



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>

UNIVERSITE HENRI POINCARÉ - NANCY I

2003

ECOLE DOCTORALE "BIOLOGIE SANTE ENVIRONNEMENT"

THESE

Présentée et soutenue publiquement

le 28 janvier 2003

pour obtenir le titre de

**DOCTEUR DE L'UNIVERSITE
HENRI POINCARÉ - NANCY I**

Mention Chimie et Microbiologie de l'Eau

par

Sylvain SKRABER

Db 18303

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

Sujet :

**Intérêt des bactériophages
en tant que témoin de contamination fécale
et de présence de virus entériques pathogènes
dans les eaux de la rivière Moselle**

MEMBRES DU JURY (proposition)

Juges : Dr Sylviane BILLAUDEL (Pr., Université de Nantes)
Dr Claudine BOSGIRAUD (Pr., Université de Limoges)

Rapporteurs : Dr Francisco LUCENA (Pr., Faculté de Biologie, Barcelone)
Dr Annalaura CARDUCCI (Pr., Université de Pise, Italie)

Co-directeurs : Dr Louis SCHWARTZBROD (Pr., UHP/LCPME, Nancy)
Dr Christophe GANTZER (MCU, UHP/LCPME, Nancy)

Remerciements

Aux membres du jury

À mes co-directeurs de thèse avec qui j'ai eu beaucoup de plaisir à travailler

À Monsieur le Professeur Louis Schwartzbrod, pour m'avoir accueilli au sein de son laboratoire et encadré tout au long de ces trois années de recherche. Sa rigueur scientifique, son enthousiasme et sa pédagogie m'ont permis de progresser dans mon travail. Qu'il trouve dans ces quelques lignes l'expression de ma profonde reconnaissance pour la confiance et l'aide précieuse qu'il a su m'apporter.

À Monsieur Christophe Gantzer, Maître de conférences qui a guidé mes choix concernant les expérimentations scientifiques ainsi que leurs interprétations. La rigueur de ses raisonnements constitue à mes yeux un modèle que je m'efforcerai de reproduire. Pour le temps qu'il m'a consacré, parfois largement au-delà des heures syndicales... qu'il trouve ici l'expression de mes très sincères et respectueux remerciements.

À mes rapporteurs

À Madame le Professeur Annalaura Carducci ; vous avez accepté non seulement de juger cette thèse, mais également d'en assumer la lourde tâche de rapporter. Je vous en suis extrêmement reconnaissant et suis très honoré de votre présence dans mon jury. Veuillez trouver ici, le témoignage de mes plus sincères remerciements.

À Monsieur le Professeur Francisco Lucena, ; vous m'avez accueilli dans votre laboratoire où j'ai pu apprécier l'accueil, l'enthousiasme et la qualité du travail catalan. Vous me faites aujourd'hui profiter en tant que rapporteur de votre exceptionnelle connaissance du sujet. Soyez assuré de ma profonde reconnaissance.

À mes juges

À Madame le Professeur Sylviane Billaudel, pour avoir accepté de juger ce travail et de me faire ainsi profiter de votre très grande expérience dans le domaine. Veuillez trouver ici le témoignage de ma sincère reconnaissance.

À Madame le Professeur Claudine Bosgiraud, pour avoir accepté d'apporter votre jugement sur ce travail et de me faire ainsi profiter de votre très grande culture scientifique. Veuillez trouver ici l'expression de mes plus vifs remerciements.

À tous ceux et celles qui m'ont aidé

Au Conseil régional de Lorraine qui a assuré le financement de ma troisième année de recherche, me permettant ainsi de finir ce travail dans des conditions matérielles très satisfaisantes.

À Monsieur Jean-Jacques Ehrhardt, directeur du LCPME, ainsi que Jean-Claude Block qui ont soutenu ma candidature pour l'attribution de la bourse régionale, ainsi qu'à Madame Marchal qui a formidablement géré le côté administratif de cette bourse.

À Fabian Marin, pour avoir réalisé les nombreux prélèvements qui ont constitué la base de ce travail. Pour sa conscience professionnelle, son aide physique et son soutien tout au long de ces trois années, et surtout pour son amitié, je le remercie vivement.

À Benoît Gassilloud, pour m'avoir initié aux joies de la culture cellulaire et de la biologie moléculaire. Qu'il trouve ici mes plus sincères remerciements.

À Messieurs Frédéric Arnold et Philippe Gastaud du « service hydrologique et annonce des crues » de la DIREN, qui m'ont communiqué les valeurs de débit de la Moselle aux différentes dates de prélèvement. Qu'ils soient ici remerciés de leur contribution à ces travaux.

À Monsieur Jean-Marie BUTIN maire de Maron qui nous a aimablement renseigné sur les possibilités de prélèvement d'eau de rivière le long de la Moselle.

Aux responsables des sites de captage d'eaux souterraines de Méréville, Neuves-Maisons, Dommartin-les-Toul, Champigneulles et Bouxière-aux-dames qui nous ont rendu possible les prélèvements.

À la Communauté Urbaine du Grand Nancy pour toutes les informations qu'elle nous a fournies et pour leur accueil à la station de potabilisation de Vandoeuvre.

Aux responsables des stations d'épuration de Nancy et d'Épinal pour leur accueil, l'autorisation de prélèvement ainsi que toutes les informations qu'ils nous ont communiqués au sujet des différentes filières de traitement.

Au Professeur Jean-Claude Block et à toute son équipe qui m'ont permis d'utiliser leur appareillage (conductimètre et turbidimètre) pour compléter les analyses des différents échantillons d'eaux.

À Yannick Letet, du Service de Navigation du Nord-Est, qui m'a communiqué toutes les informations relatives à l'apport de contamination fécale le long de la rivière Moselle. Qu'il en soit remercié.

Aux stagiaires Émilie Thomas, Isabelle Tisserand, Aurore Bouthier, Céline Serrurier et Barbara Moreau que j'ai eu le plaisir d'encadrer et qui m'ont beaucoup aidé. Quelles en soient remerciées.

À Monsieur Damien Banas, qui a passé une soirée (une nuit ?) avec moi pour la repagination et la renumérotation des différents tableaux et figures (merci Microsoft !!). Qu'il trouve ici le témoignage de mon amitié et de mes sincères remerciements.

À Mademoiselle Méline Banas, qui m'a soufflé les mots justes lorsque je cherchais l'inspiration...

À Madame Laurence Gantzer pour m'avoir offert une place de concert de Jean Louis Aubert (super concert !) comme cadeau de fin de thèse, témoignant ainsi de son indulgence à mon égard pour avoir (parfois...) retenu son mari au laboratoire plus tardivement que prévu.

À Bill Gates... ???

...non.

Pour les personnes de mon laboratoire d'accueil

À Madame le Professeur Janine Schwartzbrod, pour son accueil et son enthousiasme.

À Madame Sandrine Banas, qui m'a introduit dans ce laboratoire et sans qui je n'aurais sans doute jamais fait de thèse. Qu'elle trouve ici l'expression de mon amitié et de mes sincères remerciements.

À Madame Monique Albert, pour sa gentillesse et ses conseils en bactériologie.

À Madame Sandrine Lemoine, pour ses compétences et sa sympathie.

À Monsieur David Santilli, pour sa gentillesse et sa disponibilité. Merci pour les très nombreux services rendus.

À Monsieur Olivier Estevenon, pour son soutien moral.

Merci également à tous ceux qui ont partagé avec moi cette lourde condition de thésard et à qui je témoigne de mon affection : Mélinda Maux, Thierry Chesnot, Benoît Gassilloud et Isabelle Bertrand. Qu'ils reçoivent ici l'expression de ma plus profonde compassion pour la fin de leurs thèses respectives !

Aux « nouveaux » DEA, Julien et Josiane pour qui le calvaire ne fait que commencer...

...COURAGE ! ☺

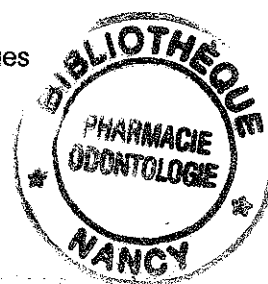
Pour ma famille

À mes parents qui m'ont soutenu durant toutes ces années. Que ce travail leur soit un témoignage de ma reconnaissance infinie et de ma profonde affection.

À mon grand frère ainsi qu'à Elena et Léonard. Que cette thèse soit le témoignage de ma très grande affection.

SOMMAIRE

OBJECTIF DU TRAVAIL.....	1
BIBLIOGRAPHIE.....	3
1 Les virus présents dans le milieu hydrique	3
1.1 <i>Les virus entériques pathogènes pour l'homme</i>	3
1.1.1 <i>Épidémiologie</i>	4
1.1.2 <i>Symptomatologie et incidence des principaux virus pathogènes</i>	7
1.1.2.1 <i>Les virus des gastro-entérites</i>	7
1.1.2.2 <i>Les virus des hépatites</i>	13
1.1.3 <i>Mise en évidence des virus entériques pathogènes</i>	17
1.1.3.1 <i>La culture cellulaire</i>	18
1.1.3.2 <i>Recherche directe du génome viral par RT-PCR</i>	21
1.1.3.3 <i>La recherche de virus infectieux suivie de la recherche du génome viral</i>	25
1.1.4 <i>Présence dans le milieu hydrique</i>	26
1.2 <i>Les bactériophages</i>	29
1.2.1 <i>Présentation</i>	33
1.2.2 <i>Mise en évidence des bactériophages entériques</i>	33
1.2.3 <i>Densité dans le milieu hydrique</i>	37
2 Évaluation du risque viral	39
2.1 <i>Les indicateurs bactériens</i>	39
2.2 <i>Les indicateurs phagiques</i>	42
2.3 <i>La détection d'un pathogène en tant qu'indicateur</i>	48
3 Influence des facteurs environnementaux sur le devenir des indicateurs bactériens et viraux dans les eaux de surface	51
3.1 <i>La prédation</i>	52
3.2 <i>La compétition</i>	55
3.3 <i>La matière organique (MO)</i>	55
3.4 <i>La lumière</i>	56
3.5 <i>La température de l'eau</i>	59
3.6 <i>La salinité de l'eau</i>	59
3.7 <i>La sédimentation et le rôle des matières en suspension (MES)</i>	63
4 Étude bibliographique sur les indicateurs bactériens et phagiques dans le milieu hydrique	66
4.1 <i>Choix des publications de références</i>	66
4.2 <i>Relation entre coliformes et streptocoques</i>	67
4.3 <i>Relation entre coliformes et coliphages</i>	68
4.4 <i>Analyse des résultats en fonction de la charge fécale</i>	69
4.5 <i>Relation entre indicateurs et pathogènes</i>	71



MATERIELS ET METHODES.....	74
1 Les eaux analysées	74
1.1 Échantillonnage en station d'épuration d'eaux usées urbaines	74
1.2 Échantillonnage au niveau de la rivière Moselle	75
1.3 Échantillonnage en eaux souterraines	77
1.4 Les dates de prélèvement	78
2 Méthodes de concentration des microorganismes à partir des échantillons d'eau	79
2.1 Concentration des échantillons pour la recherche des bactériophages	79
2.2 Concentration des échantillons pour la recherche de virus pathogènes	79
3 Méthodes de détection et de quantification des microorganismes étudiés	80
3.1 Les indicateurs de la contamination fécale	80
3.2 Les virus pathogènes	84
3.3 Mise en évidence des entérovirus infectieux sur culture cellulaire	89
4 Les analyses physico-chimiques	92
5 Détermination de la sensibilité aux ultra-violets des indicateurs présents dans les eaux usées	92
5.1 Réalisation du test	93
5.3 Les eaux analysées	93
5.4 Calcul de la dose UV	94
6 Études expérimentales de survie des microorganismes	95
6.1 Survie des coliphages somatiques, des coliformes thermotolérants et du Poliovirus de type 1 dans l'eau de rivière en fonction de la température	95
6.2 Survie des coliphages somatiques et des coliformes thermotolérants en fonction de la composition de l'eau (eau de rivière – PBS)	96
7 Observation microscopique des coliformes thermotolérants au DAPI	97
8 Calcul des abattements et analyses statistiques des résultats	98

RÉSULTATS.....	99
CHAPITRE I : Détermination de l'impact des traitements d'épuration des eaux usées sur les indicateurs bactériens et phagiques de contamination fécale	99
1 Traitement primaire de décantation	100
2 Traitement secondaire par boues activées	100
3 Traitements tertiaires	102
3.1 <i>Le traitement tertiaire de déphosphatation</i>	102
3.2 <i>Le traitement tertiaire par rayonnement ultra-violet (UV)</i>	104
Discussion	108
 CHAPITRE II : Indicateurs de contamination fécale dans les ressources en eaux potables	 116
Partie 1 : Détermination de la charge fécale dans le milieu hydrique environnemental	117
1 Concentrations de référence dans les eaux usées brutes	118
2 Évaluation de l'Abattement de la Contamination Fécale Initiale (ACFI) dans les eaux de rivière	120
2.1 <i>Une eau de rivière à proximité d'un rejet d'eaux usées</i>	120
2.2 <i>Une eau de rivière éloignée d'une source de contamination fécale</i>	121
3 Évaluation de l'Abattement de la Contamination Fécale Initiale (ACFI) dans les eaux souterraines	122
Discussion	124
 Partie 2 : Étude du comportement des indicateurs dans l'eau de la rivière Moselle	 130
4 Influence des paramètres physico-chimiques	131
5 Détermination des capacités d'auto-épuration de l'eau de rivière	132
6 Évaluation de la relation « coliformes thermotolérants – coliphages somatiques » dans l'eau de rivière	135
Discussion	139

Partie 3 : Étude in vitro des coliformes thermotolérants et des coliphages somatiques dans l'eau de rivière	141
7 Influence de la composition de l'eau de rivière sur le devenir des coliformes thermotolérants et des coliphages somatiques	142
7.1 Impact global de la composition de l'eau de rivière sur les indicateurs	142
7.1.1 Étude préliminaire	142
7.1.2 Évaluation de la présence d'un facteur inactivant dans l'eau de rivière	143
7.2 Influence de la composition de l'eau de rivière entre hiver et été sur les indicateurs	146
8 Influence de la température de l'eau de rivière sur la survie des indicateurs	149
Discussion	151
 CHAPITRE III : Indicateurs de contamination fécale et pollution virale d'une eau de rivière	 153
Partie 1 : Indicateurs de contamination fécale et pollution virale d'une eau de rivière ; Étude in vitro	154
1 Influence de la température (4, 18 et 25°C) sur le <i>poliovirus</i> dans l'eau de rivière prélevée en hiver	155
2 Influence de la composition de l'eau (hiver-été) sur le <i>poliovirus</i> dans l'eau de rivière	156
3 Comparaison des cinétiques de survies du <i>poliovirus</i> infectieux et du génome de <i>poliovirus</i>	159
4 Comparaison de l'évolution des indicateurs par rapport au <i>poliovirus</i>	160
4.1 Comparaison entre coliformes thermotolérants et <i>poliovirus</i> infectieux	161
4.2 Comparaison entre coliphages somatiques et <i>poliovirus</i> infectieux	161
4.3 Comparaison entre génome viral et <i>poliovirus</i> infectieux	162
4.4 Comparaison entre coliformes thermotolérants et génome viral	163
4.5 Comparaison entre coliphages somatiques et génome viral	163
Discussion	165

OBJECTIFS DU TRAVAIL

OBJECTIFS DU TRAVAIL



Actuellement le contrôle microbiologique du milieu hydrique repose uniquement sur la recherche d'indicateurs bactériens de contamination fécale tels que les coliformes thermotolérants, *E. coli*, les entérocoques et les spores de bactéries anaérobies sulfito-réductrices. Ce contrôle par les indicateurs bactériens a permis de réduire de manière drastique la prévalence des maladies infectieuses d'origine hydrique en France. Cependant, si ces indicateurs témoignent bien de la présence de bactéries pathogènes, il n'en est pas de même en ce qui concerne les virus et la communauté scientifique s'accorde pour estimer que ces indicateurs bactériens sont notamment, de mauvais indicateurs de la contamination virale. Or de nombreux virus pathogènes circulent dans le milieu hydrique à l'origine notamment d'épidémies de gastro-entérites (*rotavirus*, *Norwalk-like virus*,...), voire d'hépatite A. Il est donc nécessaire de définir un ou plusieurs indicateurs qui prennent en compte non seulement la contamination bactérienne, mais également la contamination virale, voire parasitaire d'une eau. Ces nouveaux indicateurs doivent évidemment apporter des informations différentes de celles apportées par les indicateurs bactériens classiques.

Dans ce contexte, certains bactériophages, hôtes habituels ou occasionnels du tube digestif humain ont été proposés pour jouer ce rôle. Il s'agit des coliphages somatiques, des bactériophages F-spécifiques et des phages de *Bacteroides fragilis*.

L'objectif de notre travail est de comparer les informations apportées d'une part par les indicateurs bactériens classiques et d'autre part par les indicateurs phagiques et de déterminer si ces derniers apportent des éléments d'appréciation nouveaux au niveau de l'efficacité de traitement, de l'estimation de la charge fécale et de l'évaluation de la pollution virale.

Après avoir réalisé une étude bibliographique sur le sujet, nous avons mené une étude analytique en partant de l'origine de la pollution fécale du milieu hydrique, c'est-à-dire les eaux usées, et nous l'avons poursuivie jusqu'à la ressource utilisée pour la production d'eau potable représentée par l'eau de rivière d'une part et l'eau souterraine d'autre part.

Dans un premier temps, la valeur de chacun de six indicateurs (coliformes thermotolérants, entérocoques, spores de bactéries anaérobies sulfito-réductrices, coliphages somatiques, bactériophages F-spécifiques et phages de *Bacteroides fragilis*) a été testée en tant qu'indicateur de l'efficacité des traitements d'épuration des eaux usées.

Dans un deuxième temps, nous avons étudié les informations que donnent les différents indicateurs pour évaluer la charge fécale d'une eau superficielle et d'une eau souterraine.

En fonction de ces résultats, et dans un troisième temps, les indicateurs les plus représentatifs de la charge fécale ont été évalués en tant qu'indicateur de pollution virale. Pour ce faire, le comportement et la survie des indicateurs ont été comparés *in vitro* et *in situ* (rivière Moselle) à ceux des virus pathogènes pour l'homme représentés par les *entérovirus* et les *Norwalk-like virus*. La recherche des pathogènes a été réalisée d'une part par culture cellulaire pour la mise en évidence des virus infectieux et d'autre part par biologie moléculaire (RT-PCR qualitative et quantitative) pour la détection du génome viral. Les résultats de cette dernière partie devraient permettre non seulement de dégager l'indicateur le plus représentatif de la contamination virale de l'eau, mais aussi de préciser la signification de la présence de génome viral dans l'eau de la rivière.

BIBLIOGRAPHIE

1	Les virus présents dans le milieu hydrique	3
1.1	<i>Les virus entériques pathogènes pour l'homme</i>	3
1.2	<i>Les bactériophages</i>	29
2	Évaluation du risque viral	39
2.1	<i>Les indicateurs bactériens</i>	39
2.2	<i>Les indicateurs phagiques</i>	42
2.3	<i>La détection d'un pathogène en tant qu'indicateur</i>	48
3	Influence des facteurs environnementaux sur le devenir des indicateurs bactériens et viraux dans les eaux de surface	51
3.1	<i>La prédation</i>	52
3.2	<i>La compétition</i>	55
3.3	<i>La matière organique (MO)</i>	55
3.4	<i>La lumière</i>	56
3.5	<i>La température de l'eau</i>	59
3.6	<i>La salinité de l'eau</i>	59
3.7	<i>La sédimentation et le rôle des matières en suspension (MES)</i>	63
4	Étude bibliographique sur les indicateurs bactériens et phagiques dans le milieu hydrique	66
4.1	<i>Choix des publications de références</i>	66
4.2	<i>Relation entre coliformes et streptocoques</i>	67
4.3	<i>Relation entre coliformes et coliphages</i>	68
4.4	<i>Analyses des résultats en fonction de la charge fécale</i>	69
4.5	<i>Relation entre indicateurs et pathogènes</i>	71

Bibliographie

1 Les virus présents dans le milieu hydrique

De nombreux virus sont susceptibles d'être véhiculés par le milieu hydrique. Parmi ceux-ci, nous nous sommes plus particulièrement intéressés aux virus pathogènes pour l'homme ainsi qu'aux bactériophages.

1.1 Les virus entériques pathogènes pour l'homme

L'expression « virus entériques pathogènes pour l'homme » regroupe l'ensemble des virus capables de se multiplier au niveau de cellules cibles du tractus gastro-intestinal humain. Cette multiplication peut soit engendrer des troubles plus ou moins importants chez l'hôte, soit rester asymptomatique. Éliminés avec les selles des personnes infectées, les virus entériques sont retrouvés dans les eaux usées avant de contaminer le milieu naturel. C'est ainsi que plus de 140 serotypes de virus entériques différents sont susceptibles d'être retrouvés dans le milieu hydrique (Gantzer *et al.*, 1998a). Le Tableau 1 présente les principaux virus pathogènes entériques et leur classification. Il faut noter que la classification des *calicivirus* humains a été récemment revue sur la base de critères génétiques (Green *et al.*, 2000c). Ils appartiennent à la famille des *Caliciviridae*, laquelle comprend quatre genres : les genres *Norwalk-like virus* (NLV) et *Sapporo-like virus* (SLV) responsables de gastro-entérites chez l'homme et les genres *Vesivirus* et *Lagovirus* infectant les animaux. Dans le même temps, le *virus de l'hépatite E* a été retiré de la famille des *Caliciviridae* et se retrouve provisoirement sans statut (Green *et al.*, 2000c). Du fait de leur parasitisme intracellulaire obligatoire, les virus sont incapables de se multiplier à l'extérieur de leur hôte.

