygote (adj. et n. m.)	Se dit d'une cellule ou d'un individu qui possède deux <u>allèles</u> identiques et au moins un gène sur les deux chromosomes homologues, porteurs de ce couple <u>d'allèles</u> . Ses gamètes sont identiques au point de vue de ce caractère, chacun recevant l'un des deux gènes.

▫ Ignées (roches -)	V. <u>magmatiques</u> .
▫ Kyste (n. m.)	Formation résistante résultant de la sécrétion par un petit organisme d'une paroi dure, à l'intérieur de laquelle il se tient en vie ralentie.
▫ Lame à puits	Appareil utilisé pour compter des cellules ou des micro-organismes. Il s'agit d'une lame possédant une ou plusieurs cavités de volume fixe. Un volume correspondant de la solution à titrer est placé dans ces cavités, puis la lame est recouverte par une lamelle. Le comptage se fait sous microscope optique, soit par immunofluorescence, soit par contraste de phase (<u>DIC</u>).
▫ Lithologie (n. f.)	Nature des roches d'une formation géologique.
Lymphocyte (n. m.)	Type de globule blanc mononucléaire, présent dans le sang et dans la moelle osseuse, élaboré dans les organes <u>lymphoïdes</u> (ganglions, rate, amygdales). Il existe trois tailles de lymphocytes : les petits, les moyens, les grands ; selon leur fonction, on distingue : les lymphocytes T à vie longue et les lymphocytes B à vie courte. Les lymphocytes sont le support des phénomènes immunitaires, ils composent normalement de 20 à 40 % du nombre total des globules blancs.
Lymphoïde (adj.)	Tissu, système lymphoïde : ensemble constitué par les <u>lymphocytes</u> et les organes lymphoïdes (thymus, moelle osseuse, ganglions lymphatiques, amygdales, ...) et dont dépendent les réactions d'immunité spécifique de l'organisme.
Magma (n. m.)	Liquide à haute température (au moins 600°C) qui donne des roches par solidification, soit à une certaine profondeur au cours d'un refroidissement lent (<u>roches plutoniques</u>), soit en surface par un refroidissement rapide de laves (roches volcaniques)
Magmatiques (roches -) (Syn. r. ignées)	Roche résultant de la cristallisation d'un <u>magma</u> .
Méiose (n. f.)	Processus de division cellulaire propre aux cellules sexuelles, comprenant deux divisions nucléaires successives, et au terme duquel une cellule initiale possédant deux jeux de chromosomes (cellule <u>diploïde</u>) donne quatre cellules filles ne possédant qu'un seul jeu de chromosomes (cellules <u>haploïdes</u>).
▫ Méiotique (adj.)	Qui concerne la <u>méiose</u> , qui se forme par l'intervention d'une <u>méiose</u> .
▫ Métamorphisme (adj.)	Transformation d'une roche à l'état solide du fait d'une élévation de température et/ou de pression, avec cristallisation de nouveaux minéraux, dits néoformés, et acquisition de textures et structures particulières, sous l'influence de conditions physiques et/ou chimiques différentes de celles ayant présidé à la formation de la roche originelle. Les phénomènes métamorphiques sont multiples et complexes, et les roches métamorphiques très variées.

▫ Mitose (n. f.)	Division du noyau des cellules avec individualisation des chromosomes de celui-ci.
▫ Parentéral, ale, aux (adj.)	Qui est introduit dans l'organismes par une voie autre que le tube digestif.
Phénotype (n. m.)	Ensemble des caractères apparents d'un être. Ils sont tous déterminés par son <u>génotype</u> , mais tous les caractères du <u>génotype</u> ne se manifestent pas dans le phénotype : les vertébrés ont, par exemple, dans leur <u>génotype</u> les caractères des deux sexes, mais aussi les gènes qui commandent l'expression dans le phénotype de ceux d'un seul sexe, par l'intermédiaire d'hormones, et ceux de l'autre sexe ne sont pas exprimés.
▫ Phyllosilicate (n. m.)	<u>Silicate</u> dont les tétraèdres $(\text{SiO}_4)^{4-}$ sont disposés en feuillets.
Phylum (n. m.)	Vaste ensemble d'êtres vivants présentant des traits communs et ayant un ancêtre commun, à partir duquel il s'est progressivement différencié au cours de l'évolution. Le terme s'applique à tout groupe naturel de quelque importance (embranchement, classe, ordre, famille même).
Plasmocyte (n. m.)	Petite cellule <u>lymphoïde</u> dont le noyau est excentrique et le cytoplasme, fortement basophile. Les plasmocytes participent à la synthèse des anticorps.
Plutonique (roche -) (Syn. pluton)	Roche résultant de la cristallisation d'un <u>magma</u> à une certaine profondeur au cours d'un refroidissement lent.
Protéolyse (n.f.)	Hydrolyse enzymatique des protéines.
▫ Protéolytique (adj.)	De la <u>protéolyse</u> .
▫ Protozoaire (n. m.)	Le terme de «protozoaires» s'applique à une série de groupes d'organismes <u>eucaryotes</u> , unicellulaires et dépourvus de <u>chloroplastes</u> . Il s'agit de plusieurs dizaines de milliers d'espèces, libres ou parasites, regroupées en plus de dix <u>phylums</u> . Les protozoaires ne forment pas un groupe «naturel» (monophylétique), mais plutôt un assemblage de lignées évolutives distinctes que l'on regroupe pour des raisons de commodité. Les protozoaires sont des cellules très différenciées, remplissant les nombreuses fonctions nécessaires à la vie et comportant des organites complexes: vacuoles pulsatiles, cils, flagelles, ... On distingue plusieurs embranchements, parmi lesquels : les zooflagellés; les rhizopodes ; les actinopodes (radiolaires, notamment) ; les <u>sporozoaires</u> (coccidies, notamment) ; les cnidosporidies ; les infusoires (ciliés, notamment).
▫ Silicate (n. m.)	Minéral caractérisé par le motif élémentaire tétraédrique $(\text{SiO}_4)^{4-}$ comportant un atome Si au centre, et des atomes O aux 4 sommets. Ces tétraèdres sont reliés entre eux soit par des cations, soit, en partie, par un ou plusieurs atomes O, communs de ce fait à 2 tétraèdres.

Soma (n. m.)	(1) Ensemble du corps, à l'exception des cellules sexuelles, mais y compris les <u>gonades</u> qui les abritent. (2) Le corps, par opposition au psychisme.
Somatique (adj.)	Qui concerne le <u>soma</u> (1) (2) ; qui lui appartient.
^mSporozoaire (n.m.)	Embranchement de <u>protozoaires</u> (coccidies, notamment) dépourvus d'appareil locomoteur à l'état adulte, parasites des cellules animales.
^mTaxinomie (n. f.) (Syn. Taxonomie)	Branche de la biologie spécialisée dans la classification des espèces et dans leur nomenclature.