Tableau 1: Principaux virus entériques retrouvés dans le milieu hydrique (d'après Nicand *et al.*, 1998 et Kohli *et al.*, 2001)

Famille	Génome (taille)	Enveloppe	Genre	Espèces
<i>Picornaviridae</i>	ARN sb (7-8kb)	Non	<i>Entérovirus</i>	<i>Poliovirus</i>
				<i>Coxsackie A</i>
				<i>Coxsackie B</i>
				<i>Echovirus</i>
				<i>Entérovirus 68 à 71</i>
			<i>Hépatovirus</i>	<i>Virus de l'hépatite A</i>
<i>Reoviridae</i>	ARN db (19-32kpb)	Non	<i>Reovirus</i>	<i>Reovirus humains</i>
			<i>Rotavirus</i>	<i>Rotavirus humains</i>
<i>Caliciviridae</i>	ARN sb (7-8kb)	Non	<i>Norwalk like virus</i>	<i>Virus de Norwalk</i>
			<i>Sapporo like virus</i>	<i>Sapporo Virus</i>
?	ARN sb (7-8kb)	Non	<i>hepatitis E like virus</i>	<i>Virus de l'hépatite E</i>
<i>Coronaviridae</i>	ARN sb (27-31kb)	Oui	<i>Coronavirus</i>	<i>Coronavirus humains</i>
<i>Adenoviridae</i>	ADN db (28-45kpb)	Non	<i>Mastadénovirus</i>	<i>Adénovirus humains</i>
<i>Astroviridae</i>	ARN sb (7-8kb)	Non	<i>Astrovirus</i>	<i>Astrovirus humains</i>

sb: simple brin ; db : double brin.

1.1.1 Épidémiologie

La transmission

Excrétés dans les selles de personnes infectées, les virus entériques sont généralement transmis par voie digestive, soit directement de personne à personne, soit à partir d'éléments souillés par des matières fécales. La transmission par contact direct est le mode de transmission principal des virus entériques (Blacklow et Greenberg, 1991 ; Grohmann, *et al.*, 1991 ; Shapiro *et al.*, 1992). Elle est favorisée par le manque d'hygiène.

Concernant la transmission indirecte, celle-ci utilise essentiellement le milieu hydrique soit par consommation d'eau, soit par l'intermédiaire d'aliments ou d'objets souillés. Les risques d'infections transmises par l'eau varient en fonction de l'agent pathogène. Pour les *entérovirus*, le rôle de l'eau de boisson est rarement démontré du fait de nombreuses formes inapparentes. Les agents les plus fréquemment en cause sont les virus des hépatites A et E ainsi que les *calicivirus* et plus particulièrement les NLV. La transmission virale par ingestion d'aliments contaminés est responsable de nombreuses épidémies de gastro-entérites ou d'hépatite A (Desenclos, 1996). Ainsi, aux Etats-Unis, 3 % des cas d'hépatite A sont d'origine hydrique ou alimentaire (Shapiro *et al.*, 1992). Un nombre important d'épidémies virales est transmis par l'intermédiaire des coquillages ou des fruits de mers (Le Guyader *et al.*, 1996 ; Appleton, 2000 ; Miossec et Vaillant, 2001). Elles sont souvent observées dans le cadre de collectivités car la contamination directe et indirecte y sont favorisées. Ainsi, des épidémies de gastro-entérites, en particulier les rotaviroses ou des hépatites aiguës sont particulièrement redoutées et constituent un véritable fléau pour les crèches, les centres de pédiatrie, les écoles, les institutions pénitentiaires ou gériatriques (Rosenblum *et al.*, 1991 ; Gaggero *et al.*, 1992 ; Taylor *et al.*, 1997a ; Marx *et al.*, 1999 ; Melo *et al.*, 2002).

Enfin, la transmission de virus entériques de l'animal à l'homme, bien que difficile et rare a été démontrée pour les *rotavirus* et évoquée pour les HEV (Melnick, 1996 ; Worm *et al.*, 2002) et les NLV (Koopmans *et al.*, 2000).

Caractère saisonnier

Il existe une très nette incidence saisonnière pour certaines épidémies d'origine virale. Ainsi, dans les pays tempérés, il est observé une recrudescence des entéroviroses pendant la saison estivale (Melnick 1996). À l'inverse, les épidémies de gastro-entérites à *rotavirus*, *adénovirus*, *calicivirus* et *astrovirus* présentent un pic au cours des mois les plus froids (Durepaire *et al.*, 1995 ; Glass *et al.*, 1996a et b ; Palombo et Bishop, 1996 ; Thélot et Bourillon, 1996 ; Mounts *et al.*, 2000 ; Moulin *et al.*, 2001). Havelaar *et al.* (1993) rapportent également le caractère saisonnier des *reovirus* mis en évidence par culture cellulaire dans des échantillons de l'environnement très majoritairement en hiver (plus de 95 % en hiver contre 15 % en été). Une étude récente réalisée en Afrique du Sud met en évidence une augmentation de la concentration en *virus de l'hépatite A* dans les eaux de surface à la fin de l'hiver sans pour autant y associer de pic épidémique (Taylor *et al.*, 2001). Par ailleurs, dans les régions tempérées, des pics épidémiques de HAV ont été observés en automne-hiver (Feinstone et Gust, 1997).

Dans les pays chauds, le caractère saisonnier semble moins évident. En Afrique du sud, les *rotavirus* sont endémiques tout au long de l'année. Sous les tropiques, un léger pic de *rotavirus* est observé pendant la saison sèche (Pereira *et al.*, 1993 ; Kapikian et Chanock, 1996). En revanche, la période des pluies augmente d'un facteur 3 le risque de transmission des autres infections virales (Bile *et al.*, 1994).

Les principaux paramètres de l'infection

Les principaux paramètres qui déterminent le risque de contamination virale sont :

- Du point de vue de l'hôte :

- l'âge,
- le niveau d'hygiène qui est souvent lié au niveau socio-économique,
- l'immunodéficience des personnes exposées ou plus généralement leur état de santé.

- Du point de vue du virus :

- la concentration des virus dans les selles,
- la durée d'excrétion virale,
- la capacité du virus à conserver son pouvoir infectieux hors d'un organisme,
- la dose infectieuse nécessaire pour permettre sa multiplication au sein de son hôte.

Dans le Tableau 2 sont indiqués la durée moyenne de l'excrétion virale dans les fèces, la concentration virale moyenne par gramme de selles, la dose minimale infectante (DMI) ainsi que le réservoir des différents virus présents dans le milieu hydrique. À l'heure actuelle, un consensus semble s'être établi pour estimer que la DMI pour les virus entériques est faible et toujours inférieure à 50 particules infectieuses (Gerba et Hass, 1988). Pour les *entérovirus*, elle serait inférieure à 20 particules infectieuses (Schiff *et al.*, 1984) et pour les *rotavirus* une seule particule infectieuse en culture cellulaire serait suffisante pour déclencher une multiplication virale *in vivo* et/ou une séroconversion (Ward *et al.*, 1986 ; Graham *et al.*, 1987 ; Dubois, 1995).

Tableau 2: Excrétion virale dans les fèces (d'après Nicand *et al.*, 1998)

Virus	Durée moyenne d'excrétion fécale	Concentration virale par gramme de selles	Dose minimale infectante (DMI)	Durée moyenne d'incubation	Transmission	Réservoir
<i>Rotavirus</i>	10 jours	10^{10}	1	1-2 jours	Contact – Voie digestive	H, M, O
<i>Norwalk-like virus</i> <i>Sapporo-like virus</i>	3 jours (entre 12 h et >15 jours)*	$> 10^6$		12-48 heures	Contact – voie digestive	H
<i>Astrovirus</i>	12 jours	$> 10^6$		24-36 heures		H, M
<i>Entérovirus</i>	1 mois	$10^3 - 10^6$	10-15 (<20)			H
<i>Virus de l'hépatite A</i>	3 semaines	10^9	10	10-50 jours	Contact – voie digestive	H, P
<i>Virus de l'hépatite E</i>	2 semaines	10^9		10-60 jours	Voie digestive	H, Po, O, R
<i>Adénovirus</i>	10 jours	$> 10^6$		6-10 jours	Contact - Voie respiratoire	H

H : Homme ; M : Mammifère ; O : Oiseau ; P : Primates ; Po : Porc ; R : Rat ; * d'après Lopman *et al.* (2002)

Épidémies virales d'origine hydrique

L'implication des différents virus dans les épidémies d'origine hydrique est très variable. À titre indicatif, le Tableau 3 présente pour chaque virus entérique le nombre de publications scientifiques parues avec les termes : « épidémie » (outbreak) et « eau » (water) dans le titre, le résumé ou les mots-clés. Les résultats sont donnés en fonction des années. L'analyse de ces résultats permet de comparer la fréquence de citation de chaque virus. Ainsi il apparaît que le *virus de l'hépatite A*, les *adénovirus*, les *entérovirus* et plus particulièrement les *poliovirus* sont régulièrement cités et associés à l'eau depuis 1967. Cependant, le *virus de l'hépatite A* se démarque avec un nombre beaucoup plus important d'études. Des virus comme les *calicivirus* humains ou l'hépatite E montent en puissance depuis une dizaine d'années.

Tableau 3 : Nombre de publications disponibles sur PubMed® avec les mots clés : WATER (eau), OUTBREAK (épidémie) et les différents virus entériques données dans la première colonne du tableau

	1967 1972	1973 1977	1978 1982	1983 1987	1988 1992	1993 1997	1998 2002	Total	%
HAV	0	0	2	3	7	6	16	34	6,2
HAV ou « hepatitis A »	21	11	18	24	24	29	36	163	29,7
HEV	0	0	0	0	3	11	19	33	6,0
HEV ou « hepatitis E »	0	0	0	0	11	24	22	57	10,4
Entérovirus	3	3	3	4	7	4	10	34	6,2
Poliovirus	1	2	1	5	2	6	8	25	4,6
Echovirus	1	0	0	2	1	1	3	8	1,4
Coxsackievirus	0	1	0	1	2	1	0	5	0,1
Coronavirus	0	0	0	1	1	0	1	3	0,1
Astrovirus	0	0	0	3	2	0	9	14	2,6
Adénovirus	1	2	2	4	2	1	5	17	3,1
Reovirus	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Rotavirus	0	0	2	11	4	7	11	35	6,4
Calicivirus	0	0	0	0	2	2	6	10	1,8
NLV	0	0	0	0	0	0	20	20	3,6
Norwalk like virus	0	0	0	0	2	3	11	16	2,9
Norwalk virus	0	0	9	8	10	19	29	75	13,7
Sapporo like virus	0	0	0	0	0	0	0	0	0
								549	100

1.1.2 Symptomatologie et incidence des principaux virus pathogènes

1.1.2.1 Les virus des gastro-entérites

Les principaux virus responsables de gastro-entérites chez l'homme sont au nombre de quatre : les *rotavirus*, les *calicivirus* humains dont les *Norwalk-like virus*, les *astrovirus* et les *adénovirus* entériques (Glass *et al.*, 2001 ; Kohli *et al.*, 2001 ; Koopmans *et al.*, 2002).

Les gastro-entérites d'origine virale représentent un problème majeur de santé publique dans toutes les régions du monde. Les raisons sont principalement dues au caractère ubiquitaire des virus responsables et de leur forte capacité de transmission (Koopmans *et al.*, 2002). Dans les pays en voie de développement, elles sont responsables d'une morbidité et d'une mortalité élevées. Dans les pays développés, la prise en charge précoce a permis de réduire considérablement la mortalité. Cependant, la morbidité reste élevée et l'impact économique important. Pour Gerba *et al.* (1996) certains groupes à risque sont particulièrement sensibles lors des épidémies d'origine hydrique ou alimentaire. Il s'agit des enfants en bas âge, des personnes âgées, des femmes enceintes et des immunodéprimés. À titre indicatif, les auteurs précisent qu'un tel groupe représente 20 % de la population américaine. Aux Etats-Unis, Koopmans *et al.* (2002) rapportent que les virus des gastro-entérites seraient responsables chaque année de 79 millions de cas nécessitant 325 000 hospitalisations et causeraient la mort de 5 000 personnes.

D'un point de vue clinique, après une période d'incubation variant de quelques heures à plusieurs jours, les virus des gastro-entérites sont à l'origine d'une diarrhée associée ou non à des vomissements, de la fièvre et des douleurs abdominales. Dans certains cas, notamment lors des infections à NLV, les vomissements peuvent être au premier plan et la diarrhée absente (Kohli *et al.*,

2001). Dans les cas graves, une déshydratation sévère nécessitant une hospitalisation peut être observée. La durée des signes cliniques varie de quelques heures à plus d'une semaine. D'une façon générale, les manifestations cliniques les plus longues et les plus intenses sont observées avec les *rotavirus*. Différents virus peuvent co-exister lors d'une vague épidémique comme ce fut le cas dans une crèche en Afrique du sud où des *rotavirus*, *astrovirus* et *adénovirus* entériques ont pu être isolés au cours d'une même épidémie (Taylor *et al.*, 1997a).

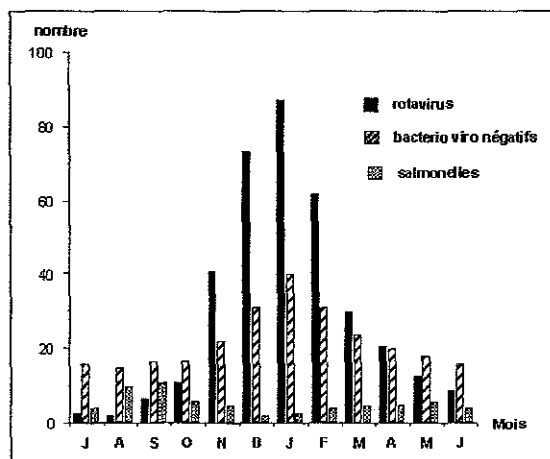
Les rotavirus

Découverts en 1973 (Bishop *et al.*, 1973), les *rotavirus* sont classés dans la famille des *Reoviridae*. Ils représentent l'agent majeur des gastro-entérites infantiles avec 80 % des étiologies virales reconnues et 140 millions de cas annuels de diarrhées (données de l'OMS de 1997 rapportées par Bajolet et Chippaux-Hyppolite, 2001). Dans les formes typiques de l'enfant, l'incubation est brève, de 24 à 48 heures en moyenne, exceptionnellement jusqu'à 6 jours. Surviennent ensuite les diarrhées souvent accompagnées de fièvre et de vomissements. La guérison est la règle en 4 à 7 jours dans les pays développés. Les particules virales sont excrétées dans les selles pendant 10 jours environ. Chez les immunodéprimés, l'excrétion peut être prolongée de 6 semaines à 2 ans, associée à des diarrhées intermittentes (Nicand *et al.*, 1998).

Des pics épidémiques surviennent en période hivernale dans les pays tempérés. Une enquête rétrospective effectuée à partir des résultats du laboratoire de virologie de l'hôpital Saint-Vincent-de-Paul à Paris confirme, sur la période allant de 1993 à 1998, l'existence d'épidémies de diarrhées aiguës chez les jeunes enfants de la région parisienne pendant les mois de novembre, décembre et janvier. Ainsi, 50 à 61 % des infections à *rotavirus*, selon les années, ont été observées durant ces trois mois. (Thélot et Bourrillon, 1996). Une étude plus récente réalisée dans le même hôpital confirme ces observations (Figure 1). De la même manière, Hejkal *et al.* (1984) constatent que les concentrations en *rotavirus* dans les eaux usées sont plus importantes en hiver que de mai à septembre.

Les rotaviroses touchent principalement les enfants entre 6 et 24 mois et plus de 90 % des enfants ont des anticorps anti-*rotavirus* à l'âge de 3 ans (Kohli *et al.*, 2001). Un tiers des enfants de moins de 5 ans hospitalisés pour diarrhées excrètent des *rotavirus*, quel que soit le pays (Pereira *et al.*, 1993 ; Tabassum *et al.* 1994). Dans les pays en voie de développement, les *rotavirus* causent 500 000 décès chaque année chez les enfants de moins de 5 ans (Miller et McCann, 2000). Dans les pays industrialisés, ils sont les agents majeurs des gastro-entérites sévères nécessitant une hospitalisation chez le jeune enfant (Kapikian, 1997). La réinfection est possible, mais généralement moins sévère avec principalement une excrétion virale et une augmentation du taux d'anticorps (Bajolet et Chippaux-Hyppolite, 2001). Chez les enfants plus âgés et les adultes, les infections sont classiquement reconnues comme asymptomatiques mais s'accompagnent néanmoins de l'excrétion de particules virales et d'une élévation des anticorps sériques. Des formes symptomatiques chez l'adulte ont été observées dans des foyers de personnes âgées ou dans des cas de diarrhées du voyageur au Mexique (Hung *et al.*, 1984 ; Sen *et al.*, 2000).

Figure 1 : Etiologie des gastroentérites aiguës communautaires hospitalisées en fonction du mois d'admission, Hôpital Saint-Vincent de Paul, Paris, 1997-2000 (Moulin *et al.*, 2001)



Parmi les 7 groupes de *rotavirus*, trois (A, B et C) sont actuellement reconnus comme pathogènes pour l'homme. Les *rotavirus* du groupe A sont les plus fréquemment rencontrés lors d'épidémies. En tout, 14 sérotypes (1G à 14G) ont été isolés dont 10 sont rencontrés en pathologie humaine. Les souches les plus communes dans les pays industrialisés sont les sérotypes G1, G2, G3 et G4. Ils représentent à eux seuls 95 % des souches isolées chez l'homme. Le sérotype G1 est le plus fréquent et représente 54 % des souches, alors que les sérotypes G2 à G4 représentent de 10 à 20 % des souches (Beards *et al.*, 1989 ; Gentsch *et al.*, 1996). Néanmoins, des souches différentes, notamment G9, ont été retrouvées ces dernières années dans différents pays dont la France (Bon *et al.*, 2000 ; Griffin *et al.*, 2000). Dans les pays en voie de développement, la situation peut être différente. Ainsi, les souches G5 et G10 ont été trouvées prédominantes au Brésil (Santos *et al.*, 1998), et les souches G9 en Inde (Ramachandran *et al.*, 1996). Certaines de ces souches pourraient être issues d'un réassortiment entre *rotavirus* d'origine humaine et animale (Santos *et al.*, 1999). L'épidémiologie des infections à *rotavirus* des groupes B et C est différente. À ce jour, les *rotavirus* du groupe B n'ont été retrouvés qu'en Chine (Hung *et al.*, 1984) et en Inde (Sen *et al.*, 2000). Quant aux *rotavirus* du groupe C, leur diffusion est plus large. Ils ont été détectés chez des enfants et des adultes dans différentes régions du monde. Toutefois leur fréquence de détection reste faible (Jiang *et al.*, 1995 ; Nilsson *et al.*, 2000a).

Enfin, des études de séroprévalence du groupe C réalisées en Suède et au Royaume-Uni montrent des taux de 30 à 66 % selon l'âge (James *et al.*, 1997 ; Nilsson *et al.*, 2000b) laissant supposer une sous-estimation de l'importance de ces virus.

Les *calicivirus* humains

Les *Norwalk-like virus* (NLV)

Ces virus de la famille des *Caliciviridae* ont été découverts par microscopie électronique en 1968 suite à une épidémie qu'ils occasionnèrent dans une école primaire de la ville de Norwalk aux Etats-Unis (Kapikian *et al.*, 1972). Les premières données sur l'épidémiologie des *calicivirus* basées sur l'utilisation de la microscopie électronique suggéraient que les NLV jouaient un rôle mineur comme

agent de gastro-entérite épidémique. Depuis, un grand nombre de virus morphologiquement identiques ont été observés. Regroupés sous le terme NLV, ils ont d'abord été baptisés en fonction de l'endroit géographique où ils ont été responsables d'épidémies comme par exemple Hawaï virus, Snow Mountain virus, Montgomery county virus, Parramatta ou encore Toronto virus (Koopmans *et al.*, 2002). Les conséquences d'une infection par les NLV sont variables. En général, après 2 à 3 jours d'incubation se développent différents symptômes dont les principaux sont la fièvre, les vomissements, les diarrhées et le mal de tête. Ces symptômes régressent généralement en 12 à 60 heures. Jusqu'à présent, il était admis que la durée de ces symptômes et de l'excrétion virale n'excédait pas 2 à 3 jours (Nicand *et al.*, 1998). Or, très récemment, une étude hollandaise montre que 20 % des personnes infectées par le NLV présentent des symptômes pendant une période supérieure à deux semaines (Koopmans *et al.*, 2002). Cependant, il est important de souligner que l'infection asymptomatique reste commune (Farkas *et al.*, 2000).

La transmission se fait essentiellement de personne à personne même si des études ont démontré le rôle de l'eau (Kukkula *et al.*, 1997), des aliments (Kohn *et al.*, 1995) ou de l'air (Koopmans *et al.*, 2002).

Concernant l'étendue des épidémies, Fankhauser *et al.* (1998) rapportent que les NLV sont responsables de 96 % des épidémies de gastro-entérites non bactériennes survenues aux Etats-Unis entre janvier 1996 et juin 1997 dans des collectivités et des restaurants ou suite à la consommation d'huîtres. Le Tableau 4 présente quelques épidémies récentes dues aux NLV de par le monde. Une forte prévalence est rapportée dans de nombreux pays (Koopmans *et al.*, 2002) et les NLV sont considérés comme des agents importants de gastro-entérites sporadiques notamment chez l'enfant de moins de 5 ans avec une incidence au moins égale à celle des *rotavirus* (Bon *et al.*, 1999 ; Pang *et al.*, 2000 ; de Wit *et al.*, 2001b). Comme pour le *rotavirus*, une prévalence hivernale a été rapportée (Mounts *et al.*, 2000). Des infections nosocomiales ont également été observées (Traoré *et al.*, 2000). Ces études montrent en outre que les patients de tout âge peuvent être infectés. Le nombre de cas épidémiques suggère que l'immunité est de courte durée et que la diversité antigénique est telle que les réinfections par des types différents est fréquente. Une étude sur des volontaires semble d'ailleurs confirmer cette observation (Noel *et al.*, 1997).

Tableau 4 : Implication des NLV dans quelques épidémies récentes

Pays	Nombre d'échantillons	Méthodes	Résultats	Références
Indonésie	102 selles (diarrhées)	RT-PCR	30 % positifs NLV	Subekti <i>et al.</i> , 2002
Mexique	115 selles (diarrhées) 66 selles (normales)	RT-PCR	19 % positifs NLV 7 % positifs NLV	Farkas <i>et al.</i> , 2000
Norvège	406 selles (diarrhées)	RT-PCR	19 % positifs NLV	Vainio <i>et al.</i> , 2001
Japon	209 selles (diarrhées)	RT-PCR	79 % positifs NLV	Iritani <i>et al.</i> , 2002
Hongrie	196 selles (diarrhées)	RT-PCR ID	37 % NLV 87 % NLV	Reuter <i>et al.</i> , 2002
Australie	95 selles (diarrhées)	RT-PCR	50 % NLV	White <i>et al.</i> , 2002
Angleterre	305 selles (diarrhées)	RT-PCR ID ME	70 % NLV (total) dont 71 % (ID) 63 % (ME) 84 % (RT-PCR)	Vipond <i>et al.</i> , 2000
Nouvelle-Zélande	83 selles (diarrhées)	RT-PCR	100 % NLV	Greening <i>et al.</i> , 2001

ID : immuno-détection ; ME : Microscopie électronique ; MV : Mexican virus ; SV : Southampton virus ; LV : Lordsdale virus

Parmi les NLV, bien que 2 génogroupes (GG) cocirculent, les souches du GGII seraient prédominantes par rapport aux souches du GGI (Koopmans *et al.*, 2000). Une autre étude montre d'ailleurs que sur 20 souches isolées à partir d'épidémies ayant eu lieu en Angleterre entre 1986 et 1996, 9 sont du GGI et 11 sont du GGII (Green *et al.*, 2000b). En fait, la distribution des deux génogroupes semble se modifier en fonction du temps (Vinjé *et al.*, 1997). En général, des souches différentes sont à l'origine de chaque épidémie (Koopmans *et al.*, 2000 et 2002). Cependant, certaines années, une seule souche peut causer la majorité des épidémies recensées (Noel *et al.*, 1999 ; Koopmans *et al.*, 2000). L'émergence d'une telle souche épidémique pourrait être expliquée par une augmentation soudaine de la virulence, une transmission hydrique ou alimentaire à large échelle ou encore l'introduction d'une nouvelle souche à partir d'un réservoir animal important (Kohli *et al.*, 2001). En effet, des *calicivirus* ayant des caractéristiques similaires aux NLV humains ont été décrits chez le bœuf et le porc (Sugieda *et al.*, 1998 ; Liu *et al.*, 1999). La suspicion qu'un tel réservoir puisse être responsable d'épidémie humaine a par ailleurs été rapportée (Koopmans *et al.*, 2000 et 2002).

Les Sapporo-like virus (SLV)

Comme les NLV, les SLV sont des *Caliciviridae*. Ils sont d'ailleurs souvent regroupés sous la même dénomination de « *Calicivirus* humain ». Sur le plan épidémiologique, les SLV se différencient essentiellement des NLV par une beaucoup plus faible incidence (Fleet *et al.*, 2000 ; Lopman *et al.*, 2002), ce qui limite le nombre d'études les concernant spécifiquement. Les gastro-entérites à SLV ont surtout été décrites chez l'enfant (Chiba *et al.*, 2000). Néanmoins, elles apparaissent aussi chez l'adulte notamment au cours d'épidémies d'origine alimentaire (Noel *et al.*, 1997) ou chez les personnes âgées (Cubitt *et al.*, 1981).

Les astrovirus

Les *astrovirus*, membres des *Astroviridae*, ont été identifiés pour la première fois en tant que pathogènes humains par Appleton et Higgins (1975) pendant une épidémie de gastro-entérite dans une maternité. La fréquence de détection des *astrovirus* varie selon les études entre 2,5 et 9 % chez des enfants atteints de gastro-entérites. L'excrétion virale persiste 12 jours en moyenne (Nicand *et al.*, 1998). Comme pour les *rotavirus*, un pic hivernal est observé (Glass *et al.*, 1996b ; Palombo et Bishop, 1996 ; Bon *et al.*, 1999 ; Pang *et al.*, 2000). Les sujets âgés (Lewis *et al.*, 1989) et les immunodéprimés (Grohmann *et al.*, 1993 ; Liste *et al.*, 2000) constituent également une population à risque. L'infection nosocomiale a également été rapportée (Traoré *et al.*, 2000). La fréquence de détection des *astrovirus* dans la population générale reste néanmoins faible : entre 1,5 et 2 % des cas de gastro-entérites nécessitant une consultation chez un médecin généraliste (De Wit *et al.*, 2001a et b). Les *astrovirus* peuvent également être à l'origine d'épidémies dans les collectivités. Ainsi, un *astrovirus* a été identifié au cours d'une épidémie chez des militaires français (Belliot *et al.*, 1997).

Les principaux vecteurs de contamination par les *astrovirus* semblent être l'eau et les coquillages d'où ils ont été isolés fréquemment (Kopecka *et al.*, 1993 ; Le Guyader *et al.*, 1994 ; Puig *et al.*, 1994 ; Marx *et al.*, 1995 ; Pinto *et al.*, 1996 ; Le Guyader *et al.*, 2000 ; Yokoi *et al.*, 2001). La survie des *astrovirus* semble comparable à celle des *rotavirus* et des *adénovirus* entériques dans l'eau potable (Abad *et al.*, 1997). Il existe 8 sérotypes différents. Les études d'épidémiologie moléculaire réalisées dans différents pays montrent que le type 1 est le plus fréquemment isolé (Noel *et al.*, 1995 ; Palombo et Bishop, 1996 ; Shastri *et al.*, 1998). Ces données sont confirmées par des études de séroprévalence, les sérotypes 6, 7 et 8 étant les plus rarement rencontrés (Kohli *et al.*, 2001).

Les adénovirus entériques

Parmi les 51 sérotypes d'*adénovirus* (De Jong *et al.*, 1999), les types 40 et 41 d'origine entérique sont les plus étudiés en tant que responsables de troubles digestifs chez l'homme. La fréquence de détection des *adénovirus* 40 et 41 chez les enfants atteints de gastro-entérite varie entre 2 et 14 % selon les régions et selon les études (Durepaire *et al.*, 1995 ; Bon *et al.*, 1999 ; Fleet *et al.*, 2000 ; Pang *et al.*, 2000). Dans la population générale, leur fréquence a été évaluée entre 2,2 et 3,8 % des cas nécessitant une consultation chez un médecin généraliste (De Wit *et al.*, 2001a et b). Généralement, après une incubation de 8 à 10 jours, l'infection provoque chez les enfants de moins de 2 ans des diarrhées allant, selon les auteurs, de 6 à 8 jours (Adrian *et al.*, 1987) ou de 2 à 22 jours (Bajolet et Chippaux-Hyppolite, 2001). Cette diarrhée s'accompagne de fièvre et de vomissements modérés et parfois de signes respiratoires. La durée moyenne d'excrétion virale s'établit entre 5 et 12 jours chez les sujets immunocompétents (Nicand *et al.*, 1998). Un caractère saisonnier avec une recrudescence épidémique en hiver est constaté pour les *adénovirus* entériques (Durepaire *et al.*, 1995). Toutefois, l'étude de 5 000 échantillons de selles collectée sur la période 1981-1996 en Australie montrerait que seul le sérotype 41 présente un caractère saisonnier. Il serait en outre majoritairement responsable des cas de diarrhées (40 à 80 %) par rapport au sérotype 40 (moins de 20 %) (Fleet *et al.*, 2000).

Leur stabilité dans l'eau serait plus importante que celle du *poliovirus* 1 ou du HAV (Enriquez *et al.*, 1995). Ainsi, des *adénovirus* sont retrouvés dans différents milieux hydriques tels que les eaux

usées brutes (Irving et Smith, 1981 ; Krikelis *et al.*, 1988 ; Puig *et al.*, 1994), les eaux de surfaces (Tani *et al.*, 1995), les eaux de mer ou estuaire (Castignolles *et al.*, 1998 ; Jiang *et al.*, 2001). La présence de génome d'*adénovirus* dans l'eau du robinet a également été mise en évidence en Corée du Sud dans 9 échantillons sur 23 (22 %). Sept étaient des *adénovirus* de type 40 et 41 (Lee et Kim, 2002).

À titre indicatif, notons que d'autres *adénovirus*, essentiellement de type 3, 4 et 7 ont été rendus responsables de l'apparition de divers symptômes, en particulier dans les piscines comme le montre le Tableau 5. Le nombre limité d'épidémies d'origine hydrique impliquant ces *adénovirus* 3, 4 et 7 semble indiquer qu'ils sont moins résistants dans l'environnement.

Tableau 5 : Quelques cas d'épidémie attribués aux *adénovirus* lors de la fréquentation des piscines publiques

Agents	Causes	Année	Nombre de cas	Symptômes	Références
<i>Adénovirus</i> 3	Contamination fécale possible	1968	66 % des enfants	Fièvre, pharyngite, conjonctivite	Foy <i>et al.</i> , 1968
<i>Adénovirus</i> 7	Chloration défectueuse	1974	7	Conjonctivite	Caldwell <i>et al.</i> , 1974
<i>Adénovirus</i> 4	Faible niveau de chlore	1977	72	Pharyngite, conjonctivite	D'Angelo <i>et al.</i> , 1979
<i>Adénovirus</i> 3	Insuffisance de chloration et filtre défectueux	1977	105	Fièvre, pharyngite, maux de tête, conjonctivite	Martone <i>et al.</i> , 1980
<i>Adénovirus</i> 7	Chloration défectueuse	1987	77	Pharyngite	Turner <i>et al.</i> , 1987
<i>Adénovirus</i> 3	Chloration défectueuse	1995	80	Fièvre, pharyngite, maux de tête, conjonctivite	Papapetropoulou et Vantarakis, 1998
<i>Adénovirus</i> 3	Chloration défectueuse	2000	34	Fièvre, pharyngite, maux de tête, conjonctivite	Harley <i>et al.</i> , 2001

1.1.2.2 Les virus des hépatites

Deux virus sont impliqués dans la transmission par le milieu hydrique, il s'agit du *virus de l'hépatite A* et du *virus de l'hépatite E*.

Le virus de l'hépatite A (HAV).

Le HAV appartient à la famille des *Picornaviridae*. La transmission du HAV peut se faire soit de manière indirecte par l'intermédiaire de l'eau ou d'aliments contaminés soit directement par voie féco-orale. La transmission directe est très largement favorisée par le manque d'hygiène. L'âge de l'individu infecté constitue le facteur prédominant pour les infections provoquées par le HAV. Ainsi, plus de 90 % des enfants de moins de 6 ans infectés par le HAV développent une forme asymptomatique alors que 50 % à 75 % des adultes infectés présentent une forme clinique ictérique (Hollinger et Ticehurst, 1990). Dans ce cas, après une période d'incubation de 30 jours en moyenne

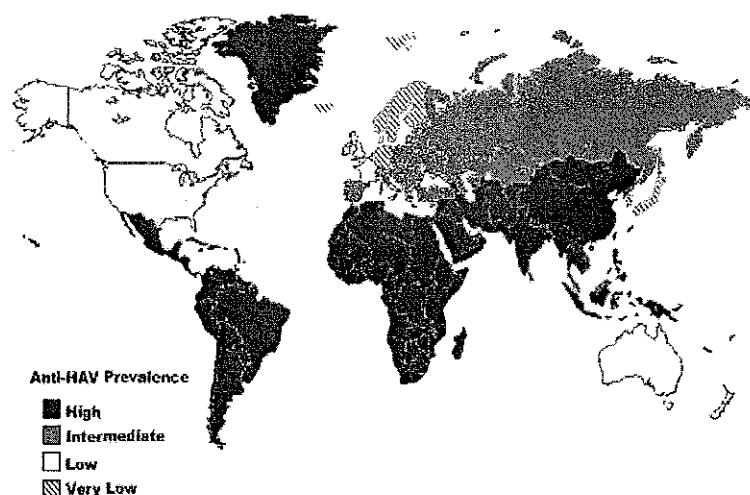
(15 à 50 jours), l'infection se manifeste par de la fièvre, des maux de tête, de la fatigue, des nausées avec des signes d'hépatite (jaunisse). La durée de la maladie est en moyenne de 95 jours. Des cas prolongés atteignant plus de 6 mois sont rapportés pour 10 à 15 % des patients (Bower *et al.*, 2000). Il n'y a jamais d'évolution vers la chronicité (Koopmans *et al.*, 2002). Le taux de létalité moyen est de 0,1 à 0,6 %. Ce taux augmente avec l'âge des patients et atteint entre 1,8 % (Koopmans *et al.*, 2002) et 2,7 % (Hadler, 1991) des individus de plus de 50 ans. Les conséquences d'une infection par le HAV sont résumées dans le Tableau 6.

Tableau 6 : Conséquences de l'infection par le HAV (d'après Hollinger et Ticehurst, 1990)

		Enfants (moins de 5 ans)	Adultes
Infection asymptomatique		80-95 %	10-25 %
Infection symptomatique		5-20 %	75-90 %
Guérison totale		Plus de 99 %	Plus de 98 %
Maladie chronique		Jamais	
Taux de mortalité	14 ans et moins	0,1 %	
	15 – 39 ans	0,3 %	
	40 ans et plus	2,1 %	

Le HAV peut être détecté dans les selles quelques jours avant les premiers symptômes puis généralement le taux viral excrété diminue rapidement dès l'apparition de ceux-ci. Par contre, les anticorps anti-HAV persistent pendant plusieurs années (Nicand *et al.*, 1998). La Figure 2 présente les régions du monde où le virus est endémique. Koopmans *et al.* rapportent en 2002 que 84 000 cas d'hépatite A sont recensés annuellement aux Etats-Unis dont 5 % seraient directement liés à l'eau ou à l'alimentation. Récemment, des épidémies sporadiques ont été décrites à travers le monde dans les écoles (Hutin *et al.*, 1999 ; Melo *et al.*, 2002), les prisons (Kar *et al.*, 2000), les bars (Sundkvist *et al.*, 2000), au sein de communautés homosexuelles (Stene-Johansen *et al.*, 2002) ou de personnes droguées (Grinde *et al.*, 1997 ; O'Donovan *et al.*, 2001) ou encore après la guerre du Kosovo avec le retour de réfugiés à Mitrovica (Rey *et al.*, 2002). Précisons qu'un vaccin inactivé existe pour la prévention de l'infection par le HAV.

Figure 2 : Endémicité du HAV en fonction du lieu géographique (d'après WHO, 2000)



Le virus de l'hépatite E (HEV)

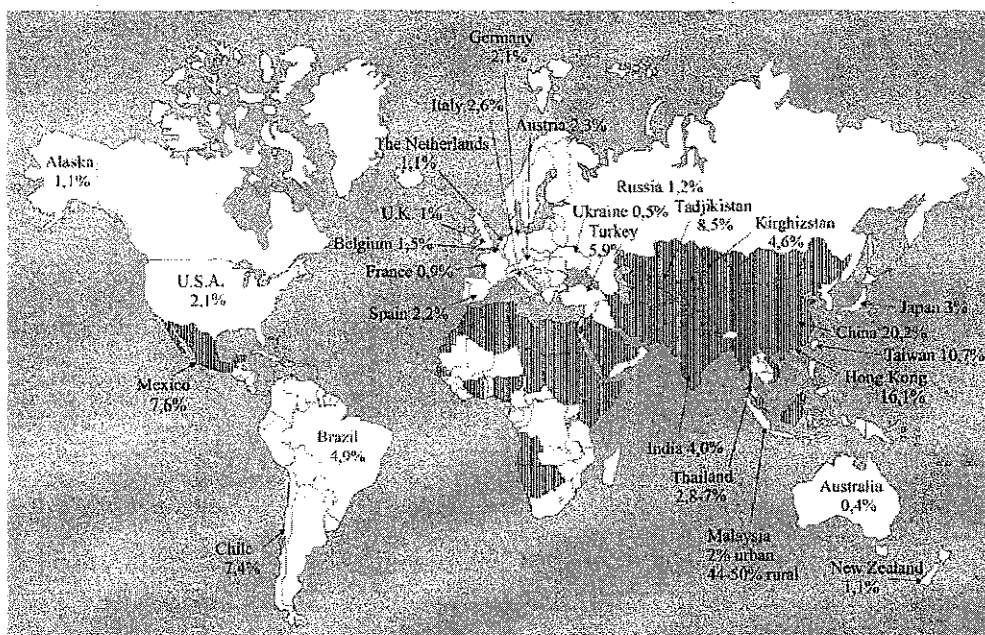
Le virus de l'hépatite E possède des ressemblances avec les virus des *Caliciviridae*, mais il n'est rattaché pour l'instant à aucune famille car il présente des caractéristiques uniques (Green *et al.*, 2000c). Les symptômes sont proches de ceux du HAV avec l'apparition d'un ictère hépatique plus ou moins sévère. L'excrétion fécale débute dès l'apparition de l'ictère et persiste pendant 2 semaines (Clayson *et al.*, 1995). Dans certains cas, la durée de l'infection peut atteindre 60 jours (Worm *et al.*, 2002). À noter que l'infection reste asymptomatique dans 50 % des cas. Par ailleurs, aucune forme chronique n'a été décrite à ce jour (Nicand *et al.*, 2001).

Comme pour le HAV, les anticorps anti-HEV persistent pendant plusieurs années (Nicand *et al.*, 1998). Le HEV est endémique dans de nombreuses régions du monde, en particulier dans les pays en voie de développement où le HAV est également endémique (Asie du sud, Indes, Afrique) (Koopmans *et al.*, 2002 ; Worm *et al.*, 2002). La Figure 3 montre les régions du monde dans lesquelles le HEV est endémique ainsi que la séroprévalence dans certains autres pays. Au Nicaragua, la prévalence des anticorps anti-HEV est de 17,6 % à l'âge de 40 ans (en comparaison, celle des anti-HAV est de 72,4 %) (Perez *et al.*, 1996). Dans une région de très haute endémicité comme l'Inde, la séroprévalence des anti-HEV chez l'adulte est de 33 à 40 % (Arankalle *et al.*, 1995). Dans les pays industrialisés, les principaux cas rapportés ont été observés après un séjour en zone d'endémie (Lavanchy *et al.*, 1994). Cependant quelques cas ont été décrits pour des patients n'ayant pas séjourné dans des pays endémiques pour le HEV. Ces cas ont été observés en France (Menecier *et al.*, 2000), en Allemagne, Italie, Grèce (Schlauder *et al.*, 1999), au Danemark (Christensen *et al.*, 2002) ou aux États-Unis (Schlauder *et al.*, 1998). La séroprévalence en Europe chez les donneurs de sang est estimée entre 1 et 2 % (Clayson *et al.*, 1995).

La transmission du virus se fait essentiellement par voie hydrique favorisée par un faible niveau sanitaire (Worm *et al.*, 2002). Dans les pays tropicaux, une recrudescence saisonnière est observée au cours de la saison des pluies notamment, d'avril à octobre dans le sud-est asiatique (Labrique *et al.*, 1999). Les souches virales de HEV présentes chez le porc et le rat pourraient constituer un réservoir à partir duquel s'effectue la transmission à l'homme. En Afrique par exemple, dans certains pays de forte endémicité, 29 à 60 % des porcs, bovins, ovins et caprins possèdent des anticorps anti-HEV (Nicand *et al.*, 2001). Toutefois, peu de cas humains ont été rapportés dans des régions où le HEV est endémique chez ces animaux ce qui tend à montrer que la transmission d'une espèce à l'autre n'est pas évidente (Koopmans *et al.*, 2002).

La mortalité est de 0,5 à 3 % (Koopmans *et al.*, 2002) ou 0,2 à 4 % (Worm *et al.*, 2002) de la population touchée selon les études mais atteint 20 % chez les femmes enceintes en particulier lorsque la primo-infection survient au cours du troisième trimestre de la grossesse (Koopmans *et al.*, 2002 ; Worm *et al.*, 2002). Des taux de mortalité variant de 10 à 42 % chez les femmes enceintes ont même été rapportés (Nicand *et al.*, 2001).

Figure 3 : Distribution de l'hépatite E dans le monde. Les zones hachurées représentent les régions endémiques, les flèches présentent des résultats de séro-prévalence de la population (Worm *et al.*, 2002)



Les entérovirus

Les *entérovirus* sont des *Picornaviridae*. Le plus souvent, les infections à *entérovirus* sont totalement asymptomatiques (Nicand *et al.*, 1998). Lorsque des symptômes apparaissent, les infections à *entérovirus* sont associées à une très grande diversité clinique comme le montre le Tableau 7. Il peut s'agir de syndromes spécifiques comme la poliomyélite, l'herpangine ou le syndrome main-pied-bouche, d'atteintes neurologiques non spécifiques comme les encéphalites, les méningites aseptiques, le syndrome de Guillain-Barré (paralysie), ou de formes plus banales, digestives ou respiratoires. Ces infections sont généralement épidémiques même si des formes chroniques ont été rapportées (Nicand *et al.*, 1998).

Tableau 7 : Principaux symptômes cliniques associés aux *entérovirus* (d'après Nicand *et al.*, 1998)

<i>Poliovirus</i>	Poliomyélite ; Paralysie flasque ; Méningite
<i>Coxsackievirus A</i>	Méningite ; Herpangine ; Syndrome main-pied-bouche ; Affection respiratoire ; Conjonctivite hémorragique
<i>Coxsackievirus B</i>	Méningite ; Myocardite, Péricardite
<i>Echovirus</i>	Méningite ; Paralysie ; Fièvre ; Infection respiratoire
<i>Entérovirus 68 à 71</i>	Méningite ; Encéphalite ; Conjonctivite hémorragique ; Infection respiratoire

La durée moyenne d'excrétion fécale est de 1 mois. Elle débute 4 à 5 jours avant la phase clinique et peut persister 12 à 17 semaines (Nicand *et al.*, 1998). Les facteurs climatiques peuvent influencer la transmission féco-orale de ces virus. Ainsi, dans les pays tempérés il est observé une recrudescence des entéroviroses pendant la saison chaude (Melnick 1996). Pourtant, même si un pic est observé en été dans l'eau de rivière (Pianetti *et al.*, 2000), les *entérovirus* y sont présents toute l'année (Hejkal *et al.*, 1984 ; Tani *et al.*, 1995). Par ailleurs, même rares, des épidémies d'entéroviroses

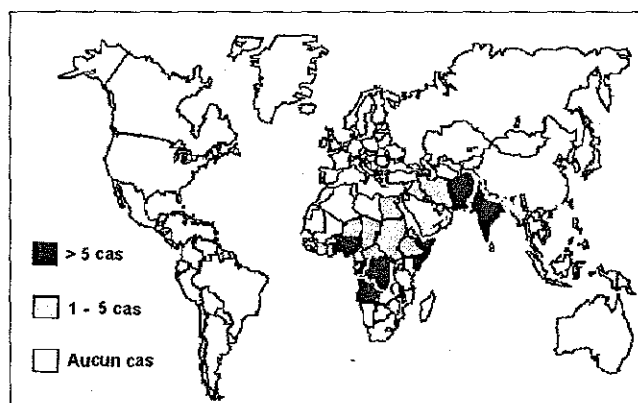
hivernales ont été décrites pour les *Echovirus* type 30 provoquant des cas de méningites et nécessitant une hospitalisation (Mori *et al.*, 1995 ; Chambon *et al.*, 2001). Pour les *entérovirus*, le rôle de l'eau est rarement démontré du fait des nombreuses formes inapparentes. Pour autant, des *entérovirus* sont régulièrement mis en évidence dans différents milieux hydriques. Le Tableau 8 présente quelques épidémies récentes dues aux *entérovirus* et met en évidence l'importance des cas où le *poliovirus* est impliqué. La Figure 4 présente la situation mondiale en l'an 2000 concernant les cas de poliomyélite. On notera qu'au plan mondial, la poliomyélite est en voie d'éradication.