LISTE DES SYMBOLES

Symbole	Description	Unité
$A(t)$	« Constante » d'intégration du bilan de masse dans le réservoir	$[ML^{-3}]$
A^k	Valeur de la dérivée par rapport au temps de $A(t)$ au pas de temps ($k \Delta t$)	$[ML^{-3}T^{-1}]$
A^k	Valeur de $A(t)$ au pas de temps ($k \Delta t$)	$[ML^{-3}]$
C^*	Concentration à l'équilibre de la substance considérée dans la phase mobile	$[ML^{-3}]$
$C_C(x,t)$	Concentration de la solution dans la colonne à la position x et au temps t	$[ML^{-3}]$
$C_{Ce}(t)$	Concentration de la solution entrant dans la colonne	$[ML^{-3}]$
$C_{Cs}(t)$	Concentration de la solution sortant de la colonne	$[ML^{-3}]$
C_0	Concentration de la solution injectée	$[ML^{-3}]$
$C_{éch}$	Concentration en oocystes dans l'échantillon	(oocystes/ml)
C_{fix}	Concentration de la substance considérée fixée par masse de solide	$[MM^{-1}_{solide}]$
C^*_{fix}	Concentration à l'équilibre de la substance considérée fixée par masse de solide	$[MM^{-1}_{solide}]$
C_{ooc}	Nombre d'oocystes par volume de suspension	(oocystes/ml)
$C_R(t)$	Concentration de la solution dans le réservoir	$[ML^{-3}]$
$C_{Re}(t)$	Concentration de la solution entrant dans le réservoir	$[ML^{-3}]$
$C_{Rs}(t)$	Concentration de la solution sortant du réservoir	$[ML^{-3}]$
C_{R0}	Concentration initiale dans le réservoir	$[ML^{-3}]$
C_{T0}	Concentration initiale en oocystes de la suspension utilisée pour l'essai	(oocystes/ml)
C_v	Volume de particule par volume de suspension	[-]
d	Distance inter-réticulaire qui sépare deux feuillets successifs d'argile	[L]
d_{10}	Diamètre des grains correspondant à 10 % de tamisat	[L]
d_{60}	Diamètre des grains correspondant à 60 % de tamisat	[L]
d_g	Diamètre moyen des grains	[L]
d_{g0}	Diamètre moyen initial des grains	[L]
D_{ij}	Composantes du tenseur de dispersion	$[L^2T^{-1}]$
D_L	Coefficient de dispersion longitudinale	$[L^2T^{-1}]$
D_m	Coefficient de diffusion moléculaire	$[L^2T^{-1}]$
d_{ooc}	Diamètre des oocystes	[L]
d_p	Diamètre moyen des pores	[L]
dt	Pas de temps	[T]
g	Accélération de la pesanteur	$[LT^{-2}]$

K_1	Coefficient de la loi de Langmuir	$[L^3M^{-1}_{solide}]$
K_2	Coefficient de la loi de Langmuir	$[L^3M^{-1}]$
K_d	Coefficient de partage linéaire entre phases	$[L^3M^{-1}_{solide}]$
k_{des}	Constante de désorption des particules sur le solide	$[T^{-1}]$
K_f	Coefficient de partage de la loi de Freundlich	$[L^{3n}M^{1-n}M^{-1}_{solide}]$
L	Longueur du milieu poreux dans la colonne	$[L]$
m_s	Masse de milieu poreux	$[M]$
N_0	Nombre d'oocystes entrant dans la colonne	(oocystes)
N_f	Nombre d'oocystes sortant de la colonne après filtration	(oocystes)
Pe_{col}	Nombre de Péclet de colonne	$[-]$
Pe_d	Nombre de Péclet dynamique	$[-]$
Pe_m	Nombre de Péclet moléculaire	$[-]$
q	Débit volumique	$[L^3T^{-1}]$
t	Temps	$[T]$
t_a	Temps d'advection	$[T]$
t_d	Temps de dispersion	$[T]$
t_m	Temps de diffusion	$[T]$
t_T	Temps de transfert au sein de la colonne	$[T]$
U_i	Composantes de la vitesse de pore	$[LT^{-1}]$
U_j	Composantes de la vitesse de pore	$[LT^{-1}]$
V_p	Volume de pores	$[L^3]$
v_{pore}	Vitesse moyenne de pore	$[LT^{-1}]$
$V_R(t)$	Volume du réservoir	$[L^3]$
V_S	Vitesse de sédimentation ou vitesse de STOKES	$[LT^{-1}]$
x	Position des particules dans la colonne	$[L]$
$X(t)$	Position de la particule considérée au temps t	$[L]$
$Z_{k,t}$	Nombre d'oocystes de la génération k au pas de temps t	(oocystes)
α	Efficacité de collision	$[-]$
α_L	Coefficient de dispersivité longitudinale	$[L]$
α_T	Coefficient de dispersivité transversale	$[L]$
β_i	Valeur de $\beta(t)$ sur l'intervalle i où le volume du réservoir est constant	$[T^{-1}]$
$\beta(t)$	Rapport du débit volumique sur le volume du réservoir	$[T^{-1}]$
δ_{ij}	Symbole de KRONECKER	$[-]$

Δt	Pas de temps	[T]
ε	Porosité cinématique du milieu poreux	[-]
ε_{dep}	Porosité du dépôt de particules	[-]
ε_{ini}	Porosité initiale du milieu poreux	[-]
η	Efficacité de capture	[-]
λ	Coefficient de filtration colloïdale	[L ⁻¹]
μ	Viscosité dynamique du fluide	[ML ⁻¹ T ⁻¹]
$v(T)$	Taux de viabilité à la température T (°C)	(j ⁻¹)
θ_{ooc}	Nombre d'oocystes retenus par filtration par volume de milieu poreux	(oocystes/ml)
ρ	Masse volumique du fluide	[ML ⁻³]
ρ_{ooc}	Masse volumique des oocystes	[ML ⁻³]
σ	Volume de particules filtrées par volume de milieu poreux	[-]
ξ	Nombre aléatoire issu d'une loi normale centrée réduite	[-]