Tableau 8: Récents cas d'épidémie impliquant des *entérovirus*

Taiwan	405 cas 78 morts	<i>Entérovirus</i> 71	Lin <i>et al.</i> , 2002
République dominicaine et Hawaï	21 cas 2 morts	PV1	Kew <i>et al.</i> , 2002
Bulgarie	3 cas	PV1	Kuntchev, 2001
Pays-Bas	77 cas	PV3	Oostvogel <i>et al.</i> , 2001
Angola	67 cas	PV3	Arya, 2001
	43 cas	PV1	
République de Tchétchénie	146 cas 6 morts	PV1 genotype T	Ivanova <i>et al.</i> , 2001
Cap-Vert	33 cas 7 morts	PV1	Anonyme, 2000
Angola	1093 cas	PV3 et PV1	Valente <i>et al.</i> , 2000
Grèce	18 cas confirmés 2 probables	<i>Coxsackievirus</i> B2	Syriopoulou <i>et al.</i> , 2002
Biélorussie	460 cas	<i>Echovirus</i> 30	Amvrosieva <i>et al.</i> , 2001
Australie	30 cas	<i>Echovirus</i> 30	Gosbell <i>et al.</i> , 2000

PV : *poliovirus*

Figure 4: Pays d'endémie poliomyélitique en 2000 en fonction du nombre d'individus atteints de paralysie flasque aiguë (Anonyme 2001)



1.1.3 Mise en évidence des virus entériques pathogènes

Il existe différentes techniques pour mettre en évidence les virus entériques pathogènes présents dans les prélèvements provenant de personnes infectées (microscopie et immunomicroscopie électronique, immunodétection, culture cellulaire et biologie moléculaire). Cependant, pour la détection des virus entériques à partir du milieu hydrique où leur concentration est faible, ce sont

essentiellement les techniques les plus sensibles qui sont utilisées : la culture cellulaire (technique de référence) et la biologie moléculaire.

1.1.3.1 La culture cellulaire

Le principe de cette méthode classique de mise en évidence repose sur le fait que certains virus entériques sont capables de se multiplier sur des cultures de cellules *in vitro* et que cette multiplication peut être visualisée :

- soit directement par apparition d'un effet cytopathogène (ECP) qui traduit la lyse des cellules infectées par le virus ;
- soit indirectement pour les virus se multipliant sans provoquer d'ECP, en révélant cette multiplication cellulaire par des techniques immunologiques *in situ*, ou par biologie moléculaire.

Dans l'environnement hydrique, la densité virale est en général très faible. L'échantillon doit donc presque toujours être soumis à une concentration préalable qui a pour objectif de récupérer les virus présents sous un faible volume. Aussi l'échantillon, et à fortiori le concentrat peuvent contenir indifféremment virus, matières en suspension, bactéries, fungi et de nombreuses molécules ou macromolécules tels que métaux lourds, hydrocarbures ou détergents susceptibles d'être toxiques pour les cultures cellulaires. Une décontamination (antibiotiques, antifongiques) et éventuellement une détoxification (dilution, centrifugation, filtration sur gel de Séphadex LH20) sont souvent utilisées pour éliminer bactéries, fungi et dans la mesure du possible des substances toxiques (Schwartzbrod et Bosch, 1991).

Une fois l'échantillon traité, celui-ci est mis en contact avec les cellules. De nombreuses lignées cellulaires existent pour la mise en évidence des virus entériques. Les tableaux 9 et 10 présentent quelques-unes de ces souches sur lesquelles différents virus rencontrés dans le milieu hydrique sont susceptibles de se multiplier. Il est important de noter que ces cellules ne présentent pas toutes la même sensibilité et il est donc nécessaire de faire un choix parmi tous les systèmes cellulaires proposés en fonction des virus recherchés. Or les résultats obtenus dans la littérature, surtout à propos d'isolement effectué à partir d'échantillons environnementaux sont souvent contradictoires. De ce fait il est difficile d'une part de déterminer la meilleure souche cellulaire à utiliser et d'autre part de comparer les résultats obtenus par les différents chercheurs.

Ainsi, dans une étude comparative, Agbalika *et al.* (1984) observent qu'à partir d'une même eau usée, 25 %, 14 % et 2 % des échantillons positifs sont obtenus respectivement avec des cellules MA-104, BGM et Vero. L'analyse détaillée des résultats montre que dans cette étude, les *poliovirus* sont plus fréquemment retrouvés sur MA-104 (12,3 %) que sur BGM (1,7 %). Les *reovirus* (3,5 %) et les *echovirus* (1,7 %) ne sont mis en évidence que sur MA-104. À noter que, dans cette expérience, seules les cellules BGM permettent d'isoler des *Coxsackievirus* du groupe B (5,9 %). Une autre étude montre que les cellules L20B sont plus sensibles au *Poliovirus* (45 % d'échantillons positifs) que les cellules BGM (25 %), PLC/PRF/5 (20 %) ou PVK (10 %) (Grabow *et al.*, 1999a). Comparant les souches BGM et Hep-2, Muscillo *et al.* (1997) constatent que les cellules BGM sont plus

sensibles que les Hep-2 à l'infection par les *entérovirus* (33 % vs 8 % en eau de mer et 30 % vs 23 % en eau d'estuaire) et des *reovirus* (80 % vs 53 % en eau de mer et 54 % vs 30 % en eau d'estuaire). Un autre exemple concerne les souches CaCo-2 et PLC/PRF/5. Pour Marx *et al.* (1998) la souche PLC/PRF/5 est plus adaptée que la souche CaCo-2 pour la recherche d'*astrovirus* à partir d'échantillons d'eau de l'environnement. Plus récemment, Taylor *et al.* (2001) rapportent au contraire que la souche CaCo-2 présente une sensibilité plus importante que la souche PLC/PRF/5 puisque, pour certains échantillons d'eau de surface, seules les cellules CaCo-2 ont permis l'isolement des *astrovirus*. D'une manière générale, la recherche des virus entériques infectieux par culture cellulaire dépend de la sensibilité de la souche utilisée mais également de la nature des échantillons à analyser.

Par ailleurs, la probabilité d'isoler un virus à partir d'un prélèvement augmente avec le nombre de systèmes cellulaires inoculés. Aussi, il est recommandé d'effectuer les isollements sur au moins deux systèmes cellulaires différents. Parallèlement, il est nécessaire de réaliser systématiquement une, voire deux subcultures ce qui permet d'une part d'augmenter le pourcentage d'isolement (Schwartzbrod et Bosch, 1991) et d'autre part de s'assurer que les ECP ne sont pas dus à la présence de produits toxiques dans l'échantillon de départ. Enfin, la présence virale détectée par la mise en évidence d'un ECP doit obligatoirement être confirmée ultérieurement par une identification précise du virus (Schwartzbrod et Bosch, 1991).

Tableau 9: Sensibilité de différents systèmes cellulaires pour l'isolement (ECP) des virus entériques (d'après Schwartzbrod, 1991)

		Virus						
		<i>Poliovirus</i>	<i>Coxsackievirus</i> A	<i>Coxsackievirus</i> B	<i>Echovirus</i>	<i>Reovirus</i>	<i>Adénovirus</i> (1 à 39)	<i>Adénovirus</i> (40 à 41)
Cellules	Rein de singe	+	±	+	+	+	-	-
	Véro	+	±	+	+	+	±	-
	BGM	+	±	+	+	+	±	-
	HeLa	+	±	±	±	+	+	-
	KB	+	±	±	±	+	+	-
	Hep 2	+	±	±	±	+	+	-
	RD	+	±	-	+	±	+	-
	MRC 5	+	±	-	+	±	±	-
	L20 B	+				+		
	PLC/PRF/5							+

Tableau 10: Quelques lignées cellulaires permettant l'isolement de virus entériques citées dans la littérature

Cellules	Virus isolés	Échantillons	Références
BGM	<i>Reovirus</i>	Eaux de mer	Muscillo <i>et al.</i> , 2001
FRhK	HAV	Eaux usées, eaux de surface et eaux de mer	Reynolds <i>et al.</i> , 2001
BGM	<i>Entérovirus</i>		
BGM	<i>Poliovirus</i> <i>Coxsackievirus</i> <i>Echovirus</i>	Eaux usées	Hoyt et Margolin, 2000
BGM Hep-2	<i>Entérovirus</i>	Eaux de mer	Muscillo <i>et al.</i> , 1997
MA-104 CaCo-2	<i>Rotavirus</i>	Selles, eaux potables	Abad <i>et al.</i> , 1998
CaCo-2	<i>Astrovirus</i> , <i>Entérovirus</i>	Eaux de surface	Capron <i>et al.</i> , 2000
BGM	<i>Adénovirus</i> 40 et 41, <i>Entérovirus</i>		
Vero Hela	<i>Entérovirus</i> , <i>echovirus</i>	Boues	Caillou <i>et al.</i> , 1998
PLC/PRF/5 CaCo-2	<i>Astrovirus</i>	Inoculation	Taylor <i>et al.</i> , 1997b
PLC/PRF/5	<i>Adénovirus</i> 40 et 41	Inoculation	Grabow <i>et al.</i> , 1992
PLC/PRF/5	<i>Adénovirus</i> 40 et 41, HAV	Eaux usées, eaux de mer, eaux du robinet	Enriquez <i>et al.</i> , 1995
BGM	<i>Entérovirus</i>		
L20B RD Hep-2	<i>Poliovirus</i>	Echantillons cliniques	Wood et Hull, 1999
PLC/PRF/5 BGM L20B PVK	<i>Reovirus</i> , <i>Poliovirus</i> , <i>Entérovirus</i>	Eaux usées	Grabow <i>et al.</i> , 1999a

Par ailleurs, si certains virus entériques se multiplient sur cultures cellulaires en provoquant un ECP, d'autres se multiplient sans provoquer d'ECP. C'est le cas notamment des *rotavirus* et du *virus de l'hépatite A*. La détection de ces virus nécessite donc des étapes supplémentaires faisant appel soit à l'immunologie (immunofluorescence indirecte sur les cellules infectées) ou à la biologie moléculaire (PCR sur le surnageant de culture cellulaire). Par ailleurs, un certain nombre d'*entérovirus* qui normalement provoquent un ECP en cultures cellulaires perdent cette capacité après passage dans le milieu hydrique et se multiplient en cultures cellulaires sans provoquer d'ECP (Grabow *et al.*, 1993 ; Shieh *et al.*, 1997). La mise en évidence de ces virus nécessite d'utiliser les mêmes techniques immunologique et moléculaire que celles décrites pour la détection des virus ne provoquant pas d'ECP.

En conclusion, la culture cellulaire constitue bien la méthode de référence incontestable car dans l'état actuel des connaissances, elle est la seule qui permette d'affirmer le caractère infectieux des virus isolés, mais elle reste néanmoins limitée parce que :

- certains virus ne se multiplient pas sur cultures cellulaires (*Norwalk-like*, *Sapporo-like*),
- d'autres s'y multiplient sans provoquer d'effet cytopathogène (*virus de l'hépatite A*, *rotavirus*),
- c'est une méthode longue et délicate à pratiquer en routine dans le cadre de la virologie de l'environnement,
- tout résultat positif doit obligatoirement être confirmé par une identification des virus isolés, le plus souvent à l'aide d'une technique immunologique de séroneutralisation ou d'une technique de biologie moléculaire.

1.1.3.2 Recherche directe du génome viral par RT-PCR

Une autre méthode pour mettre en évidence du matériel viral dans le milieu hydrique consiste à détecter le génome viral (ADN ou ARN) après amplification. Dans un premier temps, il est nécessaire de procéder à l'extraction de l'ARN ou de l'ADN viral en dénaturant les capsides virales. Puis, s'il s'agit d'ARN, de le transcrire en ADN complémentaire (ADNc) par rétro-transcription (RT). L'ADNc peut ensuite être amplifié par polymérase chain reaction (PCR) dont le principe est rappelé brièvement dans la Figure 5. Les produits amplifiés peuvent être visualisés :

- par électrophorèse en gel d'agarose ou de polyacrylamide en présence de bromure d'éthidium et observation sous ultra-violet. Les fragments sont séparés en fonction de leur poids moléculaire. La révélation des fragments amplifiés après une simple électrophorèse reste la technique la moins sensible mais la plus rapide.

- par hybridation moléculaire où les fragments amplifiés sont soit déposés sur des membranes de nylon ou de nitrocellulose (dot-blot ou slot blot) soit introduits dans des puits de micro-plaque dont le fond est recouvert de sondes complémentaires du fragment à détecter (« DNA Enzyme Immuno Assay » ou DEIA). Les fragments sont révélés directement à l'aide de sondes spécifiques marquées ou indirectement par immunodétection des hybrides (anticorps anti-double brin d'ADN). Cette technique ne fournit aucune information sur la taille des fragments amplifiés, mais elle est plus sensible et plus spécifique qu'une révélation par électrophorèse.

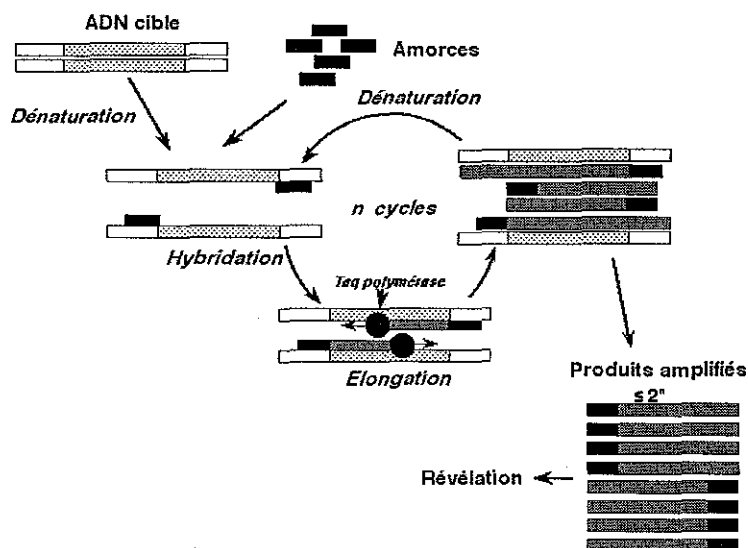
- par couplage d'une électrophorèse et d'une hybridation moléculaire (Southern blot). Les fragments amplifiés sont séparés en fonction de leur poids moléculaire par électrophorèse, puis transférés sur une membrane de nylon ou de nitrocellulose pour finalement être révélés par des sondes spécifiques marquées. Cette technique est plus spécifique que la précédente car elle permet de contrôler la taille des fragments amplifiés.

- directement lors de l'amplification. Il s'agit alors de PCR quantitative qui utilise une sonde marquée complémentaire d'un fragment de l'ADN cible. Il y a émission de fluorescence lorsque la sonde est délogée de son site d'hybridation par la polymérase, c'est-à-dire pendant la synthèse du brin complémentaire. L'intensité d'émission fluorescente augmente avec le nombre de copies d'ADN pendant l'amplification. Ainsi, la mesure de l'intensité lumineuse permet de quantifier le nombre de copies de génome viral présent dans l'échantillon.

Plusieurs paramètres peuvent influencer la RT-PCR :

- 1 - le choix de la méthode d'extraction (rendement)
- 2 - le choix des amorces lors de la rétro-transcription et de l'amplification par PCR
- 3 - le choix des sondes lors de la mise en évidence de l'ADN amplifié (détection par hybridation ou PCR quantitative) ;
- 4 - le choix des enzymes (rétro-transcriptase et polymérase) ;
- 5 - les concentrations en sels (ex : $MgCl_2$) qui détermine la stringence du milieu ;
- 6 - la présence d'inhibiteurs dans les échantillons de l'environnement.

Figure 5: Schéma du principe de PCR



De nombreux auteurs ont montré que la PCR est plus sensible que la culture cellulaire pour mettre en évidence une présence virale (Chung *et al.*, 1996 ; Pallin *et al.*, 1997 ; Abbaszadegan *et al.*, 1999 ; Tansuphasiri *et al.*, 2000). Cependant, si Lewis *et al.* (2000) comparant la sensibilité des deux techniques avec le *poliovirus 2* montrent que la biologie moléculaire est 10 à 100 fois plus sensible que la culture cellulaire en l'absence d'inhibiteurs, ils constatent qu'en présence d'acide humique (à partir de 25 mg/L) ou d'argile (à partir de 500mg/L) c'est la culture cellulaire qui devient plus sensible. Cette expérience souligne que la présence d'inhibiteurs dans les échantillons est un paramètre très important à considérer car il joue souvent le rôle de facteur limitant. C'est pour cette raison que nous développerons plus particulièrement ce dernier point qui est crucial pour les échantillons provenant de l'environnement.

De nombreuses macromolécules sont en effet susceptibles d'interférer avec les réactions enzymatiques mises en jeu lors de la RT-PCR (Tableau 11). Ainsi, l'action inhibitrice du glycogène, des polysaccharides, des protéines et des ADN non cibles à fortes concentrations a été démontrée (Jaykus *et al.*, 1993 ; Lees *et al.*, 1994 ; Jaykus *et al.*, 1995 ; Cromeans *et al.*, 1997). Afin d'améliorer le rendement des réactions enzymatiques de RT-PCR, il est donc soit nécessaire de diluer l'échantillon si les concentrations en ADN/ARN cible le permettent, soit d'inclure des étapes d'élimination des inhibiteurs et donc de purification, soit encore d'ajouter un produit permettant de masquer partiellement ou totalement leurs effets. Parmi les produits améliorant l'amplification génique, citons la protéine T4gene32 (Schwartz *et al.*, 1990 ; Kreader, 1996). Cette protéine améliore plus particulièrement la réaction de rétro-transcription. Ainsi, Chandler *et al.* (1998) montrent que la protéine T4gene32 augmente le rendement de la RT-PCR de 483% lorsqu'elle est ajoutée au mix de RT. Aucun effet n'est constaté si l'ajout se fait dans le mix de PCR. D'autres agents chimiques permettent une amélioration de la sensibilité de la RT-PCR lors de la recherche de virus tel que l'ajout de 4 à 8 % de glycerol ou de 3 % de DMSO (Jaykus *et al.*, 1996) ou encore 400 ng/ μ L de BSA (bovine serum albumin) (Kreader, 1996). Toutefois, certaines études contradictoires montrent qu'un même agent chimique ne produit pas toujours les mêmes effets (Wilson, 1997). L'efficacité de tels

produits dépend donc aussi bien de la concentration à laquelle ils sont utilisés que de la nature des inhibiteurs présents dans l'échantillon à analyser.

Tableau 11: Principaux inhibiteurs de PCR provenant de l'environnement (d'après Wilson, 1997)

Inhibiteurs	Actions	Remédiations possibles
Acides humiques	- Chélation des ions Mg^{2+} - Les groupes phénols forment des quinones qui interagissent avec l'ADN, les protéines...	BSA, sephadex, PEG, T4gene32, PVP
Enzymes (ex : DNase)	Interactions avec l'ADN, les protéines	Traitements aux UV
Urée	Inhibe la polymérase	Glycérol (2-7%), DMSO
Ca^{2+}	Interfère avec Mg^{2+}	Augmenter la concentration en Mg^{2+}
Polysaccharides, débris cellulaires, protéines	Masque l'ADN cible pour la polymérase	Benzyl chloride, fréon, tween 20, DMSO, PEG4000
Autres : ADN non cible, bactéries, pollen, talc, métaux lourds...	diverses	?

Parmi les techniques fréquemment utilisées pour améliorer les conditions de PCR, certaines sont très spécifiques. Ainsi, l'immunocapture des virus est une technique de purification basée sur la sélection spécifique de certains virus. Elle consiste à mettre l'échantillon en contact avec un support solide sur lequel des anticorps spécifiques du virus recherché sont fixés. Après capture des virus par les anticorps, des lavages successifs permettent d'éliminer les éventuels inhibiteurs. Cette technique qui a été beaucoup utilisée pour isoler le *virus de l'hépatite A* (Graff *et al.*, 1993 ; Prevot *et al.*, 1993 ; Deng *et al.*, 1994 ; Monceyron et Grinde, 1994 ; Shan *et al.*, 1997 ; Jothikumar *et al.*, 1998 ; Bidawid *et al.*, 2000) présente l'avantage de retenir les capsides virales et donc de permettre la mise en évidence uniquement de génome encapsidé et pas de génome libre ne présentant plus de caractère infectieux. Cependant, elle est plus délicate à mettre en oeuvre pour les *entérovirus* ou les *Norwalk like virus* par exemple dont les sérotypes sont nombreux et pour lesquels il n'existe pas d'antigène de groupe.

Des techniques de purification non spécifiques existent également. Ainsi la filtration sur membrane électropositive a été proposée (Queiroz *et al.*, 2001). Des traitements chimiques à base de cetyltriméthylammonium bromide (CTAB) ou de procipitate ont aussi permis d'éliminer du glycogène et des polysaccharides contenus dans des concentrats d'huîtres (Jaykus *et al.*, 1996). L'élimination sélective des inhibiteurs de type protéique peut être obtenue soit par une ou deux extractions organiques (phénol : chloroforme : alcool isoamylique / 25:24:1) suivies d'une précipitation à l'éthanol ou à l'isopropanol (Le Guyader *et al.*, 1996 ; Atmar *et al.*, 1995) soit par une précipitation à l'acide trichloracétique 5 % à chaud (Feng *et al.*, 1993) ou au PEG4000 (Jaykus, 1996). Enfin les sels, les protéines résiduelles de faible poids moléculaire ou les acides humiques peuvent être éliminés en partie par chromatographie d'exclusion sur Séphadex G-50, G-100 ou G-200 (De Leon *et al.*, 1992 ; Lewis *et al.*, 2000) ou sur résine échangeuse d'ions tel que le Chelex-100 (Straub *et al.*, 1994 ; Hale *et al.*, 1996) ou une combinaison des deux : Sephadex G-100 et Chelex-100 (Abbaszadegan *et al.*, 1993) ou Sephadex G-50 et Chelex-100 (Straub *et al.*, 1995).