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- AFNOR NF T90-455 (2001) - Qualité de l'eau – Recherche et dénombrement d'oocystes de *Cryptosporidium parvum* et de kystes de *Giardia* – Méthode de concentration et de dénombrement. *Association Française de Normalisation*, 25 p.
- ALBRECHT G. (1996) - *Cryptosporidium parvum* transport through clay and sand soil columns. *B.S. Thesis, Cornell University*, 41 p.
- Anonyme (1996a) - Japan's largest outbreak. *Cryptosporidium Capsule Newsletter*, vol. 1, n°12, 4-5.
- Anonyme (1996b) - Largest *Cryptosporidium* outbreak ever reported in British Columbia, Canada. *Cryptosporidium Capsule Newsletter*, vol. 1, n°11, 1-2.
- Anonyme (1996c) - Report released on outbreak in Cranbrook, British Columbia. *Cryptosporidium Capsule Newsletter*, vol. 2, n°1,6.
- Anonyme (1997a) - Cryptosporidiosis in South East England; outbreak in West Hertfordshire and North London; Clusters of cases in Bedfordshire. *Cryptosporidium Capsule Newsletter*, vol. 2, n°6, 1-4.
- Anonyme (1997b) - Outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 infection and cryptosporidiosis associated with drinking unpasteurized apple cider -- Connecticut and New-York, October 1996. *Morb. Mort. Wkly. Rep.*, vol. 46, n°1, 4-8.
- Anonyme (1998a) - Foodborne outbreak of cryptosporidiosis -- Spokane, Washington, 1997. *Morb. Mort. Wkly. Rep.*, vol. 47, n°27, 564-567.
- Anonyme (1998b) - Report on waterborne outbreak in Italy, 1995. *Cryptosporidium Capsule Newsletter*, vol. 3, n°3, 5.
- Anonyme (1999) - Outbreak declared in NW England-water samples found positive. *Cryptosporidium Capsule Newsletter*, vol. 4, n°8, 1.
- ATHERTON F., NEWMAN C.P. & CASEMORE D.P. (1995) - An outbreak of waterborne cryptosporidiosis associated with a public supply in the UK. *Epidemiol. infect.*, vol. 115, n°1, 23-131.
- BADENOCH J. (1990) - *Cryptosporidium* in water supplies - Report of the group of experts. *Department of Environment, Department of Health, Her Majesty's Stationery Office (HMSO)*, London, 230 p.
- BARER M.R. & WRIGHT A.E. (1990) - A review : *Cryptosporidium* and water. *Lett. appl. microbiol.*, vol. 11, n°6, 271-277.
- BENNETT J.W., GAUCI M.R., Le MOENIC S., SCHAEFER F.W. & LINDQUIST H.D. (1999) - A comparison of enumeration techniques for *Cryptosporidium parvum* oocysts. *J. Parasitol.*, vol. 87, n°1, 1-7.
- BONNIN A. & CAMERLYNCK P. (1989) - Cryptosporidiose humaine. Aspects épidémiologiques et cliniques. *Méd. mal. Infect.*, vol. 19, n°1, 35-41.
- BONNIN A., FOURMAUX M.N., DUBREMETZ J.F., NELSON R.G., GOBET P., HARLY G., BUISSON M., PUYGAUTHIER-TOUBAS D., GABRIEL-POSPISIL F., NACIRI M. & CAMERLYNCK P. (1996) - Genotyping human and bovine isolates of *Cryptosporidium parvum* by polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism analysis of a repetitive DNA sequence. *FEMS Microbiol. Lett.*, vol. 137, n°2-3, 207-211.
- BOUCHIER, I. (1998) - *Cryptosporidium* in water supplies. *Third report of the group of experts; Department of Environment, Transport and the Regions, Department of Health, Her Majesty's Stationery Office (HMSO)*, London, 171.

- BRETAGNE S., JACOVELLA J., BREUIL J., GUILLOT F., LIANCE M. & HOUIN R. (1990) - Cryptosporidiose chez les enfants : épidémies et cas sporadiques. *Ann. Pédiatr. (Paris)*, vol. 3-7, n°6, 381-386.
- BRIGMAN 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. *Epidemiol. Infect.*, vol. 115, n°3, 555-566.
- BRUSH C.F. (1997) - Surface and transport properties of *Cryptosporidium parvum* oocysts. *PhD Thesis, Cornell University*, 168 p.
- BUDDEMEIER R.W. & HUNT J.R. (1988) - Transport of colloidal contaminants in groundwater: radionuclide migration at the Nevada test site. *Appl. Geochem.*, vol. 3, n°5, 535-548.
- BUÈS M.A. & ZILLIOX L. (1990) - Déplacement miscible avec contrastes de densité et viscosité en milieu poreux. Identification des paramètres de déplacement et stabilité en régime de dispersion mécanique. *J. Hydrol.*, vol. 120, n°1-4, 125-141.
- BUKHARI Z. & SMITH H.V. (1995) - Effect of three concentration techniques on viability of *Cryptosporidium parvum* oocysts recovered from bovine faeces. *J. Clin. Microbiol.*, vol. 33, n°10, 2592-2595.
- CASES J.M. & VILLIERAS F. (1992) - Thermodynamic model of ionic and nonionic surfactant adsorption-abstraction on heterogeneous surfaces. *Langmuir*, vol. 89, n°5, 1251-1264.
- CHESNOT T., MARLY X., CHEVALIER S., ESTÉVENON O., BUÈS M. & SCHWARTZBROD J. - Optimised immunofluorescence procedure for enumeration of *Cryptosporidium parvum* oocyst suspensions. *Water Research* (In press).
- CHEVALIER S., BUÈS M.A., TOURNEBIZE J. & BANTON O. (2001) - Stochastic delineation of wellhead protection area in fractured aquifers and parametric sensitivity study. *Stoch. Environ. Res. Risk Assess.*, vol. 15, n°3, 205-227.
- CLANCY J.L. (2001) - Lessons from the 1998 Sydney water crisis. *Water*, vol. 28, n°1, 33-36.
- COMPAGNON B., ROBERT C., MENNECART V., De ROUBIN M-R., CERVANTES P. & JORET J-C. (1997) - Improved detection of *Giardia* cysts and *Cryptosporidium* oocysts in water by flow cytometry. *Proceedings AWWA-WQTC*, November 1997, Denver.
- CONSIDINE R.F., DIXON D.R. & DRUMMOND C.J. (2000) - Laterally-resolved force microscopy of biological microspheres–oocysts of *Cryptosporidium parvum*. *Langmuir*, vol. 16, n°3, 1323-1330.
- CURRENT W.L. & HAYNES T.B. (1984) - Complete development of *Cryptosporidium* in cell culture. *Science*, vol. 224, n°4949, 603-605.
- CURRENT W.L. (1987) - *Cryptosporidium* its biology and potential for environmental transmission. *Crit. Rev. Environ. Control.*, vol. 17, 21-51.
- D'ANTONIO R.G., WINN R.E., TAYLOR J.P., GUSTAFSON T.L., CURRENT W.L., RHODES M.M., GARY G.W. Jr & ZAJAC R.A. (1985) - A waterborne outbreak of cryptosporidiosis in normal hosts. *Ann. Intern. Med.*, vol. 103, n°6, 886-888.
- DE MARSILY G. (1981) - Hydrogéologie quantitative. *Collection Sciences de la Terre, Masson*, 215 p.
- DIDELOT V. (1991) - Contribution à l'étude de la cryptosporidiose chez le jeune enfant et le jeune bovin – Essai d'évaluation de la cryptosporidiose animale dans le Nord-Est de la France. *Thèse, Faculté de Pharmacie, Université de Nancy I*, 152 p.

- DRIEDGER A.M., RENNECKER J.L. & MARIÑAS B.J. (2000a) - Sequential inactivation of *Cryptosporidium parvum* oocysts with ozone and free chlorine. *Water Res.*, vol. 34, n°14, 3591-3597.
- DRIEDGER A.M., RENNECKER J.L. & MARIÑAS B.J. (2000b) - Inactivation of *Cryptosporidium parvum* oocysts with ozone and monochloramine at low temperature. *Water Res.*, vol. 35, n°1, 41-48.
- DROZD C. (1996) - Comportement de *Cryptosporidium spp.* dans l'eau : conséquences au niveau de la microfiltration tangentielle. *Thèse, Faculté de Pharmacie, Université de Nancy I*, 236 p.
- DROZD C. & SCHWARTZBROD J. (1996) - Hydrophobic and electrostatic cell surface properties of *Cryptosporidium parvum*. *Appl. Environ. Microbiol.*, vol. 62, n°4, 1227-1232.
- DUPONT H.L., CHAPPEL C.L., STERLING C.R., OKHUYSEN P.C., ROSE J.B. & JAKUBOWSKI W. (1995) - The infectivity of *Cryptosporidium parvum* in healthy volunteers. *N. Engl. J. Med.*, vol. 332, n°13, 855-859.
- DWORKIN M.S., GOLDMAN D.P., WELLS T.G., KOBAYASHI J.M. & HERWALDT B.L. (1996) - Cryptosporidiosis in Washington State: an outbreak associated with well water. *J. Infect. Dis.*, vol. 174, n°6, 1372-1376.
- EMONET A. (2001) - Migration de phases liquides non aqueuses dans les milieux poreux – Mise au point d'un dispositif expérimental. *Rapport LAEGO / INERIS, LG.AE.INE.PSI.RPRE.01.0218.A*, 77 p.
- EPA/814-B-95-003 (1995) - ICR Protozoan method for detecting *Giardia* cysts and *Cryptosporidium* oocysts in water by a fluorescent antibody procedure. *Environmental Protection Agency, Office of Ground Water and Drinking Water, Cincinnati, OH 45268, section VII*, 39 p.
- EVANS M.R. & GARDNER D. (1996) - Cryptosporidiosis outbreak associated with an educational farm holiday. *Commun. Dis. Rep. CDC Rev.*, vol. 6, n°3, 50-51.
- FAYER R. (1994) - Effect of high temperature on infectivity of *Cryptosporidium parvum* oocysts in water. *Appl. Environ. Microbiol.*, vol. 60, n°8, 2732-2735.
- FAYER R. & NERAD T. (1996) - Effect of low temperature on viability of *Cryptosporidium parvum* oocysts. *Appl. Environ. Microbiol.*, vol. 62, n°4, 1431-1433.
- FAYER R., GRACZYK T.K., CRANFIELD M.R. & TROUT J.M. (1996) - Gaseous disinfection of *Cryptosporidium parvum* oocysts. *Appl. Environ. Microbiol.*, vol. 62, n°10, 3908-3909.
- FAYER R., MORGAN U. & UPTON S.J. (2000) - Epidemiology of *Cryptosporidium*: transmission, detection and identification. *Int. J. Parasitol.*, vol. 30, n°12-13, 1305-1322.
- FINCH G.R., DANIELS C.W., BLACK E.K., SCHAEFFER III F.W. & BELOSEVIC M. (1993) - Dose response of *Cryptosporidium parvum* in outbred neonatal CD-1 mice. *Appl. Environ. Microbiol.*, vol. 59, n°11, 3661-3665.
- FRIED J.J. & COMBARNOUS M.A. (1971) - Dispersion in porous media. *Adv. Hydrosci.*, vol.7, 280p.
- GARNIER P., DARNAULT C., STEENHUIS T., PARLANGE J-Y., BAVEYE P. & GHIORSE W. (1998) - Transport of *Cryptosporidium parvum* in soil. *Congrès Mondial de Science du Sol*, 20-26 août 1998, Montpellier.
- GOLLNITZ W.D., CLANCY J.L., & GARNER S.C. (1997) - Reduction of microscopic particulates by aquifers. *J. Am. Water Works Assoc.*, vol. 89, n°11, 84-93.
- HANCOCK C.M., ROSE J.B. & CALLAHAN M. (1998) - *Crypto* and *Giardia* in U.S. groundwater. *J. Am. Water Works Assoc.*, vol. 9, n°3, 58-61.