Parallèlement aux traitements directs des échantillons, la purification des acides nucléiques viraux après extraction est également décrite dans la littérature. Dans ce cas, les inhibiteurs sont généralement éliminés de manière non sélective en utilisant par exemple une colonne de Sephadex G-50 saturée avec du Tris-EDTA (pH=8) qui permet de purifier un extrait d'ADN (Tsai et Olson, 1992). Une autre technique d'élimination non sélective des inhibiteurs consiste à fixer les ARN totaux ou les ARN viraux sur un support. Cette fixation peut s'effectuer par hybridation moléculaire. En effet, les ARN viraux comme les ARNm possèdent à leur extrémité 3' non codante une séquence polyadénillée ("queue de poly A"). Il est donc possible d'immobiliser les acides nucléiques par hybridation sur des billes magnétiques sur lesquelles sont fixées des oligonucléotides formés de 15 à 25 résidus thymidine. Les billes sont ensuite fixées sur un support magnétique pour permettre d'éliminer les inhibiteurs par des lavages successifs (Lindberg et Handersson., 1999 ; Kingsley *et al.*, 2001 et 2002 ; Goswami *et al.*, 2002). Cette purification peut être appliquée aux virus dont le génome possède une "queue de poly A" (*entérovirus* , *Norwalk like virus*, HAV...). Le même type de protocole peut être réalisé en substituant les oligonucléotides formés de 15 à 25 résidus thymidine par une sonde spécifique d'un type de virus donné, par exemple les *entérovirus* (Regan et Margolin, 1997 ; Beaulieux *et al.*, 1996). La fixation des ARN peut aussi s'effectuer par adsorption non spécifique sur des supports tels que la silice (Boom *et al.*, 1990 ; Shieh *et al.*, 1995 ; Ijzerman *et al.*, 1997 ; Legeay *et al.*, 2000) ou la poudre de verre (Hafliger *et al.*, 1997 ; Green *et al.*, 1998) en présence d'agent chaotrope tel que le thiocyanate de guanidium. De la même manière que précédemment, les acides nucléiques adsorbés sont purifiés d'éventuels inhibiteurs par différents lavages. Enfin, plusieurs traitements successifs peuvent également être appliqués à un même échantillon comme par exemple une précipitation au PEG suivie d'une extraction à l'aide de différents solvants organiques, d'une ultrafiltration et d'une adsorption sur silice (Ijzerman *et al.*, 1997).

Comme il n'existe aucun consensus concernant ni les techniques d'extraction-purification des génomes viraux ni les méthodes d'amplification, un très grand nombre de protocoles différents sont décrits dans la littérature. Cependant, il est possible de considérer qu'il existe à l'heure actuelle des techniques de RT-PCR pour isoler tous les virus entériques dans tous les échantillons d'eau provenant de l'environnement. Ainsi, les *entérovirus* (Gilgen *et al.*, 1995 ; Gantzer *et al.*, 1998b ; Schvoerer *et al.*, 2000 ; Schvoerer *et al.*, 2001 ; Reynolds *et al.*, 2001 ; Vivier *et al.*, 2001 ; Lee et Kim, 2002 ; Katayama *et al.*, 2002), les *reovirus* (Muscillo *et al.*, 2001 ; Spinner et Giovanni, 2001 ; Leary *et al.*, 2002), les *Calicivirus* (Huang *et al.*, 2000 ; Atmar et Estes, 2001 ; Burkhardt *et al.*, 2002) ou plus spécifiquement les *Norwalk like virus* (Schwab *et al.*, 1996 ; Gilgen *et al.*, 1997 ; Häfliger *et al.*, 2000 ; Brown *et al.*, 2001 ; Greening, *et al.*, 2001 ; Beuret *et al.*, 2002) ou les *Sapporo like virus* (Lappalainen *et al.*, 2001), le *virus de l'hépatite A* (Divizia *et al.*, 1998 ; Jothikumar *et al.*, 1998 ; Abbaszadegan *et al.*, 1999 ; Jothikumar *et al.*, 2000 ; Pina *et al.*, 2001 ; Morace *et al.*, 2002), les *adénovirus* (Genthe *et al.*, 1995 ; Chapron *et al.*, 2000 ; Cho *et al.*, 2000 ; Jiang *et al.*, 2001 ; Lee et Kim, 2002 ; Loge *et al.*, 2002), les *rotavirus* (Abbaszadegan *et al.*, 1999 ; Gratacap-Cavallier *et al.*, 2000 ; Kittigul *et al.*, 2000 ; Soule *et al.*, 2000 ; Goffi-Laroche *et al.*, 2001), les *astrovirus* (Pinto *et al.*, 1996 ; Chapron *et al.*, 2000 ; Miossec *et al.*, 2000 ; Goffi-Laroche *et al.*, 2001) et le *virus de l'hépatite E* (Corwin *et al.*, 1996 ; Jothikumar *et al.*, 2000 ; Grimm et Shay, 2002) ont été détectés dans des échantillons d'eaux divers et variés.

La critique souvent formulée à l'encontre de la PCR est le fait qu'elle ne permet pas de distinguer les particules virales infectieuses des particules virales non infectieuses. Ceci a pour conséquence de limiter son utilisation dans le cadre de l'évaluation du risque sanitaire lié à certaines eaux. Soulignons toutefois que des recherches sont menées pour remédier à cette situation. Ainsi Nuanualsuwan et Cliver (2002) proposent de traiter les échantillons simultanément avec la protéinase K et des ribonucléases pendant 30 minutes à 37°C avant de procéder à l'extraction. La première enzyme permet la dégradation de la capside des particules virales inactivées, la seconde permet la destruction du matériel génétique. L'hypothèse que font Nuanualsuwan et Cliver est que la protéinase K agit spécifiquement sur des capsides endommagées ayant perdu leur pouvoir infectieux. Les expériences ont été menées avec trois virus cultivables, le HAV, le *poliovirus* 1 et le FCV (féline *calicivirus*) qui ont subi chacun trois traitements : la chaleur, le rayonnement UV et l'action de l'hypochlorite. Les résultats montrent d'une part que le prétraitement enzymatique de l'échantillon n'affecte pas ou peu la recherche des particules virale infectieuses par PCR (diminution cependant dans certains cas de l'intensité de la bande sur gel d'électrophorèse). Par ailleurs, avec les suspensions virales ayant perdu leur pouvoir infectieux, quel que soit le virus et quel que soit le traitement utilisé, le résultat est positif en PCR sans prétraitement enzymatique et négatif après ce prétraitement. Ces résultats sont prometteurs, mais d'autres enzymes et d'autres conditions doivent encore être étudiées avant de valider une technique. Cette expérience permet néanmoins d'envisager qu'un jour la biologie moléculaire sera capable de distinguer les particules virales infectieuses des particules virales non infectieuses.

1.1.3.3 La recherche de virus infectieux suivie de la recherche du génome viral

Pour augmenter la sensibilité de la culture cellulaire, la combinaison de la culture cellulaire avec la PCR a été proposée sous le nom de ICC-PCR (Integrated cell culture-PCR). Cette technique a été utilisée pour la recherche d'*entérovirus*, d'*adénovirus*, d'*astrovirus* et de *virus de l'hépatite A* à partir d'échantillons de l'environnement dont l'eau de surface et l'eau potable (Chapron *et al.*, 2000 ; Grabow *et al.*, 2001 ; Reynolds *et al.*, 2001 ; Lee et Kim, 2002 ; Vivier *et al.*, 2002). Tous les résultats mettent en exergue une nette augmentation de la sensibilité de détection des virus pathogènes par rapport à la seule technique de culture cellulaire. En fait, l'ICC-PCR est une technique particulièrement intéressante pour des virus entériques dont la répllication au sein de lignées cellulaires ne provoque pas d'ECP (Grabow *et al.*, 2001 ; Sobsey *et al.*, 1998 ; Vivier *et al.*, 2002).

Par exemple, Grabow *et al.* (2001) montrent que 23 % des 413 échantillons d'eau ayant subi un traitement de potabilisation et 73 % des 224 échantillons d'eau brute (avant traitement de potabilisation) se sont avérés positifs avec la technique d'ICC-PCR alors que des ECP n'ont été observés que dans 6 % des cas concernant les eaux brutes et jamais lorsqu'il s'agissait des eaux traitées. Yates *et al.* (1999) travaillant sur des eaux souterraines observent que 5 échantillons sur 310 présentent un ECP sur cellules BGM (1,6 %) alors que 11/320 sont positifs en PCR *entérovirus* (3,4 %) à partir du surnageant de ces mêmes cultures cellulaires. De la même manière, Vivier *et al.* (2002) analysant des échantillons d'eau provenant de deux usines de potabilisation ont obtenu des résultats positifs en RT-PCR *entérovirus* (majoritairement des coxsackievirus B) à partir de 23 des 172 cultures cellulaires qui n'avaient pas présenté d'ECP.

Enfin, Grabow *et al.* (1999a) qui ont analysé des échantillons de l'environnement (rivière, eaux usées) ont obtenu des résultats positifs en RT-PCR *entérovirus* à partir de 263 cultures cellulaires qui n'avaient pas présenté d'ECP.

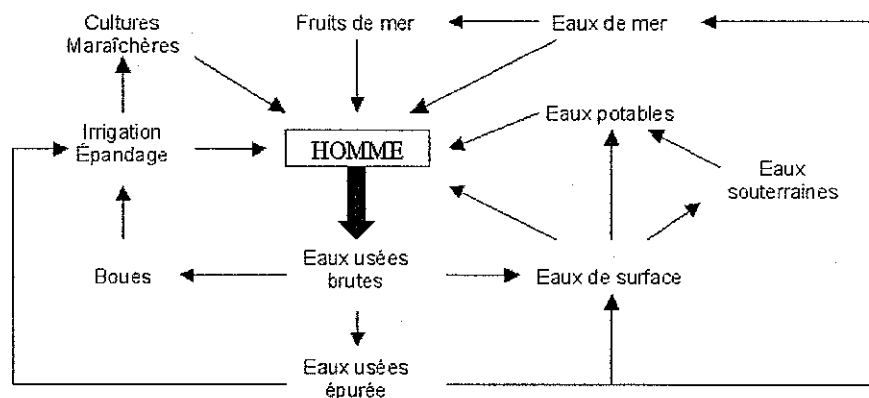
Par ailleurs, cette technique permet un gain de temps important (Reynolds *et al.*, 1996 et 2001). En effet, grâce à une grande sensibilité de la technique de biologie moléculaire, l'ICC-PCR permet de confirmer la présence d'*entérovirus* en 24 heures contre 3 jours ou plus par culture cellulaire simple (Reynolds *et al.*, 1996). De plus, par rapport à une PCR classique, l'ICC-PCR permet d'augmenter le volume de l'échantillon issu de l'environnement et ainsi de diluer les inhibiteurs éventuellement présents.

En conclusion, la technique de biologie moléculaire couplée à la culture cellulaire est un outil d'analyse très intéressant pour la mise en évidence des virus. Sensible et rapide, l'ICC-PCR est particulièrement adaptée à la recherche des virus entériques à partir d'échantillons de l'environnement. Toutefois, malgré ses avantages, cette technique exclut la recherche des virus non cultivables (facteur limitant de la technique de culture cellulaire) tels que les *calicivirus*

1.1.4 Présence dans le milieu hydrique

Les virus éliminés dans les selles se retrouvent dans les eaux usées qui constituent ainsi le premier maillon d'un cycle au centre duquel se trouve l'homme en tant que contaminateur primaire mais également en tant que récepteur final des agents pathogènes véhiculés par l'eau (Figure 6).

Figure 6: Cycle des virus dans le milieu hydrique



Les concentrations virales susceptibles d'être observées dans les eaux usées et ultérieurement dans les eaux de surface, les eaux souterraines, etc... dépendent de nombreux facteurs tels que la dilution, la proportion de personnes infectées dans la population, les techniques de concentration et de détection.

Dans le Tableau 12 sont indiquées les concentrations virales et/ou le pourcentage d'échantillons positifs retrouvés dans différents types d'eau. À la lecture de ce tableau, il apparaît que les densités en virus pathogènes pour l'homme sont très variables pour une même catégorie d'eau. Ainsi, dans

les eaux usées brutes, les concentrations sont les plus importantes et s'établissent entre 10^1 et 10^5 particules virales par litres (67,5 – 100 % d'échantillons positifs par PCR). Cette densité virale des eaux usées est sujette à des variations en fonction de nombreux facteurs, géographiques, socio-économiques, saisonniers mais surtout sanitaires. Ainsi, plus le niveau d'hygiène est faible et plus la proportion d'enfants est grande dans une communauté, plus la quantité de virus retrouvés dans les eaux usées est importante. Dahling *et al.* (1989) ont ainsi constaté que la contamination par les entérovirus est beaucoup plus élevée à Porto-Rico (10^5 UFP/L), région à forte densité de population et à niveau socio-économique bas que dans les autres états des USA.

Concernant l'eau usée traitée, elle contient de 0 à 10^3 particules virales infectieuses par litre (27 – 100% d'échantillons positifs par PCR). La concentration dépend du nombre de particules virales dans les eaux usées brutes, mais également des traitements appliqués. Les eaux de rivière ainsi que les eaux de mer réceptionnent la contamination fécale apportée par des eaux usées brutes ou épurées. Les densités virales y varient de 0 à 10^2 particules virales pathogènes par litre (10 – 100% d'échantillons positifs par PCR). Enfin, l'eau d'alimentation destinée à la consommation humaine peut parfois être contaminée par des virus entériques pathogènes pour l'homme comme l'indiquent les résultats rapportés dans le Tableau 13.

Tableau 12: Densité virale dans le milieu hydrique

Type d'eau	Virus	Concentrations	Positifs (%)	Références
Eaux usées brutes	Entérovirus	$7,4 \cdot 10^4$ UFP/L		Fattal and Nishmi (1977)
	Entérovirus	0 à $3,3 \cdot 10^3$ UFP/L		Martins <i>et al.</i> (1983)
	Entérovirus	$5,7 \cdot 10^4$ UFP/L	80 %	Morris (1984)
	Entérovirus Reovirus	95 NPPUC/L	100 %	Payment <i>et al.</i> (1986)
	Entérovirus Reovirus	267 UFP/L 237 FF/L	100 % 100 %	Bosch <i>et al.</i> (1986)
	Entérovirus	50 à 479 UFP/L	67,5 %	Lewis <i>et al.</i> (1986)
	Entérovirus	32 à 700 UFC/L	100 %	Krikelis <i>et al.</i> (1988)
	Rotavirus	$6,7 \cdot 10^2$ à $9,5 \cdot 10^4$ FF/L	100 %	Bosch <i>et al.</i> (1988)
	Entérovirus	10^2 à $2,42 \cdot 10^5$ UFP/L		Dahling <i>et al.</i> (1989)
	Entérovirus	$2,6 \cdot 10^3$ UFP/L	75 %	Tartera (1989)
	Entérovirus Reovirus	10^2 à 10^4 MPNCU/L	83 % 100 %	Aulicino <i>et al.</i> (1996)
	Entérovirus	3,45 UFP/L	94,7 %	Vilaginès <i>et al.</i> , (1997)
	HAV	Génome	80 %	Divizia <i>et al.</i> (1998)
	Rotavirus	$4,0 \cdot 10^3$ à $8,5 \cdot 10^5$ U/L		Yates et Gerba (1998)
	HAV	Génome	100 %	Espigares <i>et al.</i> (1999)
	Entérovirus, HAV et rotavirus	Génome	41 %	Baggi <i>et al.</i> (2001)
	Entérovirus	Génome	100 %	Schvoerer <i>et al.</i> (2001)
	Entérovirus	Génome	23 %	Schvoerer <i>et al.</i> (2000)
	Poliovirus	Génome	2 %	Tansuphasiri <i>et al.</i> (2000)
Eaux usées traitées	Entérovirus	0,5 à 14 NPPUC/L		Hugues <i>et al.</i> (1985)
	Entérovirus Rotavirus	4 UFP/L 10 FF/L	87 % 75 %	Bosch <i>et al.</i> (1986)
	Adénovirus Entérovirus	50 à 700 UFP/L 120 à 580 UFP/L		Krikelis <i>et al.</i> (1986)
	Entérovirus Adénovirus	1,4 NPPUC/L	79 %	Payment <i>et al.</i> (1986)

	Entérovirus	72 à 457 UFP/L	100 %	Lewis <i>et al.</i> (1986)
	Entérovirus	2 à 5,5.10 ³ UFP/L		Dahling <i>et al.</i> (1989)
	Entérovirus Reovirus	0 à 10 ³ MPNCU/L	75 %	Aulicino <i>et al.</i> (1996)
	Entérovirus	0,14 UFP/L	45 %	Vilaginès <i>et al.</i> (1997)
	Entérovirus	Génome	84 %	Gantzer <i>et al.</i> (1997)
	HAV	Génome	30 %	Divizia <i>et al.</i> (1998)
	HAV	Génome	100 %	Espigares <i>et al.</i> (1999)
	Entérovirus, HAV et rotavirus	Génome	44 %	Baggi <i>et al.</i> (2001)
Eaux de rivière	Entérovirus	15,5 NPPUC/L	68 %	Bosch <i>et al.</i> (1986)
	Entérovirus	14 UFP/L		Schwartzbrod <i>et al.</i> (1987)
	HAV	génome	80 %	Divizia <i>et al.</i> (1989)
	Entérovirus	2 à 56 NPPUC/L	82 %	Walter <i>et al.</i> (1989)
	Entérovirus	Virus infectieux	12 %	Aulicino <i>et al.</i> (1991)
	Entérovirus	Virus infectieux	10 %	Van Olphen <i>et al.</i> (1991)
	Entérovirus	Virus infectieux	50 %	Botero <i>et al.</i> (1992)
	Entérovirus	0,5 à 59 UFP/L	100 %	Hugues <i>et al.</i> (1992)
	Entérovirus Reovirus Adénovirus	0 à 190 UFP/L 0 à 325 UFP/L 0 à 25 UFP/L		Tani <i>et al.</i> (1995)
	Entérovirus	Génome	17,5 %	Gilgen <i>et al.</i> (1995)
	Entérovirus	Génome	32 %	Pommepuy <i>et al.</i> (1995)
	Entérovirus	19,8 UFP/L		Fewtrell <i>et al.</i> (1992)
	Reovirus	3 à 12 NPPUC/L	19 à 52 %	Payment <i>et al.</i> (1988)
	Entérovirus	0 à 2,5 UFP/L	55 %	Lee <i>et al.</i> (1997)
	Entérovirus	Virus infectieux	9 à 39 %	Grabow <i>et al.</i> (1999a)
		Génome	20 à 27 %	
	Entérovirus	0 à 0,5 UFP/L	25 %	Vilaginès <i>et al.</i> (1997)
	Astrovirus Entérovirus Adénovirus 40 Adénovirus 41	Génome	27,5 % 20,6 % 3,4 % 37,9 %	Chapron <i>et al.</i> (2000)
	Entérovirus, HAV et rotavirus	Génome	28 %	Baggi <i>et al.</i> (2001)
	Entérovirus	Génome	2 %	Schvorer <i>et al.</i> (2001)
Eaux de mer	Entérovirus Adénovirus	0,05 à 6,5 NPPUC/L		Hugues <i>et al.</i> (1980)
	Entérovirus	0,05 à 0,14 UFP/L		Schailberger <i>et al.</i> (1982)
	Entérovirus	0,1 à 0,8 UFP/L		Tyler (1982)
	Entérovirus	1 à 85 UFP/L		Fattal <i>et al.</i> (1983)
	Rotavirus	0,007 à 0,03 UFP/L		Rao <i>et al.</i> (1984 et 1986)
	Entérovirus	0,3 à 2,6 UFP/L		
	Entérovirus	5 à 145 UFP/L	87,5 %	Krikelis <i>et al.</i> (1988)
	Entérovirus	0 à 182 UFP/L	43 %	Hugues <i>et al.</i> (1992)
	Entérovirus Reovirus	Virus infectieux	30 %	Patti <i>et al.</i> (1996)
	Reovirus Entérovirus	Génome	100 %	
	Entérovirus	Génome	58 %	Pallin <i>et al.</i> (1997)
	Entérovirus Reovirus	Génome	0 % 11 %	Muscillo <i>et al.</i> (2001)

	<i>Coxsackievirus A9, A16 et poliovirus 1 Sabin</i>	Génome	60 %	Donaldson <i>et al.</i> (2002)
	<i>Entérovirus</i>	Génome	93 %	Lipp <i>et al.</i> (2002)
	<i>Entérovirus</i>	Génome	20 %	Katayama <i>et al.</i> (2002)
	<i>Echovirus</i>	Génome	91 %	Lipp <i>et al.</i> (2001)

NPPUC : Nombre le plus probable d'unités cytopathogènes
FF : Foyer de fluorescence

UFP: Unité Formant Plage
HAV : Virus de l'hépatite A

Tableau 13: Virus isolés dans les eaux utilisées pour l'alimentation humaine

Pays d'isolement	Type de virus isolés	Auteurs
Israël	P1 ; E7	Marzouk <i>et al.</i> (1980)
Canada	P1, 2, 3	Sekla <i>et al.</i> (1980)
États-Unis	CB3	Hejkal <i>et al.</i> (1982)
Grande-Bretagne	P1 2et 3 ; CB3 et 5 ; E7, 11 et 22	Taylor (1982)
Mexique	Rota, Entéro ; CB3, 4, 5, 6	Deetz <i>et al.</i> (1984)
France	P1 ; P3 ; CA ; CB4 ; E11	Festy (1984)
Mexique	Rota, Entéro	Keswick <i>et al.</i> (1984)
Grande-Bretagne	P1	Slade (1984)
Chine	Adéno, CB1, 5	Zhang <i>et al.</i> (1984)
Israël	Entéro	Guttman-bass et Fattal (1985)
Canada	P3, CB5	Payment <i>et al.</i> (1985)
France	Reo	Schwartzbrod <i>et al.</i> (1985a)
Afrique Du Sud	Entéro, Adéno, HAV	Grabow <i>et al.</i> (1999b)
France	Entéro, Rota	Soule <i>et al.</i> (2000)
Corée	P1	Cho <i>et al.</i> (2000)
Corée	Entéro, Adéno	Lee et Kim (2002)
Afrique Du Sud	Entéro, CB	Vivier <i>et al.</i> (2002)

Entéro : *Entérovirus*
CB : *Coxsackie B virus*
Reo : *Reovirus*

CA : *Coxsackie A virus*
Adéno : *Adénovirus*
P : *Poliovirus*

Rota : *Rotavirus*
E : *Echovirus*
HAV : *Virus de l'hépatite A*

1.2 Les bactériophages

1.2.1 Présentation

Le terme de bactériophage, ou plus simplement phage, désigne les virus de bactéries. Comme c'est le cas pour tous les virus, les bactériophages sont incapables de se multiplier de manière autonome. Ils doivent s'intégrer physiquement à un hôte spécifique, dans le cas présent une bactérie-hôte, dont le métabolisme est détourné au profit de leur multiplication intracellulaire. Les bactériophages envahissent donc uniquement et spécifiquement des cellules bactériennes (bactériophage signifie littéralement "qui se nourrit de bactéries"). Ils ont été découverts et décrits pour la première fois en 1915 par Twort puis en 1917 par d'Herelle. Depuis cette époque, environ 5150 phages différents ont été identifiés et observés au microscope électronique. Ces virus des bactéries forment ainsi le plus grand groupe viral (Ackermann, 2001). Le comité international de taxonomie des virus (ICTV) reconnaît actuellement 1 ordre, 13 familles et 30 genres de bactériophages (Van Regenmortel *et al.*, 2000).