- HANSEN J.S. & ONGERTH J.E. (1991) - Effects of time and watershed characteristics on the concentration of *Cryptosporidium* oocysts in river. *Appl. Environ. Microbiol.*, vol. 57, n°10, 2790-2795.
- HARTER T., WAGNER S. & ATWILL E.R. (2000) - Colloïd transport and filtration of *Cryptosporidium parvum* in sandy soils and aquifer sediments. *Environ. Sci. Technol.*, vol. 34, n°1, 62-70.
- HARVEY R.W., KINNER N.E., MacDONALD D., METGE D. & BUNN A. (1993) - Role of physical heterogeneity in the interpretation of small-scale laboratory and field observation of bacteria, microbial-sized microspheres, and bromide transport through aquifer sediments. *Water Resour. Res.*, vol. 29, n°8, 2713-2721.
- HARVEY R.W., KINNER N.E., BUNN A., MACDONALD D. & METGE D. (1995) - Transport behavior of groundwater protozoa and protozoan-sized microspheres in sandy aquifer sediments. *Appl. Environ. Microbiol.*, vol. 61, n°1, pp.209-217.
- HAYES E.B., MATTE T.D., O'BRIEN T.R., MCKINLEY T.W., LOGSDON G.S., ROSE J.B., UNGAR B.L., WORD D.M., PINSKY P.F., CUMMINGS M.L. (1989) - Large community outbreak of cryptosporidiosis due to contamination of filtered public water supply. *N. Engl. J. Med.*, vol. 320, n°21, 1372-1376.
- HSU B-M., HUANG C. & PAN J.R. (2001) - Filtration behaviours of *Giardia* and *Cryptosporidium* – ionic strength and pH effects. *Water Res.*, vol. 35, n°16, 3777-3782.
- IFEN (1999) - Chiffres-clés de l'environnement. *Institut Français de l'Environnement (IFEN)*, 24 p.
- IWASAKI T. (1937) - Some notes on sand filtration. *J. Am. Water Works Assoc.*, vol. 29, 1591.
- JACKSON R.E. (1981) - Geochemical and biochemical attenuation process. In «Aquifer contamination and protection». *Studies and Reports in Hydrology*, n°30, projet 8-3 du PHI, *Unesco*.
- JOHNSON D.W., PIENIAZEK N.J., GRIFFIN D.W., MISENER L. & ROSE J.B. (1995) - Development of a PCR protocol for sensitive detection of *Cryptosporidium* oocysts in water sample. *Appl. Environ. Microbiol.*, vol. 61, n°11, 3849-3855.
- JOSEPH C., HAMILTON G., O'CONNOR M., NICHOLAS S., MARSHALL R., STANWELL-SMITH R., SIMS R., NDAWULA E., CASEMORE D., GALLEGHER P. & HARNETT P. (1991) - Cryptosporidiosis in the Isle of Thanet ; a outbreak associated with local drinking water. *Epidemiol. Infect.*, vol. 107, n°3, 509-519.
- KARAMAN M.E., PASHLEY R.M., BUSTAMANTE H. & SHANKER S.R. (1999) - Microelectrophoresis of *Cryptosporidium parvum* oocysts in aqueous solution of inorganic and surfactant cations. *Colloids Surf., A Physicochem. Eng. Asp.*, vol. 146, n°1-3, 217-225.
- KETELAARS H.A.M., MEDEMA G., VAN BREEMEN L.W.C.A., VAN DER KOOIJ D., NOBEL P.J. & NUHN P. (1995) - Occurrence of *Cryptosporidium* oocysts and *Giardia* cysts in the river Meuse and removal in the Biesboch reservoirs. *J. Water SRT – Aqua*, vol. 44, Suppl. 1, 108-111.
- KINZELBACH W. (1986) - Groundwater modelling, an introduction with sample programs in Basic. *Elsevier Science Publisher, Amsterdam*, 333 p.
- KORICH D.G., MEAD J.R., MADORE M.S., SINCLAIR N.A. & STERLING C.D. (1990) - Effects of ozone, chlorine dioxide, chlorine and monochloramine on *Cryptosporidium parvum* oocysts viability. *Appl. Environ. Microbiol.*, vol. 56, n°5, 1423-1428.
- KRAMMER M.H., SORHAGE F.E., GOLDSTEIN S.T., DALLEY E., WAHLQUIST S.P. & HERWALDT B.L. (1998) - First reported outbreak in the United States of cryptosporidiosis associated with a recreational lake. *Clin. Infect. Dis.*, vol. 26, n°1, 27-33.

- KUROKI T., WATANABE Y., ASAI Y., YAMAI S., ENDO T., UNI S., KIMATA I. & ISEKI M. (1996) - An outbreak of waterborne Cryptosporidiosis in Kanagawa, Japan. *Kansenshogaku Zasshi*, vol. 70, n°2, 132-140.
- LECHEVALLIER M.W., NORTON W.D. & LEE R.G. (1991) - Occurrence of *Giardia* and *Cryptosporidium spp.* in surface water supplies. *Appl. Environ. Microbiol.*, vol. 57, n°9, 2610-2616.
- LECHEVALLIER M.W., NORTON W.D., SIEGEL J.E. & ABBASZADEGAN M. (1995) - Evaluation of the immunofluorescence procedure for detection of *Giardia* cysts and *Cryptosporidium* oocysts in water. *Appl. Environ. Microbiol.*, vol. 61, n°2, 690-697.
- LEFAY D., NACIRI M., POIRIER P. & CHERMETTE R. (2000) - Prevalence of *Cryptosporidium* infection in calves in France. *Vet. Parasitol.*, vol. 89, n°1-2, 1-9.
- LELAND D., MCANULTY J., KEENE W. & STEVENS G. (1993) - A cryptosporidiosis outbreak in a filtered water supply. *J. Am. Water Works Assoc.*, vol. 85, n°6, 34-42.
- LEVINE N.D. (1984) - Taxonomy and review of the coccidian genus *Cryptosporidium* (protozoa, apicomplexa). *J. Protozool.*, vol. 31, n°1, 94-98.
- LINDQUIST H.D., DUFOUR A.P., WYMER L.J. & SCHAEFER F.W. (1999) - Criteria for the evaluation of proposed protozoan detection methods. *J. Microbiol. Methods*, vol. 37, 33-43.
- MAC KENZIE W.R., HOXIE N.J., PROCTOR M.E., GRADUS M.S., BLAIR K.A., PETERSON D.E., KAZMIERCZAK J.J., ADDIS D.G., FOX K.F., ROSE J.B. & DAVIS J.P. (1994) - A massive outbreak in Milwaukee of *Cryptosporidium* infection through the public water supply. *N. Engl. J. Med.*, vol. 331, n°3, 161-167.
- MAGGI P., LAROCCA A. M. V., QUARTO M., SERIO G., BRANDONISIO O., ANGARANO G. & PASTORE G. (2000) - Effect of antiretroviral therapy on cryptosporidiosis and microsporidiosis in patients infected with human immunodeficiency virus type 1. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.*, vol. 19, n°3, 213-217.
- MAGUIRE H.C., HOLMES E., HOUYER J., STRANGWAYS J.E., FOSTER P., HOLLIMAN R.E. & STANWELLSMITH R. (1995) - An outbreak of cryptosporidiosis in south London: what value the p value? *Epidemiol. Infect.*, vol. 115, n°2, 279-287.
- MARLY X., CHEVALIER S., BUÈS M., SCHWARTZBROD J. & ESTÉVENON O. (2001) - Experimental investigations and numerical modelling of *Cryptosporidium parvum* transport behaviour in aquifers. *Water Sci. Technol.*, vol. 43, n°12, 109-116.
- MAWDSLEY J.L., BROOKS A.E. & MERRY R.J. (1996a) - Movement of the protozoan *Cryptosporidium parvum* through three contrasting soil types. *Biol. Fertil. Soils*, vol. 21, n°1-2, 30-36.
- MAWDSLEY J.L., BROOKS A.E. & MERRY R.J. (1996b) - Use a novel soil tilting table apparatus to demonstrate the horizontal and vertical movement of the protozoan pathogen *Cryptosporidium parvum* in soil. *Biol. Fertil. Soils*, vol. 23, n°2, 215-220.
- MCLAUCHLIN J., AMAR C., PEDRAZA-DIAZ S., & NICHOLS G. L. (2000) - Molecular epidemiological analysis of *Cryptosporidium spp.* in United Kingdom: Results of genotyping *Cryptosporidium spp.* in 1,705 fecal samples from human and 105 fecal samples from livestock animals. *J. Clin. Microbiol.*, vol. 38, n°11, 3984-3990.
- MEDEMA G.J., SCHETS F.M., TEUNIS P.F.M. & HAVELAAR A.H. (1998) - Sedimentation of free and attached *Cryptosporidium* oocysts and *Giardia* cysts in water. *Appl. Environ. Microbiol.*, vol. 64, n°11, 4460-4466.
- MEISEL J.L., PERERA D.R., MELIGRO C. & RUBIN C.E. (1976) - Overwhelming watery diarrhea associated with a *Cryptosporidium* in a immunosuppressed patient. *Gastroenterology*, vol. 70, n°6, 1156-1160.