La taille des bactériophages varie de quelques dizaines à quelques centaines de nanomètres. La plupart des phages sont pourvus d'une capside (une tête) renfermant le matériel génétique (de l'ADN double brin dans plus de 95 % des cas). Cette capside est un assemblage de sous-unités protéiques appelés capsomères qui forme une structure géométrique parfois complexe. Il existe des capsides à

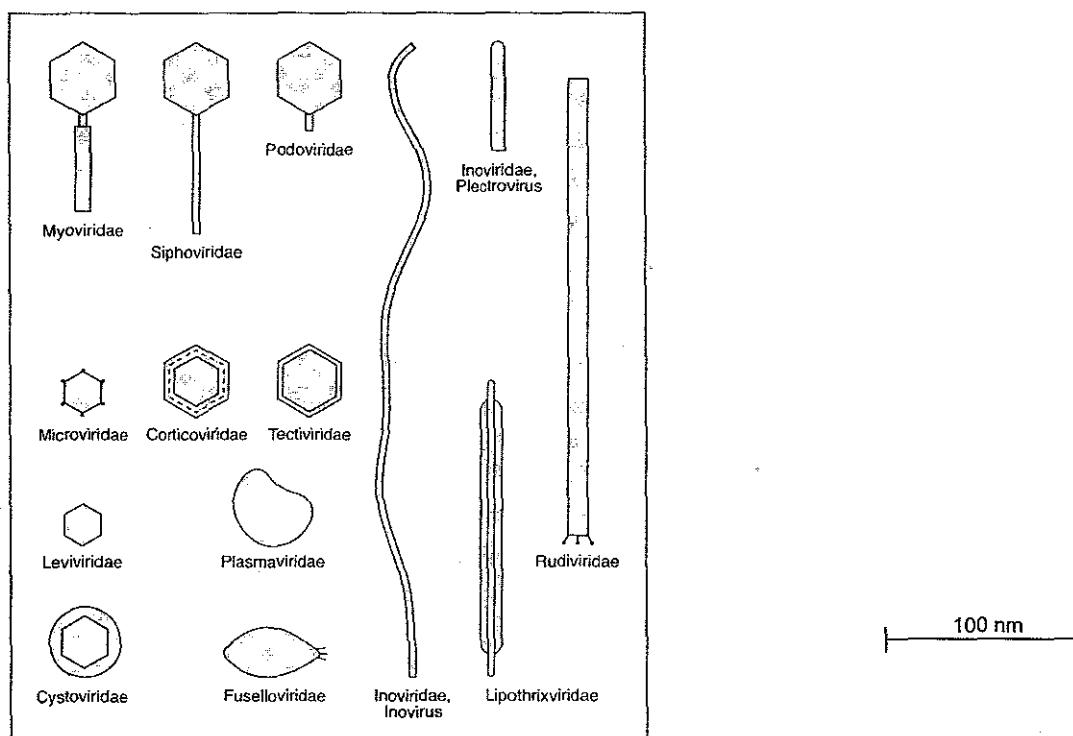
symétrie cubique se présentant souvent sous la forme d'un icosaèdre pouvant parfois devenir presque circulaire et d'autres de symétrie hélicoïdale. Certains virus adoptent une symétrie dite binaire avec une tête de symétrie cubique et une queue de symétrie hélicoïdale. À l'extrémité de cette queue (plus ou moins longue et souple, parfois rétractile) sont placés les sites de reconnaissance des récepteurs de la cellule hôte. Si la présence d'une enveloppe protectrice est fréquente chez les virus des eucaryotes, elle est très rare chez les bactériophages. Seuls les *Plasmaviridae* qui infectent des bactéries du genre *Mycoplasma*, les *Cystoviridae* qui infectent des bactéries du genre *Pseudomonas*, ou encore les *Lipothrixviridae* qui infectent certaines archéobactéries du genre *Thermoproteus* possèdent une enveloppe lipidique.

Les bactériophages, comme les autres virus sont classés principalement en fonction de la nature et de la structure de leur matériel génétique, ainsi que de leur morphologie. Le Tableau 14 présente les principales familles de phages classées selon ces critères. La Figure 7 illustre les morphologies les plus couramment rencontrées. Il est intéressant de noter que les phages nus à ADN bicaténaire et à symétrie binaire et donc pourvus d'une queue, également appelés « phages caudés » sont de loin les plus nombreux puisqu'ils représentent plus de 96 % de l'ensemble des bactériophages connus. Ces phages comprennent les *Myoviridae* (25 %), les *Siphoviridae* (61 %) et les *Podoviridae* (14 %) (Ackermann, 2001).

Tableau 14: Classification et morphologie des bactériophages (adapté d'Ackermann, 2001)

Génomes	Structures	Caractéristiques	Familles	Bactéries hôtes
ADN	Bicaténaire	Phages nus à symétrie binaire	<i>Myoviridae</i>	Entérobactéries
			<i>Siphoviridae</i>	Entérobactéries, mycobactéries, <i>Lactococcus</i>
			<i>Podoviridae</i>	Entérobactéries, <i>Bacillus</i> , <i>Streptococcus</i>
		Phages nus à symétrie cubique	<i>Corticoviridae</i>	<i>Alteromonas</i>
			<i>Tectiviridae</i>	Entérobactéries, <i>Bacillus</i>
		Phages enveloppés	<i>Plasmaviridae</i>	<i>Mycoplasma</i>
			<i>Lipothrixviridae</i>	Archéobactéries
	Monocaténaire	Phages nus à symétrie cubique	<i>Microviridae</i>	Entérobactéries, <i>Bdellovibrio</i> , <i>Chlamydia</i>
		Phages nus à symétrie hélicoïdale	<i>Inoviridae</i>	Entérobactéries
ARN	Monocaténaire	Phages nus à symétrie cubique	<i>Leviviridae</i>	Entérobactéries
	Bicaténaire	Phages enveloppés	<i>Cystoviridae</i>	<i>Pseudomonas</i>

Figure 7: Morphologie des principaux bactériophages (Ackermann, 2001)



Parmi les bactériophages, certains infectent spécifiquement les entérobactéries et se multiplient au niveau du tractus digestif des animaux à sang chaud. À ce jour, pas moins de 850 phages d'entérobactéries ont été isolés (Ackermann, 2001). Ces bactériophages entériques sont excrétés avec les matières fécales et disséminés dans l'environnement. Trois d'entre eux ont été proposés au titre d'indicateur viral de contamination fécale dans le milieu hydrique. Il s'agit des coliphages somatiques, des bactériophages F-spécifiques et des phages de *Bacteroides fragilis* que nous étudierons plus particulièrement.

Les coliphages somatiques constituent un groupe très hétérogène formé de quatre familles : les *Myoviridae*, les *Siphoviridae*, les *Podoviridae* et les *Microviridae*. Ces phages à ADN infectent certaines souches d'*E. coli* par l'intermédiaire de récepteurs spécifiques situés au niveau de la paroi cellulaire.

Les bactériophages F-spécifiques appartiennent aux familles des *Leviviridae* (phages à ARN) et des *Inoviridae* (phages à ADN). Ils infectent certaines bactéries par l'intermédiaire d'un récepteur situé au niveau des pili sexuels ou F-pili. Découverts à l'origine chez *E. coli*, ces F-pili sont synthétisés à partir de gènes situés sur un plasmide dont la dissémination par conjugaison est possible à une grande variété de bactéries gram négatif. Un traitement à la RNase permet de différencier les phages ADN F-spécifiques des phages ARN F-spécifiques. Ce sont ces derniers qui sont les plus abondants dans les selles et dans l'environnement.

Enfin, les phages de *Bacteroides fragilis* constituent le groupe le plus homogène car ils appartiennent tous à la famille des *Siphoviridae*. Leur bactérie hôte, *Bacteroides fragilis* est une bactérie anaérobie stricte. Les phages infectent la cellule par adsorption sur un récepteur situé au niveau de la paroi. Les caractéristiques essentielles des coliphages somatiques, des bactériophages F-spécifiques et des phages de *Bacteroides fragilis* sont résumés dans le Tableau 15.

Tableau 15 : Présentation des bactériophages indicateurs potentiels de contamination fécale (d'après Ackermann, 2001)

Nom	Famille	Groupe	Genres	Membres	Symétrie	Génome (taille en kpb)	Morphologie			Taille	Exemples
Phages de <i>Bacteroides fragilis</i>	<i>Siphoviridae</i>	<i>Caudovirales</i>	6	3010	Binaire	ADN db Linéaire (22-121)	Capside icosahédrique	Queue longue, non contractile		54x105nm	<i>Phage λ</i>
Coliphages somatiques	<i>Myoviridae</i>		6	1245		ADN db Linéaire (39-169)		Queue contractile		65x95nm	<i>Coliphages T2, T4, P1, Mu</i>
	<i>Podoviridae</i>		3	698		ADN db Linéaire (19-44)		Queue courte		47nm	<i>Coliphage T7</i>
	<i>Microviridae</i>		4	40	Cubique	ADN sb Circulaire (4-6)		Pas de queue		27nm	<i>Coliphage ΦX174</i>
Bactériophages F-spécifiques	<i>Leviviridae</i>		2	39		ARN sb Linéaire (3-4)				23nm	<i>Coliphage MS2, Qβ</i>
	<i>Inoviridae</i>		1	42	Hélicoïdale	ADN sb Circulaire (7-9)	Filiforme		760-1950x7nm	<i>Coliphage fd</i>	

1.2.2 Mise en évidence des bactériophages entériques

Différentes techniques permettent la mise en évidence des bactériophages.

La microscopie électronique a été et reste un outil de choix pour la recherche qualitative des phages. Ainsi, Muniesa *et al.* (1999) déterminent par microscopie électronique la morphologie des coliphages (cubique, hélicoïdale ou binaire) isolés à partir d'eaux usées ou d'eaux de surface. Cette identification leur permet de comparer la survie des différentes familles de coliphages dans l'environnement en fonction de leur morphologie.

La quantification d'une suspension phagique purifiée pourrait également être réalisée par des techniques de marquage. L'utilisation de fluorochromes marqueurs du matériel génétique comme le DAPI, le SYBR Green I ou le YOPRO-1 permet une quantification de tous les virus sans distinction soit par microscopie (Bettarel *et al.*, 2000), soit par cytométrie de flux (Marie *et al.*, 1999 ; Brussaard *et al.*, 2000). L'inconvénient majeur des techniques de marquage est qu'elles souffrent d'une absence totale de spécificité. Ceci rend impossible leur utilisation pour des échantillons de l'environnement. De plus, en ajoutant des DNase ou des RNase, Bettarel *et al.* (2000) constatent qu'au moins 15% du nombre de particules virales comptées par microscopie à épifluorescence serait en fait de l'ADN ou de l'ARN libre.

La biologie moléculaire a également été utilisée pour la mise en évidence spécifique des phages de *Bacteroides fragilis* HSP40. Ainsi, l'hybridation moléculaire par Southern blot (Puig *et al.*, 2000a) et l'amplification par PCR (Puig *et al.*, 2000b) ont été proposées. Stanek et Falkinham (2001) proposent une méthode de détection des coliphages somatiques basée sur la mise en évidence de la β -galactosidase par colorimétrie en microplaques 96 puits. Celle-ci est libérée par *E. coli* suite à la lyse bactérienne induite par l'infection phagique. La technique est sensible (le seuil de détection est de 5 phages dans 200 μ L soit 1 phage/mL) et rapide (environ 3 heures). L'inconvénient majeur réside dans le fait que l'échantillon doit être exempt de détergents ou tout autre produit pouvant perméabiliser la membrane bactérienne et provoquer ainsi la libération de la β -galactosidase, induisant l'interprétation de faux positifs.

Récemment une technique originale de détection des bactériophages a été décrite. Elle consiste à « écouter » leur détachement d'une surface (Dultsev *et al.*, 2001 ; Cooper *et al.*, 2001). Le principe se fonde sur l'émission acoustique produit lors de la rupture des liens entre les protéines de la capside du phage et les ligands d'un cristal de quartz soumis à oscillation. Cette méthode quantitative permet de dénombrer entre 20 et 10^5 phages. À l'heure actuelle, cette méthode ne permet toutefois pas de dénombrer les bactériophages de l'environnement.

En fait, la méthode de mise en évidence classiquement utilisée est la méthode des plages de lyse. Elle consiste à mettre en contact l'échantillon à analyser avec une suspension de bactéries réceptrices (sensibles aux bactériophages recherchés) en phase exponentielle de croissance. Le mélange est placé dans une gélose molle en surfusion. L'ensemble est coulé en boîte de pétri puis

incubé à la température optimale de croissance bactérienne. Chaque bactériophage viable présent dans le milieu infecte et détruit une bactérie. La libération de nouveaux virus entraîne l'infection des bactéries voisines. Progressivement, il se produit une destruction locale du tapis bactérien dont la conséquence au niveau macroscopique est l'apparition d'une zone claire sur un fond de croissance bactérienne uniforme. Cette zone de lyse ou destruction bactérienne est appelée plaque et correspond à la présence initiale d'une particule ou d'un agrégat de particules virales infectieuses. Le dénombrement des plaques permet la détermination du titre viral. Cette technique permet la mise en évidence des coliphages en 6 heures (Wentsel *et al.*, 1982). Cependant, de nombreux paramètres peuvent influencer le dénombrement des bactériophages tels que la nature de la souche hôte, le milieu de culture, l'utilisation de la technique de la simple ou de la double couche et il est essentiel de connaître tous ces paramètres pour pouvoir comparer des résultats (Havelaar et Hogeboom, 1983).

De nombreuses souches bactériennes ont été utilisées pour mettre en évidence les bactériophages entériques (Tableau 16). Or la sensibilité de ces différentes souches est très variable. Ainsi, pour la détection des coliphages somatiques il apparaît que la souche *E. coli* C est la plus sensible (Ignazzitto *et al.*, 1980). Cette souche *E. coli* C et sa forme résistante à l'acide nalidixique, la souche CN-13, donnent des résultats similaires pour la mise en évidence des coliphages somatiques lors d'analyses d'eaux de surface (Sobsey *et al.*, 1995). De la même manière, la souche *E. coli* C603 résistante à la streptomycine donne des résultats comparables à la souche *E. coli* C (Grabow *et al.*, 1984).

Tableau 16 : Quelques souches bactériennes utilisées pour la mise en évidence des bactériophages

Bactériophages	Nom	ATCC	Remarques
Coliphages somatiques	<i>E. coli</i> C	13706	
	<i>E. coli</i> CN-13	700609	Dérive de la souche <i>E. coli</i> C résistant à l'acide nalidixique
	<i>E. coli</i> C603	?	Dérive de la souche <i>E. coli</i> C. Résistant à la streptomycine
	<i>E. coli</i> WG5	700078	Dérive de la souche <i>E. coli</i> C. Résistant à l'acide nalidixique
	<i>E. coli</i> W3110	27325	Dérive de la souche <i>E. coli</i> K-12
	<i>E. coli</i> B	15144	
	<i>E. coli</i> C3000	15597	Dérive de la souche <i>E. coli</i> K-12
	<i>E. coli</i> 036	?	
	<i>E. coli</i> K13	15766	Dérive de la souche <i>E. coli</i> K-12
Coliphages somatiques et bactériophages F-spécifiques	<i>E. coli</i> C600	?	
	<i>E. coli</i> C3000	15597	Dérive de la souche <i>E. coli</i> K-12
bactériophages F-spécifiques	<i>E. coli</i> K12	29425	
	<i>E. coli</i> K12Hfr	15669	Mutant Hfr de la souche <i>E. coli</i> K-12
	<i>S. typhimurium</i> WG49	700730	Salmonelle modifiée produisant des pili sexuels grâce à un plasmide provenant d' <i>E. coli</i>
Phages de <i>Bacteroides fragilis</i>	<i>E. coli</i> HS	700891	Autre désignation : HS(pFamp)R
	<i>B. fragilis</i> HSP40	51477	Sensible aux phages spécifiquement humains
	<i>B. fragilis</i> RYC 2056	700786	Sensible aux phages d'origine humaine et animale
	<i>B. fragilis</i> VPI3625	?	

Pour la mise en évidence des phages F-spécifiques, plusieurs souches bactériennes ont été proposées. Initialement, ce sont des souches d'*E. coli* produisant « naturellement » des pili sexuels nécessaires à l'infection de la cellule bactérienne par les bactériophages F-spécifiques qui ont été

utilisées. Ces souches présentent des différences de sensibilité et il a ainsi été rapporté que la souche *E. coli* F-amp présente une sensibilité accrue aux phages ADN-F spécifiques par rapport aux phages ARN-F spécifiques tandis que la souche *E. coli* C3000 permet la mise en évidence aussi bien des bactériophages F-spécifiques que des coliphages somatiques (Sobsey *et al.*, 1995).

Pour pallier à ces inconvénients, une nouvelle souche bactérienne a été proposée. Il s'agit non plus d'une souche d'*E. coli*, mais d'une souche de *Salmonella typhimurium* transformée. Portant le nom de *Salmonella typhimurium* WG49, cette souche a été modifiée par l'introduction d'un plasmide d'*E. coli* contenant les gènes responsables de la synthèse des pili sexuels et rendant de ce fait la bactérie sensible aux bactériophages F-spécifiques. Elle présente l'avantage par rapport aux souches d'*E. coli* de mettre en évidence des bactériophages F-spécifiques à partir d'échantillons de l'environnement sans interférence possible avec la présence de coliphages somatiques souvent plus nombreux. Ainsi, Grabow *et al.* (1995) analysant 108 selles détectent des phages F-spécifiques dans 57 % des cas avec la souche *E. coli* HS contre 29 % avec la souche *S. typhi* WG49. Ces résultats confirment une nette différence de sensibilité des deux souches hôtes que les auteurs expliquent par le fait qu'avec la souche *E. coli* HS il est aussi mis en évidence certains coliphages somatiques alors qu'avec la souche *S. typhi* WG49, seuls les bactériophages F-spécifiques sont isolés. Notons que Debartolomeis et Cabelli (1991) avaient pourtant montré que plus de 95 % des phages qui infectent la souche *E. coli* HS sont des bactériophages F-spécifiques, ce qui, si tel est le cas, ne permet pas d'expliquer la différence constatée par Grabow *et al.* (1995).

Toutefois, si la souche *S. typhi* WG49 est insensible aux coliphages somatiques, elle reste néanmoins vulnérable aux phages de Salmonelles. Aussi, Sobsey *et al.* (1995) constatent le manque de spécificité de la souche de *S. typhimurium* WG49 dans la mesure où plus d'un quart des plages de lyses détectées à l'aide de cette souche à partir d'eaux de surface se sont avérées être dues à des phages de *Salmonella*. La même interférence a été observée par Ricca et Cooney (1999) à partir d'échantillons d'eaux de mer. Enfin, Beaudeau et Bertin (1999) considèrent que le maintien des qualités physiologiques de *S. typhimurium* WG49 est délicat et estiment que cela pourrait expliquer l'extrême hétérogénéité des données concernant ces phages rapportées dans la littérature. En 2002, Kirsten *et al.* assurent pourtant que les résultats sont fiables avec cette souche WG49 à condition que celle-ci soit de « bonne qualité ».

Dans le cadre de la recherche des phages de *Bacteroides fragilis*, deux souches de *Bacteroides fragilis* sont en général utilisées. Il s'agit des souches HSP40 et RYC 2056. La souche HSP40 présente l'énorme avantage de ne mettre en évidence que des bactériophages spécifiquement d'origine humaine (Tartera *et al.*, 1989 ; Grabow *et al.*, 1995 ; Puig *et al.*, 1997 ; Puig *et al.*, 1999). Cependant les quantités de bactériophages détectés en utilisant cette bactérie hôte sont faibles et surtout très variables selon l'origine des échantillons. Ainsi, des résultats indiquent l'absence de phages infectant la souche HSP40 dans certains pays (Gantzer *et al.*, 1998a ; Araujo *et al.*, 2001). Ceci limite largement son utilisation. C'est pourquoi Araujo *et al.* (2001) préconisent l'utilisation de la souche RYC 2056 qui permet non seulement de détecter plus de phages, mais également d'en détecter à partir d'échantillons provenant de n'importe quel pays. Malheureusement, cette souche bactérienne n'est pas spécifique des phages d'origine humaine et de ce fait, met en évidence

indifféremment des phages d'origine humaine et animale.