- MINNIEFIELD K.D. (1997) - Laboratory investigation of *Cryptosporidium parvum* oocysts transport during flow through saturated sand columns. *Master of Science, Cornell University*, 94 p.
- MINTS D.M. (1951) - Kinetics of the filtration of low concentration suspensions through waters filters. *Dokl. AKAD. Nauk SSSR*, vol. 78, 315.
- MOORE A.C., HERWALDT B.L., CRAUN G.F., CALDERON R.L., HIGHSMITH A.K. & JURANEK D.D. (1993) - Surveillance for waterborne disease outbreaks – United States, 1991-1992. *MMWR CDC Surv. Sum.*, vol. 42, n°5, 1-22.
- MORGAN U.M., XIAO L., FAYER R., LAL A.A. & THOMPSON A.R.C. (1999) - Variation in *Cryptosporidium*: towards a taxonomic revision of the genus. *Int. J. Parasitol.*, vol. 29, n°11, 1733-1751.
- MUSIAL C.E., ARROWOOD M.J., STERLING C.R. & GERBA C.P. (1987) - Detection of *Cryptosporidium* in water by using polypropylene cartridge filters. *Appl. Environ. Microbiol.*, vol. 53, n°4, 687-692.
- NIME F.A., BUREK J.D., PAGE D.L., HOLSCHER M.A. & YARDLEY J.H. (1976) - Acute enterocolitis in a human being infected with the protozoan *Cryptosporidium*. *Gastroenterology*, vol. 70, n°4, 592-598.
- OKHUYSSEN 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. *J. Infect. Dis.*, vol. 180, n°4, 1275-1281.
- PANCIERA R.J., THOMASSEN R.W. & GARDNER F.M. (1971) - Cryptosporidial infection in a calf. *Vet. Pathol.*, vol. 8, 479-484.
- PENDSE H., CHI TIEN, TURIAN R.M. & RAJAGOPALAN R. (1978) - Dispersion measurements in clogged filter beds – A diagnostic study on the morphology of particle deposition. *AIChE J.*, vol. 24, 473.
- PETERSEN C. (1993) - Cellular biology of *Cryptosporidium*. *Parasitol. Today*, vol. 9, n°3, 87-91.
- PFANNKUCH H.O. (1962) - Contribution à l'étude des déplacements de fluides miscibles dans un milieu poreux. *Thèse de Docteur-Ingénieur, Faculté des Sciences de l'Université de Paris*, 54 p.
- PITLIK S.D., FAINSTEIN V., RIOS A., GUARDA L., MANSELL P.W. & HERSH E.M. (1983) - Cryptosporidial cholecystitis. *N. Engl. J. Med.*, vol. 308, n°16, 967.
- RAJAGOPALAN R. & TIEN C. (1976) - Trajectory analysis of deep bed filtration using shere-in-cell porous media model, *AIChE J.*, vol. 22, 523.
- RENNECKER J.L., DRIEDGER A.M., RUBIN S.A. & MARIÑAS B.J. (2000) - Synergy in sequential inactivation of *Cryptosporidium parvum* with ozone/free chlorine and ozone/monochloramine. *Water Res.*, vol. 34, n°17, 4121-4130.
- RICHARDSON A.J., FRANKENBERG R.A., BUCK A.C., SELKON J.B., COLBURNE J.S., PARSONS J.W. & MAYON-WHITE R.T. (1991) - An outbreak of waterborne cryptosporidiosis in Swindon and Oxfordshire. *Epidemiol. Infect.*, vol. 107, n°3, 485-495.
- ROBERTSON L.J., CAMPBELL A.T. & SMITH H.V. (1992) - Survival of *Cryptosporidium parvum* oocysts under various environmental pressures. *Appl. Environ. Microbiol.*, vol. 58, n°11, 3494-3500.
- ROBERTSON L.J., CAMPBELL A.T. & SMITH H.W. (1993) - Induction of folds or sutures on the walls of *Cryptosporidium parvum* oocysts and their importance as a diagnostic feature. *Appl. Environ. Microbiol.*, vol. 59, n°8, 2638-2641.

- ROCQUES H. (1990) - Fondements théoriques du traitement chimique des eaux, Technique et Documentation. *Lavoisier*, vol. 1, 520 p.
- ROEFER P.A., MONSCVITZ J.T. & REXING D.J. (1996) - The Las-Vegas cryptosporidiosis outbreak. *J. Am. Water Works Assoc.*, vol. 88, n°9, 95-106.
- ROSE J.B., LANDEEN L.K., RILEY K.R. & GERBA C.P. (1989) - Evaluation of immunofluorescence techniques for detection of *Cryptosporidium* oocysts and *Giardia* cysts from environmental samples. *Appl. Environ. Microbiol.*, vol. 55, n°12, 3189-3196.
- ROSE J.B. (1997) - Environmental ecology of *Cryptosporidium* and public health implications. *Annu. Rev. Public Health*, vol. 18, 135-161.
- ROT - DE HEAULME P. (1988) - Détection de *Giardia intestinalis* et de *Cryptosporidium* sp. dans les eaux en région parisienne. Thèse, *Faculté de Pharmacie, Université René Descartes - Paris V*, 97 p.
- ROUQUET V., HOMER F., BRIGNON J.M., BONNE P. & CAVARD J. (2000) - Source and occurrence of *Giardia* and *Cryptosporidium* in Paris rivers. *Water Sci. Technol.*, vol. 41, n°7, 79-86.
- ROUSSEL F., LEMETEIL D., FAVENNEC L., TAYOT J., BALLEST J.J. & BRASSEUR P. (1995) - Respiratory tract cryptosporidiosis in immunosuppressed rat is associated with an epithelial metaplasia. *Parasite*, vol. 1, n°1, 85-87.
- RUSH B.A., CHAPMAN P.A. & INESON R.W. (1987) - *Cryptosporidium* and drinking water. *Lancet*, vol. 2, n°8559, 632-633.
- SHYPHERD K.M. & WYN-JONES A.P. (1995) - Evaluation of different filtration techniques for the concentration of *Cryptosporidium* oocysts from water. *Water Sci. Technol.*, vol. 31, n°5-6, 425-429.
- SKERRETT H.E. & HOLLAND C.V. (2000) - The occurrence of *Cryptosporidium* in environmental waters in the greater Dublin area. *Water Res.*, vol. 34, n°15, 3755-3760.
- SLAVIN D. (1955) - *Cryptosporidium meleagridis* (sp nov). *J. Comp. Pathol.*, vol. 65, 262-266.
- SMITH H.V., PATTERSON W.J., HARDIE R., GREENE L.A., BENTON C., TULLOCH W., GILMOUR R.A., GIRWOOD R.W., SHARP J.C. & FORBES G.I. (1989) - An outbreak of water-borne cryptosporidiosis caused by post-treatment contamination. *Epidemiol. Infect.*, vol. 103, n°3, 703-715.
- TOMS B.A. (1948) - Some observations on the flow of linear polymer solutions through straight tubes at large Reynolds numbers. *Proceedings of International Congress on Rheology*, vol. 2, 135.
- TYZZER E.E. (1907) - A sporozoan found in the peptic glands of the common mouse. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*, vol. 5, 2-13.
- TYZZER E.E. (1910) - An extracellular coccidium, *Cryptosporidium muris* (gen et sp nov) of the gastric glands of the common mouse. *J. Med. Res.*, vol. 23, 487-516.
- TYZZER E.E. (1912) - *Cryptosporidium parvum* (sp nov) a coccidium found in the small intestine of the common mouse. *Arch. Protistenkd.*, vol. 26, 394-412.
- VENTER A. (2001) - *Cryptosporidium* outbreak. *News & Comment in Trends Microbiol.*, vol. 9, n°6, 257.
- VESEY G., SLADE J.S. & FRICKER C.R. (1991) - Taking the eye strain out of environmental *Cryptosporidium* analysis. *Lett. Appl. Microbiol.*, vol. 13, n°2, 62-65.
- VESEY G., SLADE J.S., BYRNE M., SHEPHERD K. & FRICKER C.R. (1993) - A new method for the concentration of *Cryptosporidium* oocyst from water. *J. Appl. Bacteriol.*, vol. 75, n°1, 82-86.

- VESEY G., NARAI J., ASHBOLT N., WILLIAMS K. & VEAL D. (1994) - Detection of specific micro-organisms in environmental samples using flow cytometry. In: *Methods in Cell Biology, Flow Cytometry, Part B Second Edition*, vol. 42, chapter 29, 489-521.
- VILLARD O., HIMY R. & KREMER M. (1992) - Bilan d'une enquête prospective sur la cryptosporidiose dans une population d'enfants hospitalisés à Strasbourg. *Pédiatrie (Lyon)*, vol. 47, n°10, 695-697.
- WALKER F.R. Jr & STEDINGER J.R. (1999) - Fate and transport model of *Cryptosporidium*. *J. Environ. Eng.*, vol. 125, n°4, 325-333.
- WALKER M.J. & MONTEMAGNO C.D. (1999) - Sorption of *Cryptosporidium parvum* oocysts in aqueous solution to metal oxide and hydrophobic substrates. *Environ. Sci. Technol.*, vol. 33, n°18, 3134-3139.
- WEBER R., BRYAN R.T. & JURANEK D.J. (1992) - Improved stool concentration procedure for detection of *Cryptosporidium* oocysts in faecal specimens. *J. Clin. Microbiol.*, vol. 30, n°11, 2869-2873.
- WIDMER G., TZIPORI S., FICHTENBAUM C.J. & GRIFFITHS J.K. (1998) - Genotypic and phenotypic characterization of *Cryptosporidium parvum* isolates from peoples with AIDS. *J. Infect. Dis.*, vol. 178, n°3, 834-840.
- YAO K.M., HABIBIAN M.T. & O'MELIA C. (1971) - Water and waste water filtration: concepts and applications. *Environ. Sci. Technol.*, vol. 5, n°11, 1105-1112.

PRODUCTION SCIENTIFIQUE

Revues internationales (ISSN)

MARLY X., CHEVALIER S., BUÈS M., SCHWARTZBROD J. & ESTÉVENON O. - Experimental investigations and numerical modelling of *Cryptosporidium parvum* transport behaviour in aquifers. *Water Sci. Technol.*, vol. 43, n°12, 109-116.

CHESNOT T., MARLY X., ESTÉVENON O., CHEVALIER S., BUÈS M. & SCHWARTZBROD J. - Optimised immunofluorescence procedure for enumeration of *Cryptosporidium parvum* oocyst suspensions. *Water Res.* **Accepté le 16 janvier 2002.**

Proceedings (ISBN) - Colloques internationaux

MARLY X., CHEVALIER S., BUÈS M. & SCHWARTZBROD J. (2000) - Laboratory investigations of *Cryptosporidium parvum* oocysts adsorption properties. *Groundwater 2000*, Ed. Rosbjerg et al., A. A. Balkema, Rotterdam, ISBN 90 5809 133 3, 43-44.

International Conference on Groundwater Research, « Groundwater 2000 », 6-8 Juin 2000, Copenhagen, Danemark.

Proceedings (ISBN) - Colloques nationaux

MARLY X., CHEVALIER S., CHOPIN S., BUÈS M. & SCHWARTZBROD J. (2000) - Validation d'un protocole expérimental : Application au transport en milieu poreux de *Cryptosporidium parvum*. *Récents Progrès en Génie des Procédés*, ISBN 2 9102 39-47-0, vol. 14, n°73, 35-40.

Colloques Internationaux - Avec actes à diffusion restreinte

MARLY X., CHEVALIER S., BUÈS M., SCHWARTZBROD J. & ESTÉVENON O. (2000) - Experimental investigations and numerical modelling of *Cryptosporidium parvum* transport behaviour in aquifers. *Conference Preprint, Book 7*, 47.

1st World Congress of International Water Association, 10th Health Related Water Microbiology Symposium, 5-7 Juillet 2000, Paris, France.

Colloques Nationaux - Sans actes

CHEVALIER S., MARLY X. & BUÈS M. (1999) - Simulation du transport de micro-organismes pathogènes en milieux poreux : application à la définition des périmètres de protection d'ouvrages de captage face aux risques de contaminations microbiologiques.