Lors de la recherche des bactériophages, outre la souche bactérienne hôte utilisée, des différences dans la méthodologie existent également. Ainsi, Wentsel *et al.* (1982) préconisent d'incuber les coliphages avec la souche hôte pendant 2 heures avant de les couler sur boîte de pétri, alors que classiquement les boîtes sont coulées immédiatement après la réalisation du mélange. Green *et al.* (2000a) déconseillent l'utilisation directe d'une souche bactérienne ayant subi préalablement une congélation/décongélation. Ils recommandent de réaliser dans un premier temps une préculture (12 heures) de la souche avant de l'utiliser pour la quantification des phages. Cornax *et al.* (1990) confirment que la technique classique des plages de lyse est plus intéressante pour le dénombrement des bactériophages de *Bacteroides fragilis* que celle qui consiste à utiliser des dilutions successives et la détermination du nombre le plus probable (npp). Cette dernière méthode est moins adaptée puisqu'elle sous-estime 17 fois sur 24 le nombre de phages par rapport à la méthode classique de dénombrement des plages de lyse.

Enfin, un autre paramètre important est susceptible d'influencer les résultats. Il s'agit de l'utilisation soit de la technique dite de la simple couche, soit de la technique dite de la double couche. Dans le cas de la simple couche, le mélange constitué de la suspension bactérienne, de l'échantillon et de la gélose nutritive en surfusion est coulé directement dans une boîte de pétri. Dans le cas de la double couche, ce mélange est coulé dans une boîte de pétri contenant déjà une couche de gélose nutritive à l'état solide. L'inconvénient de cette dernière technique par rapport à la première dite de simple couche réside essentiellement dans la contrainte supplémentaire, tant au niveau du matériel que du temps, qu'occasionne la préparation préalable des boîtes. L'avantage serait que cette technique est plus sensible et permettrait donc le dénombrement d'un plus grand nombre de phages. Mais ce fait n'est pas admis par tous. Ainsi, pour Havelaar et Hogeboom (1983) la technique de la simple couche donne de meilleurs résultats que la technique de la double couche lors de la recherche des coliphages somatiques dans les eaux usées. Mais une étude plus récente montre l'inverse, toujours pour la recherche des coliphages somatiques dans l'eau usée (Mooijman *et al.*, 2001). Le Tableau 17 présente les résultats contradictoires de ces deux études. À noter que les travaux de Mooijman *et al.* (2001) ne montrent pas de différence entre les deux techniques lorsqu'il s'agit de dénombrer une suspension phagique de référence (PhiX174). Les protocoles sont différents d'une étude à l'autre. Outre les souches hôtes, des différences au niveau des concentrations en sels varient. Ainsi, la concentration en Na₂CO₃ dans la gélose est de 0,70g/L dans le protocole de Havelaar et Hogeboom (1983) contre 0,75 g/L dans le protocole de Mooijman *et al.* (2001). Il est impossible de déterminer si ces différences sont la cause des observations contradictoires, mais cela permet de souligner que la diversité des protocoles limite sérieusement les comparaisons de résultats.

Tableau 17 : Sensibilité relative pour la recherche des coliphages somatiques dans l'eau usée en fonction de la technique utilisée

	Pourcentage d'échantillons positifs	
	Souche <i>E. coli</i> CN (n=20) (Havelaar et Hogeboom, 1983)	Souche <i>E. coli</i> WG5 (Mooijman <i>et al.</i> , 2001)
Double couche	55 %	100% (n=4)
Simple couche	100 %	43,3 - 56% (n=20)

Pour la mise en évidence particulière des phages de *Bacteroides fragilis*, l'utilisation d'une troisième couche a également été préconisée (Puig *et al.*, 1998). Cette dernière couche gélosée contient une enzyme (oxydase) qui permet d'obtenir des conditions anaérobies sans l'utilisation d'un conditionnement spécifique. Cette technique, d'après les auteurs serait plus sensible que celle de la double couche puisqu'à partir du même échantillon et de la même souche bactérienne un plus grand nombre de phages a pu être isolé.

Il apparaît donc clairement que plusieurs paramètres sont susceptibles d'influencer les résultats de la détection et de la quantification des bactériophages par la méthode classique des plaques. De ce fait, et devant la multiplicité des protocoles certains auteurs ont considéré qu'il était impossible de comparer les résultats des différentes études (Leclerc *et al.*, 2000). C'est également la raison pour laquelle depuis plusieurs années d'importants travaux de standardisation des méthodes ont été mis en œuvre. Ceux-ci ont abouti à l'établissement de normes ISO qui seront détaillés dans le chapitre « matériel et méthodes ». Il s'agit des normes ISO/FDIS 10705-2 (1999), ISO/FDIS 10705-1 (1997) et ISO/FDIS 10705-4 (1999) pour la quantification des coliphages somatiques, des bactériophages F-spécifiques et des phages de *Bacteroides fragilis* respectivement.

Grâce à ces normes, les résultats obtenus dorénavant lors de la détection et la quantification des bactériophages à partir d'échantillons d'eaux de l'environnement seront parfaitement fiables et surtout, ils pourront être confrontés et comparés les uns aux autres.

1.2.3 Densité dans le milieu hydrique

Les concentrations en bactériophages varient selon le type d'eau dans lequel ils sont recherchés. Le Tableau 18 donne quelques valeurs de ces concentrations en bactériophages en fonction de la nature de l'eau analysée. Dans les eaux usées brutes les coliphages somatiques sont les plus nombreux et leur concentration peut atteindre 10^7 ufp/100mL. Suivent les bactériophages F-spécifiques dont la concentration atteint 10^6 ufp/100mL. Les phages de *Bacteroides fragilis* sont les moins représentés avec des concentrations maximales de 10^4 ufp/100mL. Cette hiérarchie semble respectée dans les eaux épurées et les eaux de surface même si des variations importantes existent. Ainsi, après épuration, les concentrations en bactériophages entériques infectieux dépendent du niveau de contamination de l'eau usée brute et du type de traitement. En moyenne les concentrations se situent entre 10^3 et 10^4 ufp/100mL pour les coliphages somatiques. Elles sont beaucoup moins importantes pour les bactériophages F-spécifiques et les phages de *Bacteroides fragilis* puisque les concentrations de ces derniers s'établissent entre quelques unités et 10^2 ufp/100mL. Enfin, les densités phagiques dans les eaux superficielles (fleuves, rivières, mers) sont en général beaucoup moins élevées et très variables comme l'indiquent les valeurs rassemblées dans le Tableau 18.

Tableau 18 : Concentrations des différents bactériophages dans le milieu hydrique

Type d'eau	Bactériophages (souche réceptrice)	n	Concentrations en ufp/100mL (% d'échantillons positifs)	Références
Eaux usées brutes	Coliphages somatiques (CN13)	28	$5,3.10^5 - 7,0.10^5$	Lasobras et al. (1999)
	Coliphages somatiques (<i>E. coli</i> 036)	32	$6,3.10^4 - 1,0.10^5$	Baggi et al. (2001)
	Coliphages somatiques (<i>E. coli</i> C)	10	$5,2.10^5 - 1,4.10^7$	Cornax et al. (1991)
	Coliphages somatiques (<i>E. coli</i> WG5)	9	$1,2.10^5 - 2,8.10^5$	Skraber et al. (2002)
	Phages F-spécifiques (<i>E. coli</i> Hfr)	32	$5,0.10^3 - 1,0.10^5$	Baggi et al. (2001)
	Phages F-spécifiques (WG49)	32	$1,0.10^4 - 2,5.10^4$	
	Phages F-spécifiques (<i>E. coli</i> HS)	28	$8,1.10^4 - 2,1.10^5$	Lasobras et al. (1999)
	Phages F-spécifiques (WG49)	24	$2,5.10^5$ (100%)	Vilaginès et al. (1997)
	Phages F-spécifiques (WG49)	9	$7,2.10^4 - 2,5.10^5$	Skraber et al. (2002)
	Phages F-spécifiques (WG49)	21	$4,7.10^5 - 7,8.10^5$	Chung et al. (1998)
	Phages F-spécifiques (Famp)	21	$1,9.10^5 - 4,8.10^5$	
	Phages F-spécifiques (WG49)	8	$4,2.10^5 - 3,1.10^5$	Cornax et al. (1991)
	Phages de <i>Bacteroides f.</i> (HSP40)	10	$1,0.10^3 - 2,6.10^3$	
	Phages de <i>Bacteroides f.</i> (HSP40)	28	$2,7.10^3 - 2,9.10^3$	Lasobras et al. (1999)
	Phages de <i>Bacteroides f.</i> (RYC 2056)	9	$1,0.10^4 - 6,7.10^4$	Skraber et al. (2002)
	Phages de <i>Bacteroides f.</i> (VPI3625)	21	$<100 - 7,8.10^4$	Chung et al. (1998)
Eau usée épurée	Coliphages somatiques (<i>E. coli</i> WG5)	9	$4,0.10^3 - 2,0.10^4$	Skraber et al. (2002)
	Coliphages somatiques (<i>E. coli</i> 036)	32	$10^4 - 10^5$	Baggi et al. (2001)
	Phages F-spécifiques (WG49)	24	$5,4.10^3$ (100%)	Vilaginès et al. (1997)
	Phages F-spécifiques (WG49)	9	$1,6.10^2 - 1,9.10^4$	Skraber et al. (2002)
	Phages F-spécifiques (WG49)	21	$<100 - 2,5.10^5$	Chung et al. (1998)
	Phages F-spécifiques (Famp)	21	$<100 - 1,9.10^5$	
	Phages F-spécifiques (<i>E. coli</i> Hfr)	32	$1,2.10^3 - 10^5$	Baggi et al. (2001)
	Phages F-spécifiques (WG49)	32	$1 - 1,6.10^3$	
	Phages de <i>Bacteroides f.</i> (HSP40)	16	$0,7 - 1,7.10^2$	Gantzer et al. (1998b)
	Phages de <i>Bacteroides f.</i> (RYC 2056)	9	$21 - 1,6.10^2$	Skraber et al. (2002)
	Phages de <i>Bacteroides f.</i> (VPI3625)	21	$<100 - 3.10^3$	Chung et al. (1998)
Eau de rivière	Coliphages somatiques (<i>E. coli</i> 036)	35	$79 - 10^3$ (21-33%)	Baggi et al. (2001)
	Coliphages somatiques (<i>E. coli</i> C)	6	$20 - 2.10^2$	Rajala et Tanski (1998)
	Coliphages somatiques (<i>E. coli</i> CN13)	68	$20 - 2.10^4$ (35-100%)	Jofre et al. (1995)
	Coliphages somatiques (<i>E. coli</i> WG5)	96	$8,3.10^2 - 3,8.10^3$ (100%)	Skraber et al. (2002)
	Phages F-spécifiques (<i>E. coli</i> Hfr)	35	$31 - 10^3$ (21-22%)	Baggi et al. (2001)
	Phages F-spécifiques (WG49)	35	$2 - 4$ (22-35%)	
	Phages F-spécifiques (WG49)	11	$1 - 10^2$	Lee et al. (1997)
	Phages F-spécifiques (WG49)	24	$4,6.10^2$ (92%)	Vilaginès et al. (1997)
	Phages F-spécifiques (WG49)	96	$72 - 5,7.10^2$ (92%)	Skraber et al. (2002)
	Phages de <i>Bacteroides f.</i> (HSP40)	48	$7,0 - 2,0.10^3$	Lucena et al. (1996)
	Phages de <i>Bacteroides f.</i> (HSP40)	68	$10 - 1,2.10^2$ (36-100%)	Jofre et al. (1995)
Eau de mer	Phages de <i>Bacteroides f.</i> (RYC 2056)	96	(58%)	Skraber et al. (2002)
	Coliphages somatiques (<i>E. coli</i> C)	108	$2,0.10^2$ (99%)	Ricca et Cooney (1999)
	Coliphages somatiques (<i>E. coli</i> C603)	7	$9 - 6,2.10^2$ (100 %)	O'Keefe et Green (1989)
	Coliphages somatiques (<i>E. coli</i> C603)	7	$2 - 2,1.10^2$ (100 %)	
	Coliphages somatiques (<i>E. coli</i> C603)	7	$0 - 10$ (86 %)	
	Coliphages somatiques (<i>E. coli</i> C)	9	$2,0.10^2 - 1,9.10^5$	Cornax et al. (1991)
	Phages F-spécifiques (WG49)	9	$49 - 2,2.10^4$	
	Phages F-spécifiques (WG49)	108	20 (67%)	Ricca et Cooney (1999)
	Phages de <i>Bacteroides f.</i> (HSP40)	48	$<10 - 1,8.10^3$	Cornax et al. (1991)
Eaux souterraines	Coliphages somatiques (<i>E. coli</i> C)	15	$<2 - 93$ (33 %)	Lucena et al. (1996)
	Phages de <i>Bacteroides f.</i> (HSP40)	15	$<2 - 24$ (40%)	

2 Évaluation du risque viral

La recherche systématique de l'ensemble des virus entériques pathogènes pour l'homme qui peuvent être présents dans une eau n'est possible ni techniquement, ni économiquement. Cependant, ces virus étant d'origine fécale, ils sont rejetés dans l'environnement hydrique en même temps que d'autres microorganismes fécaux. Parmi ceux-ci, certains ont été considérés comme représentatifs d'une contamination fécale. Il s'agit des germes tests de contamination fécale encore appelés *indicateurs*.

Dans ce contexte, pour évaluer la contamination virale d'un échantillon de l'environnement, l'indicateur idéal devrait être (Armon et Kott, 1996) :

- non pathogène
- toujours présent lorsque les virus pathogènes sont présents,
- plus abondant que les virus pathogènes,
- plus résistant aux traitements de désinfection et aux conditions environnementales que les virus pathogènes,
- facilement et rapidement quantifiable à faible coût,
- identifiable sans ambiguïté dans tous les types d'échantillons,
- distribué de manière aléatoire dans l'échantillon à analyser,
- ne pas se multiplier dans l'environnement,

Il semble important de préciser d'emblée qu'un indicateur n'est en aucun cas le reflet du comportement d'un pathogène. En d'autres termes, il est impossible d'établir un rapport entre les concentrations en indicateur et les concentrations en pathogène pour un même type d'eau. Lopez-Pila et Szewzyk (2000) expliquent que cette impossibilité réside dans le fait que les distributions des concentrations en indicateurs ou en pathogènes déjà très inégales à la source sont sujettes à d'importantes fluctuations dues à des facteurs environnementaux.

De nombreux indicateurs potentiels ont fait l'objet d'études spécifiques. Parmi eux, nous citerons les indicateurs bactériens, les indicateurs phagiques, certains virus pathogènes (ce qui déroge à la première règle de l'indicateur idéal) et le génome viral.

2.1 Les indicateurs bactériens

Les indicateurs actuellement utilisés pour évaluer les risques sanitaires liés à l'utilisation d'une eau sont de nature bactérienne. Les principales bactéries indicatrices de pollution fécale — coliformes totaux et thermotolérants, *Escherichia coli*, streptocoques fécaux et spores de *clostridium* sulfito-réductrices — sont brièvement décrits ci-après (OMS, 1994).

Coliformes (coliformes totaux)

Le terme « coliforme » désigne des bactéries gram négatif en forme de bâtonnets capables de se développer en présence de sels biliaires, et de fermenter en 24 à 48 heures le lactose à 35-37°C avec production d'acide, de gaz et d'aldéhyde. Les coliformes sont également oxydase-négatifs et ne sporulent pas.

Les coliformes totaux appartiennent aux genres *Escherichia*, *Citrobacter*, *Enterobacter* et *Klebsiella*. Mais d'autres bactéries provoquant la fermentation du lactose comme *Enterobacter cloacae* et *Citrobacter freundii* ainsi que d'autres espèces qui ne se rencontrent qu'exceptionnellement dans les fèces, tel que *Serratia fonticule*, *Rahnella aquatilis* et *Buttiauxella agrestis* font également partie des « coliformes totaux » (OMS, 1994). Le fait qu'il existe dans ce groupe des bactéries non fécales limite sérieusement leur utilisation en tant qu'indicateurs de pollution fécale.

Coliformes thermotolérants

Ce terme désigne un groupe de coliformes capables de provoquer la fermentation du lactose à 44°C (d'où le nom de thermotolérant). Ils comprennent le genre *Escherichia* et, dans une moindre mesure, certaines espèces de *Klebsiella*, *Enterobacter* et *Citrobacter*. Certains coliformes thermotolérants se retrouvent dans les selles, mais peuvent également être présents dans des eaux enrichies en matières organiques (effluents industriels) ou en produit de décomposition des plantes. C'est la raison pour laquelle le terme de coliformes fécaux, souvent utilisé pour les dénommer, est incorrect et devrait être abandonné (OMS, 1994).

Dans la plupart des cas, les concentrations en coliformes thermotolérants sont directement liées à celles d'*E. coli*. Par conséquent, leur utilisation comme indicateurs de la qualité de l'eau est considérée comme acceptable pour les évaluations de routine. Lors de l'interprétation des données, il faut cependant toujours avoir à l'esprit que ces organismes sont relativement peu spécifiques. Dans ces conditions, si l'on constate lors d'une analyse de routine la présence d'un nombre élevé de coliformes thermotolérants en l'absence à priori de tous risques sanitaires, il conviendra de rechercher la présence spécifique d'*E. coli*.

Escherichia coli

Escherichia coli est un membre de la famille des Entérobactériacées qui se caractérise par la possession de deux enzymes, la β -galactosidase et la β -glucuronidase. Il se développe à 44°C sur des milieux complexes, provoque la fermentation du lactose et du mannitol avec formation d'acide et de gaz et produit de l'indole à partir du tryptophane. *E. coli* est normalement abondant dans les fèces humaines et animales où il peut atteindre des concentrations de 10^9 par gramme. Il est également retrouvé dans les eaux d'égout, les effluents traités, ainsi que dans toutes les eaux naturelles et les sols qui ont subi une contamination fécale récente que celle-ci soit due à l'homme, à l'activité agricole ou à la faune sauvage.

Streptocoques fécaux

Le terme "streptocoques fécaux" désigne les streptocoques généralement présents dans les fèces de l'homme et des animaux. Tous possèdent l'antigène du groupe D de Lancefield. Ainsi, le genre *Streptococcus* appartient aux streptocoques fécaux et rassemble essentiellement *S. bovis* et *S.*

equinus. Ces bactéries sont retrouvées principalement dans les excréments d'animaux. Elles se multiplient rarement dans l'eau polluée et leur persistance dans l'environnement n'est pas supérieure à celle d'*E. coli* et des coliformes.

Parmi les streptocoques fécaux, il y a également les entérocoques (genre *Enterococcus*) qui se caractérisent par une large tolérance à des conditions de croissance défavorables, notamment les espèces *E. avium*, *E. casseliflavus*, *E. cecorum*, *E. aurons*, *E. faecalis*, *E. faecium*, *E. gallinarum*, *E. hirae*, *E. malodoratus*, *E. mundtii* et *E. solitarius*. La plupart de ces espèces sont d'origine fécale (humaine ou animale) et peuvent généralement être considérées comme des indicateurs spécifiques d'une pollution fécale. Cependant, certaines espèces et sous-espèces, comme *E. casseliflavus*, *E. faecalis*, *E. malodoratus* et *E. solitarius* se rencontrent chez les végétaux (OMS, 1994).

Certaines études ont montré que les streptocoques fécaux sont plus résistants que les coliformes aux traitements d'épuration (Metcalf, 1978 ; Lasobras *et al.*, 1999). De plus, les streptocoques sont très résistants à la dessiccation et peuvent être utiles pour les contrôles de routine en cas de pose de nouvelles canalisations, lorsque des réparations ont été effectuées sur le réseau de distribution, ou encore pour détecter une pollution des eaux souterraines ou des eaux de surface par les eaux de ruissellement (OMS, 1994).

Spores de Clostridium sulfito-réducteurs

Les *Clostridium* sulfito-réducteurs sont des microorganismes anaérobies sporogènes, dont le plus caractéristique, *Clostridium perfringens*, est normalement présent dans les fèces, mais en nombre beaucoup plus faible que *E. coli*. Toutefois, ils ne sont pas d'origine exclusivement fécale et leur présence dans l'environnement peut avoir d'autres origines. Les spores de *clostridium* peuvent survivre dans l'eau beaucoup plus longtemps que les coliformes, *E. coli* ou les streptocoques et leur résistance aux oxydants est très importante. En raison de leur longue durée de survie, ils sont surtout capables d'indiquer une contamination ancienne ou à distance. Ils présentent donc un intérêt dans certains cas particuliers, mais ne sont pas recommandés pour la surveillance de routine, notamment des réseaux de distribution.

Dans l'état actuel des choses, les normes de qualité microbiologiques des eaux sont fondées sur la présence ou l'absence de ces différents germes tests. Il est recommandé de choisir *E. coli* comme indicateur préférentiel lorsque l'on dispose de ressources limitées pour l'analyse microbiologique (OMS, 1994).

De nombreuses études épidémiologiques ont montré que la mauvaise qualité bactériologique d'une eau entraîne généralement des troubles digestifs chez le consommateur (Fogarty *et al.*, 1985 ; Zmirou *et al.*, 1987 ; Zmirou *et al.*, 1995 ; Van Asperen *et al.*, 1998 ; Deshayes *et al.*, 2001).

Dans les résultats qui sont présentés ci-après à titre d'exemple, les études épidémiologiques sont basées sur la présence de symptômes d'infection intestinale chez des personnes ayant été exposées à des risques sanitaires liés aux eaux, mais l'étiologie n'est pas déterminée.

Ainsi, en 1998(a), Medema *et al.* ont procédé à une étude épidémiologique dans le but de déterminer s'il existe une relation entre la qualité microbiologique d'une eau et le risque d'infection intestinale.

Les résultats de cette étude ont montré que le risque d'infection intestinale est corrélé avec les concentrations en coliformes thermotolérants et les concentrations en *E. coli*. Dans un travail de synthèse, Prüss (1998) a analysé 22 études concernant les eaux récréatives et elle montre que dans 19 études sur 22, le risque sanitaire augmente lorsque les concentrations en bactéries indicatrices de contamination fécale augmentent. Les indicateurs les mieux corrélés avec le risque de troubles intestinaux sont les streptocoques fécaux dans l'eau de mer et les streptocoques fécaux et *E. coli* dans l'eau douce. En fait, le risque sanitaire existe pour des valeurs de concentration en indicateurs de quelques unités dans 100 mL d'eau.

De leur côté, Lopez-Pila et Szewzyk (2000) proposent à partir d'une étude bibliographique, un modèle mathématique d'évaluation du risque lié à la présence de *rotavirus* et fondé sur les concentrations en *E. coli* dans les eaux récréatives. Ce modèle prend en compte les concentrations en indicateurs, la dose minimale infectante des *rotavirus* et le volume d'eau ingéré. La faiblesse du modèle, d'après ses auteurs, réside dans le fait que les connaissances en matière d'épidémiologie sont encore insuffisantes.