Compte-rendu des 4^{èmes} Journées d'Étude sur les Milieux Poreux, 1-2 Juin 1999, Nancy, France.

MARLY X., CHEVALIER S., BUÈS M. & SCHWARTZBROD J. (2000) – Mécanismes d'adsorption des oocystes de *Cryptosporidium parvum*.

Compte-rendu de la Journée Scientifique du Programme « Environnement et Santé », 27 Janvier 2000, Paris, France.

Conférence - Invité

MARLY X. (2001) - Inventaire des plans d'eau de la Moselle et suivi physico-chimique d'un échantillon de plans d'eau.

Conférencier invité au colloque « Une nouvelle idée des carrières » de L'UNICEM Lorraine et du Comité Lorraine de la Charte Professionnelle de l'Industrie des Granulats, 22 juin 2001, Pont-à-Mousson, France.

Posters

MARLY X., CHEVALIER S., BUÈS M. & SCHWARTZBROD J. (2000) - Étude expérimentale des paramètres de transport de *Cryptosporidium parvum* dans les aquifères.

Séminaire de l'École Doctorale PROMEMA « Les défis de l'expérimentation au XXI^{ème} siècle », 15 mai 2000, Nancy, France.

**AUTORISATION DE SOUTENANCE DE THESE
DU DOCTORAT DE L'INSTITUT NATIONAL
POLYTECHNIQUE DE LORRAINE**

000

VU LES RAPPORTS ETABLIS PAR :

Madame HARE-MONTEIL Colette, Maître de Conférences, Institut de Bactériologie, Strasbourg
Monsieur MUDRY Jacques, Professeur, UFR Sciences et Techniques, Besançon
Monsieur ZILLIOX Lothaire, Directeur de Recherche, IFARE, Strasbourg

Le Président de l'Institut National Polytechnique de Lorraine, autorise :

Monsieur MARLY Xavier

à soutenir devant un jury de l'INSTITUT NATIONAL POLYTECHNIQUE DE LORRAINE,
une thèse intitulée :

**"Transport d'un micro-organisme en milieu poreux saturé. Cas d'un colloïde
biologique : *Cryptosporidium Parvum*."**

en vue de l'obtention du titre de :

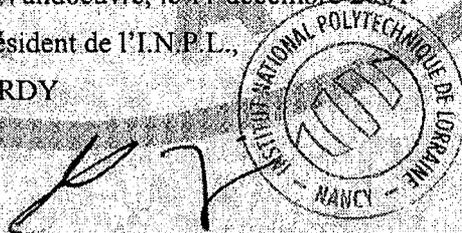
DOCTEUR DE L'INSTITUT NATIONAL POLYTECHNIQUE DE LORRAINE

Spécialité : « **Génie Civil-Hydrosystèmes-Géotechnique** »

Fait à Vandœuvre, le 11 décembre 2001

Le Président de l'I.N.P.L.,

J. HARDY



NANCY BRABOIS
2, AVENUE DE LA
FORET-DE-HAYE
BOITE POSTALE 3
F : 5 4 5 0 1
VANDŒUVRE CEDEX

RÉSUMÉ

TRANSPORT D'UN MICRO-ORGANISME EN MILIEU POREUX SATURÉ – CAS D'UN COLLOÏDE BIOLOGIQUE : *CRYPTOSPORIDIUM PARVUM*

L'objectif de notre travail est d'étudier le transport d'un micro-organisme pathogène, *Cryptosporidium parvum*, en milieu poreux saturé à l'aide d'essais en laboratoire. Ce travail se positionne dans une thématique de protection efficace des ressources en eau vis-à-vis de la contamination par des oocystes de *C. parvum*. En effet, ce parasite, qui infecte les mammifères, présente une résistance élevée à la plupart des désinfectants classiquement utilisés dans le traitement de l'eau. Il est rencontré dans les eaux souterraines et responsable de plusieurs épidémies d'origine hydrique. Tout d'abord, nous avons dû développer une technique de titrage adaptée à nos besoins, notamment en terme de précision. Ensuite, nous avons réalisé un premier type d'expérimentations en milieu saturé et sans écoulement, des essais batch, qui ne nous ont pas permis de mettre en évidence de phénomène d'adsorption sur tous les substrats testés (silice, calcaire, feldspaths, argiles ou alumine). Puis, nous avons mené un second type d'expérimentations, en milieu saturé et avec écoulement, des essais en colonne. Afin de travailler avec de faibles volumes de solution dopée en micro-organismes et, donc, de limiter les risques de contaminations, nous avons développé un essai en colonne à circulation fermée : le flux massique sortant de la colonne est injecté en entrée de colonne. Pour interpréter les résultats de cet essai, nous avons créé un modèle numérique en considérant *C. parvum* comme un colloïde biologique. Les résultats ont montré que le débit volumique et la granulométrie modifient la rétention, mais d'autres paramètres, probablement d'origines biologiques, semblent également avoir une influence.

Mots clés : *Cryptosporidium parvum* ; Colloïde biologique ; Immunofluorescence ; Essai en colonne à circulation fermée ; Filtration ; Adsorption ; Marche au hasard ; Simulation numérique.

ABSTRACT

TRANSPORT OF A MICROORGANISM THROUGH A POROUS MEDIUM – CASE OF A BIOLOGICAL COLLOID: *CRYPTOSPORIDIUM PARVUM*

The objective of our work is to study the transport of a pathogenic microorganism, *Cryptosporidium parvum*, in saturated porous medium with laboratory experiments. This work is situated in a thematic of effective protection of water resources for the contamination by *C. parvum* oocysts. Indeed, an important resistance to the majority of disinfectants classically used in water treatments characterized this parasite, which infects the mammals. It is present in the groundwater and responsible of many waterborne outbreaks. First of all, we had to develop a technique of titration adapted to our needs, in particular in term of precision. Next, we carried out a first type of experiments in saturated medium and without flow, batch assays, which did not enable us to highlight a phenomenon of adsorption with all the substrates tested (silica, calcite, feldspar, clay, or alumina). Then, we performed a second type of experiments, in saturated medium and with flow, column assays. In order to use low volumes of solution and, therefore to allow small amounts of *C. parvum* oocysts to be manipulated, providing as much protection as possible from the risks of contamination, we developed a continuously recirculating column assay: the mass outflow of the column is injected in input of column. To interpret the results of these assays, we created a numerical model considering the *C. parvum* oocysts as biological colloids. The results showed that the flow rate and granulometry modify the retention, but other parameters, probably biological, also seem to have an influence.

Keywords: *Cryptosporidium parvum*; biological colloid; Immunofluorescence assay; Continuously recirculating column; Filtration; Adsorption; Random walk; Numerical simulation.