Quoi qu'il en soit, s'il a été largement démontré que la présence de bactéries indicatrices traduisent un risque de contamination pour l'homme, l'absence de bactéries indicatrices de contamination fécale dans une eau ne signifie pas pour autant l'absence de virus pathogènes. Ces derniers, parfois plus résistants peuvent en effet persister plus longtemps dans l'environnement (Schwartzbrod *et al.*, 1985a ; Havelaar 1993 ; Keswick *et al.*, 1984 ; Payment *et al.*, 1985 ; Lucena *et al.*, 1996 ; Stetler *et al.*, 1983 ; Bosch, 1998 ; Lasobras *et al.*, 1999 ; Wait et Sobsey, 2001). En conclusion, les bactéries indicatrices apparaissent comme de médiocres indicateurs de contamination virale. Pour cette raison, de nouveaux indicateurs, plus spécifiques de la présence des virus pathogènes, ont été étudiés. Parmi ceux-ci figurent les bactériophages.

2.2 Les indicateurs phagiques

Au cours des années 1950, les bactériophages ont été proposés pour la première fois en tant qu'indicateur de contamination virale des eaux (Guélin, 1952 ; Kott, 1966).

Depuis cette époque, trois familles de bactériophages sont plus particulièrement étudiées :

- les coliphages somatiques (Kott, 1966 ; Wentsel *et al.*, 1982 ; Borrego *et al.*, 1987 ; IAWPRC, 1991)
- les coliphages F-spécifiques (Havelaar et Hogeboom, 1984 ; IAWPRC, 1991 ; Woody et Cliver, 1995 ; Calci *et al.*, 1998 ; Nasser and Oman, 1999)
- les bactériophages de *Bacteroides fragilis* (Jofre *et al.*, 1986 ; Tartera and Jofre, 1987 ; IAWPRC, 1991 ; Grabow *et al.*, 1995 ; Lucena *et al.*, 1996)

Les coliphages somatiques

De nombreuses études ont montré que les coliphages pouvaient être intéressants à utiliser en tant qu'indicateur de contamination fécale. Un premier intérêt incontestable des bactériophages par rapport aux indicateurs bactériens concerne le gain de temps puisque l'énumération des coliphages

peut être réalisé en 6 heures (Wentzel *et al.*, 1982) contre 24 heures pour *E. coli* et jusqu'à 48 heures pour les spores de bactéries anaérobie sulfite-réductrices.

Très tôt, d'autres avantages ont été rapportés. Ainsi, dès 1975, Scarpino rapporte qu'il semble exister en eau douce et en eau de mer des corrélations entre les bactéries pathogènes telles que *Salmonella* et *Shigella*, les bactéries indicatrices de contamination fécale comme *E. coli* et les coliphages. Une forte corrélation entre les concentrations en coliphages et les concentrations en coliformes (totaux ou fécaux) a également été constatée dans les eaux de rivière (Wentzel *et al.*, 1982) et les eaux de mer (O'Keefe et Green, 1989). Pour Kott *et al.* (1974 et 1978) une corrélation est même constatée entre les coliphages, les virus et les bactéries pathogènes dans les eaux de surface (rivières et lacs) et les effluents d'eaux usées. De la même manière, Borrego *et al.* (1987) trouvent dans l'eau de mer des corrélations plus fortes entre coliphages somatiques et différents pathogènes (*Salmonelle spp.*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Candida albicans*) qu'entre ces mêmes pathogènes et les concentrations de différentes bactéries indicatrices (streptocoques, coliformes fécaux et thermotolérants). Beaudou et Bertin (1999) arrivent à cette même constatation à la suite de l'étude des eaux de 18 plages françaises. Pour eux, les coliphages somatiques, apportent une information nouvelle tout en restant liés aux autres indicateurs de pollution fécale représentés par *E. coli*. Par ailleurs, Cornax *et al.* (1991) constatent que les coliphages somatiques et les streptocoques ont une persistance plus importante dans le milieu marin que les autres indicateurs bactériens ou phagiques. Pour ces auteurs, les coliphages et les streptocoques seraient donc de meilleurs indicateurs de la contamination fécale en eau de mer que les autres indicateurs bactériens ou phagiques. Depuis, il a été montré que les coliphages somatiques sont plus résistants aux effets du rayonnement solaire que les indicateurs bactériens ou les bactériophages F-spécifiques dans l'eau de mer (Sinton *et al.*, 2002).

Déjà en 1988, Petrovicova *et al.* suggéraient qu'une augmentation du nombre de coliphages dans les eaux usées, les eaux de surface ou récréatives pourrait être considérée comme une incitation à réaliser des recherches de virus pathogènes. Ils préconisaient d'inclure la numération des coliphages dans l'évaluation continue de l'impact de la pollution fécale sur les eaux, en particulier celles utilisées à des fins récréatives. Dutka *et al.* (1987) proposaient même une valeur seuil et estimaient que le niveau des coliphages dans l'eau douce utilisée à des fins récréatives ne devrait pas dépasser 20 ufp pour 100 mL.

Morinigo *et al.* (1992) semblent confirmer ce rôle d'indicateur viral pour les coliphages somatiques. En effet, ils constatent que non seulement les concentrations en coliphages somatiques sont corrélées à la contamination fécale que traduit le taux de coliformes, mais également qu'une augmentation de la concentration en coliphages somatiques est observée lorsque le nombre d'entérovirus augmente. Cette observation s'accorde avec l'étude de Simkova et Cervenka (1981) qui montre que les coliphages et les entérovirus sont les uns et les autres capables de survivre pendant de longues périodes dans l'eau de rivière. Pour ces auteurs, les coliphages pourraient donc être utilisés comme indicateurs de la présence d'entérovirus. Enfin, il a été rapporté que les coliphages somatiques sont corrélés à la contamination virale représentée par la présence d'entérovirus infectieux et de leur génome dans les eaux usées (Gantzer *et al.*, 1998b).

Dans les sédiments marins, Jofre *et al.* (1989) constatent que les coliphages somatiques sont moins résistants que les *entérovirus* ou les *rotavirus* mis en évidence par culture cellulaire et qu'ils ne constituent donc pas de bons indicateurs.

D'autres études montrent des limites à l'utilisation des coliphages somatiques en tant qu'indicateur. Ainsi, une critique souvent formulée à l'encontre des coliphages somatiques est leur possible capacité à se multiplier dans l'environnement. Dans un état des lieux consacré aux bactériophages, Havelaar (1993) présente les coliphages somatiques comme capables de se multiplier dans l'environnement, même dans des eaux faiblement polluées. Par ailleurs, plus sensibles aux traitements que les indicateurs bactériens les coliphages somatiques sur-estimeraient ou sous-estimeraient selon les circonstances le risque lié à la présence de virus pathogènes humains.

Wiggins et Alexander avaient pourtant suggéré dès 1985 que les bactériophages ne pouvaient se multiplier si la densité de la souche hôte était inférieure à 10^4 cfu/mL ce qui est généralement le cas dans l'environnement. En fait, on peut regretter avec Beaudeau et Bertin (1999) que le reproche fait aux coliphages somatiques de se reproduire dans le milieu naturel soit si peu documenté en terme quantitatif.

Une autre critique faite aux coliphages somatiques est qu'ils ne constituent pas des indicateurs spécifiquement humains de la contamination fécale (Havelaar, 1993). Ceci est confirmé par Grabow *et al.* (1995) qui déterminent la proportion des différents phages chez l'homme et l'animal. Ainsi, sur 90 selles humaines, 54 (60 %) contiennent des coliphages somatiques alors que sur 155 selles d'animaux, représentant au total 14 espèces, 38 à 100 % sont positifs en coliphages somatiques.

En fait, les coliphages somatiques sont étudiés depuis plusieurs décennies dans le monde entier et aucun consensus n'a été trouvé quant à leur utilisation en tant qu'indicateur de la contamination virale des eaux. Ils présentent des avantages (durée d'analyse, survie) et des inconvénients (origine animale, multiplication éventuelle) et leur comportement dans l'environnement est sujet à controverse.

Les bactériophages F-spécifiques

Pour Havelaar (1993), les phages ARN F-spécifiques sont potentiellement de bons indicateurs viraux. Cependant, si leurs concentrations sont fortement corrélées aux concentrations en *entérovirus* dans toutes les eaux environnementales étudiées (rivières, lacs), elles ne le sont pas dans les eaux usées (brutes ou traitées) (Havelaar *et al.*, 1993). Les concentrations en phages ARN F-spécifiques dans l'environnement pourraient donc apporter une information quant aux concentrations en virus entériques. Des valeurs seuils ont même été proposées en fonction du type d'eau pour l'évaluation du risque. Ainsi en eau douce, les concentrations ne devraient pas dépasser 1 ufp/10mL. En eau de mer, du fait d'une survie moindre des bactériophages dans cet environnement, la concentration limite proposée serait de 1 ufp/100mL.

Sur le plan de la survie, Nasser et Oman (1999) comparant les phages F-spécifiques, *E. coli*, poliovirus 1 et virus de l'hépatite A dans différents milieux tels que eau souterraine, PBS ou eaux usées et à différentes températures constatent une différence d'inactivation et concluent que les phages F-spécifiques sont plus adaptés qu'*E. coli* pour prédire la présence de virus dans les eaux naturelles. Dans une étude récente, Sinton *et al.* (2002) constatent expérimentalement qu'en eau douce, les bactériophages F-spécifiques sont plus résistants au rayonnement solaire que les autres indicateurs testés. Les auteurs considèrent que ces phages pourraient représenter la survie des virus entériques dans les eaux de surface. Chung *et al.* (1998) arrivent à la même conclusion après avoir étudié la contamination fécale dans les eaux de conchyliculture. D'après eux, parmi les bactériophages et les indicateurs bactériens, les bactériophages F-spécifiques et les spores de *Clostridium perfringens* seraient les plus représentatifs de la présence de virus entériques dans ce milieu. De la même manière, Calci *et al.* (1998) estiment que les phages F-spécifiques pourraient constituer des indicateurs de choix pour estimer la présence potentielle de virus entériques, en particulier dans les estuaires et dans l'environnement marin touché par les rejets d'eaux usées.

Concernant la possibilité pour les bactériophages F-spécifiques de se multiplier dans l'environnement, Woody et Cliver (1995) montrent que ceci est peu probable. Ils constatent en effet que les pilis sexuels indispensables à l'infection des bactériophages F-spécifiques ne sont synthétisés qu'au-dessus de 25°C avec des températures optimales au-dessus de 30°C. Quand la température passe de 30 à 25°C, le nombre de bactéries infectées est diminué d'un facteur 10. Ce nombre est encore diminué d'un facteur 10 lorsque les bactéries infectées sont en phase stationnaire. De ce fait, il est clair que les conditions généralement rencontrées dans le milieu naturel sont incompatibles avec la multiplication de bactériophages F-spécifiques.

Malgré ces aspects positifs, d'autres études mettent en doute l'intérêt des bactériophages F-spécifiques. Ainsi, Beaudeau et Bertin (1999) considèrent que les bactériophages F-spécifiques n'apportent aucune information supplémentaire par rapport aux indicateurs bactériens classiques dans l'eau de mer.

Pour Vilaginès *et al.* (1997), les entérovirus sont plus résistants aux traitements que les bactériophages F-spécifiques. De plus, les auteurs ne retrouvent aucune corrélation entre ces deux paramètres. Ils concluent que la présence de l'un ne permet en aucun cas de prévoir la présence de l'autre ce qui s'accorde avec les conclusions de Lopez-Pila et Szewzy (2000). Morinigo *et al.* (1992) rapportent également que les bactériophages F-spécifiques ne sont corrélés ni à la contamination fécale, ni à la contamination virale que ce soit dans l'eau de rivière ou dans l'eau de mer. Ces auteurs en concluent que les phages F-spécifiques ne peuvent prétendre jouer le rôle d'indicateur de la présence éventuelle de virus.

De plus, comme les coliphages somatiques les bactériophages F-spécifiques sont peu spécifiques d'une contamination humaine. Ainsi, sur 155 selles animales provenant de 14 espèces différentes, 36 à 48 % sont positifs en bactériophages F-spécifiques (Grabow *et al.*, 1995). Mais ce qui semble être un inconvénient pour ces bactériophages n'en est peut être pas un, et cela pour deux raisons :

- Tout d'abord Calci *et al.* (1998) démontrent que les animaux participent de façon négligeable à l'apport de ces bactériophages dans les eaux usées comparé aux apports d'origine humaine. Cette constatation se fonde sur la recherche des bactériophages F-spécifiques dans 1031 échantillons fécaux d'origine humaine et animale (12 espèces différentes) et dans 64 échantillons d'eaux usées urbaines.

- d'autre part, il a été montré (Hsu *et al.*, 1995) que les bactériophages F-spécifiques sont constitués de quatre génotypes différents (I, II, III et IV). Or des travaux ont permis de constater une différence de répartition de ces génotypes en fonction de la nature humaine (génotypes II et III) ou animale (génotypes I et IV) des eaux analysées (Hsu *et al.*, 1995 ; Schaper et Jofre, 2000 ; Schaper *et al.*, 2002).

Concernant les études épidémiologiques, à notre connaissance seule l'étude de Lee *et al.* (1997) a montré qu'il existait une relation entre le nombre de bactériophages F-spécifiques, seul bactériophage recherché, et le risque de gastro-entérites dans l'eau de surface. D'autres études, au contraire, n'établissent pas de lien entre le risque de gastro-entérites et les concentrations en bactériophages F-spécifiques dans les eaux de surface (Van Asperen *et al.*, 1998 ; Medema *et al.*, 1998a). En réalité, et comme Leclerc *et al.* (2000) on peut regretter le manque d'études épidémiologiques qui prennent en compte les différents bactériophages.

En conclusion et comme pour les coliphages somatiques, le bilan est mitigé et il faut bien admettre qu'à l'heure actuelle, les travaux de recherche n'ont pas permis de déterminer si les bactériophages F-spécifiques pouvaient réellement être considérés comme un indicateur fiable de contamination virale dans les différents types d'eaux.

Les phages de Bacteroides fragilis

Dans les eaux usées brutes, ainsi qu'après épuration, Gantzer *et al.* (1998) détectent une corrélation significative entre les concentrations en *Bacteroides fragilis*, en entérovirus infectieux et la présence de génome d'entérovirus. La survie de ces phages dans l'environnement semble importante. Ainsi, dans les sédiments marins, les phages de *Bacteroides fragilis* ont une résistance similaire aux entérovirus et aux rotavirus mis en évidence par culture cellulaire (Jofre *et al.*, 1989). Dans les eaux souterraines, les phages de *Bacteroides fragilis*, et les *Clostridium* s'avèrent être de meilleurs indicateurs de pollution fécale que les indicateurs bactériens tels que les coliformes totaux, les coliformes thermotolérants ou les streptocoques fécaux (Lucena *et al.*, 1996).

Concernant la multiplication des phages de *Bacteroides fragilis*, elle nécessite pour les besoins de la souche hôte d'être en condition anaérobie stricte. De telles conditions ne sont jamais retrouvées dans le milieu hydrique naturel et de ce fait, la multiplication des phages de *Bacteroides fragilis* ne paraît pas possible dans l'environnement.

Par ailleurs, la souche de *Bacteroides fragilis* HSP40 est reconnue pour ne mettre en évidence que les bactériophages d'origine humaine (Grabow *et al.*, 1995) ce qui présente l'énorme avantage de déterminer l'origine humaine d'une contamination fécale.

Mais malgré ses avantages, les phages de *Bacteroides fragilis* souffrent d'un certain nombre d'inconvénients. D'une part, en eau de mer Cornax *et al.* (1991) constatent que les phages de *Bacteroides fragilis* persistent moins longtemps que les coliphages ou les streptocoques fécaux ce qui limite leur utilisation au titre d'indicateur de contamination fécale dans ce milieu. D'autre part, leur mise en évidence est plus contraignante que celle des autres bactériophages car elle nécessite des conditions anaérobies (Schwartzbrod et Gantzer, 1996). Enfin, une critique majeure qui est souvent faite concerne leur faible concentration dans les eaux usées épurées et dans le milieu hydrique naturel ce qui restreint leur utilisation en tant qu'indicateur de contamination virale (Chung *et al.*, 1998 ; Skrabber *et al.*, 2002).

Pour conclure sur l'utilisation des bactériophages en tant qu'indicateurs de contamination virale dans le milieu hydrique et pour illustrer la difficulté de statuer sur le sujet, il nous a semblé intéressant de rapporter les conclusions de deux travaux de synthèse parues à 15 ans d'intervalle, respectivement en 1981 et en 1996. Dans la première publication (Kott, 1981) on peut lire dans la conclusion : "Les résultats montrent très fortement que les coliphages peuvent être utilisés en tant qu'indicateur de contamination virale, ce qui est déjà le cas dans quelques pays". Quinze ans plus tard, en 1996, Armon et Kott proposent un état des lieux qui résume "50 ans de recherche sur les bactériophages". La constatation est qu'aucun des bactériophages ne correspond à l'indicateur idéal tel qu'il a été défini. Pour les auteurs, les difficultés rencontrées sont multiples, comme par exemple les différences géographiques ou le manque de normes. La solution qu'ils proposent est de tenir compte davantage de ces facteurs et ainsi de définir pour chaque type d'eau le ou les indicateurs qui seraient les plus judicieux.

Le Tableau 19 résume de manière chronologique quelques études portant sur l'intérêt des bactériophages en tant qu'indicateur de contamination fécale et/ou virale.

Tableau 19 : Valeurs des bactériophages en tant qu'indicateur dans la littérature

Eaux	Pathogènes	Coliphages	F-spécifiques	Phages Bf	Références
Rivière, eau de mer	bactéries	+			Scarpino, 1975
Eaux usées et rivière	Virus & Bactéries	+			Kott <i>et al.</i> , 1974 et 1978
<i>Revue</i>		+			Kott (1981)
rivière	<i>Entérovirus</i>	+			Simkova et Cervenka, 1981
Eau potable	<i>Entérovirus</i> <i>Rotavirus</i>	-			Keswick <i>et al.</i> (1984)
Eau de rivière/mer	Bactéries pathogènes	+			Borrego <i>et al.</i> (1987)
Eaux usées Eau de mer	<i>Entérovirus</i> <i>Rotavirus</i>	+		+	Jofre <i>et al.</i> (1989)
Traitement de potabilisation	<i>Entérovirus</i>	+			Payment (1990)
Eau de rivière/mer	<i>Entérovirus</i> et <i>rotavirus</i>	+	-		Morinigo <i>et al.</i> (1992)
Eaux usées, rivière, lac	<i>Entérovirus</i>		+		Havelaar <i>et al.</i> (1993)
<i>Rapport</i>		-	+	+	Havelaar (1993)
Traitements de potabilisation	<i>Entérovirus</i>	+/-	+/-	+	Jofre <i>et al.</i> (1995)
Eau de mer et eau souterraine	<i>Entérovirus</i>	-		+	Lucena <i>et al.</i> (1996)
<i>Revue</i>		+/-	+/-	+/-	Armon et Kott (1996)
<i>Revue</i>		-	+/-	+/-	Schwartzbrod et Gantzer (1996)
Eau de rivière	<i>Entérovirus</i> et symptômes de gastro-entérites		+		Lee <i>et al.</i> (1997)
Eaux usées Rivière	<i>Entérovirus</i>		-		Vilaginès <i>et al.</i> (1997)
<i>Revue</i>		-	+	+/-	Gantzer <i>et al.</i> (1998a)
Eaux usées selles			+		Calci <i>et al.</i> (1998)
Eaux usées	<i>Entérovirus</i>	+/-		+	Gantzer <i>et al.</i> (1998b)
Eaux de conchyliculture	<i>Entérovirus</i>		+	-	Chung <i>et al.</i> (1998)
Eau souterraine PBS Eaux usées	<i>Poliovirus</i> 1 HAV		+		Nasser et Oman (1999)
<i>Revue</i> Eau souterraine		-	+/-	+/-	Leclerc <i>et al.</i> (2000)

+ : Indicateur plutôt bon

- : Indicateur plutôt mauvais

+/- : Présente des avantages et des inconvénients

2.3 La détection d'un pathogène en tant qu'indicateur

Face aux reproches récurrents adressés aux indicateurs bactériens de contamination fécale de mal prédire le risque associé à la présence de certains pathogènes plus résistants qu'eux, notamment les virus, certains auteurs ont suggéré la recherche directe d'un virus entérique humain en tant qu'indicateur de contamination virale (Melnick et Gerba, 1980 ; Sellwood *et al.*, 1981). Cette

recherche peut se faire par mise en évidence soit du pouvoir infectieux (culture cellulaire), soit du génome (PCR).

La recherche de virus entériques par culture cellulaire

Parmi les virus proposés, figurent essentiellement les *entérovirus* qui seraient particulièrement intéressants pour deux raisons :

- ils constituent un genre important au plan sanitaire,
- ils présentent surtout une importante capacité à persister dans l'environnement.

D'un point de vue méthodologique, la recherche des *entérovirus* requiert généralement l'utilisation de techniques de concentration (Schwartzbrod, 1991). Ainsi, pour Beaudeau et Bertin (1999) le volume de prise d'essai préconisé par la norme XPT T90-451 (1996) pour la recherche des *entérovirus* dans les échantillons d'eau est très insuffisant (10 litres) pour conduire à des résultats positifs. D'un autre côté, augmenter le volume prélevé ou concentrer les échantillons sur le terrain tant au point de vue du prélèvement que du transport sont inenvisageables en routine. Beaudeau et Bertin (1999) concluent que les *entérovirus* ne sont en aucun cas un bon choix pratique ou économique pour les contrôles en routine. De même, Irving et Smith (1981) estiment que la recherche limitée aux seuls *entérovirus* infectieux serait une erreur. En effet, les *entérovirus* sous-estimeraient le risque viral dans la mesure où leurs résultats montrent que 57 des 171 échantillons (33 %) d'eaux usées analysées ont été positifs en *adénovirus*, en *reovirus* ou les deux alors que dans le même temps, aucun *entérovirus* n'a pu être isolé sur cellules BGM ou HeLa. Enfin, il a été rapporté que la recherche d'*entérovirus* infectieux dans les échantillons environnementaux peut être perturbé par la présence de *reovirus* ce qui limite d'autant la fiabilité des résultats (Carducci *et al.*, 2002).

D'une manière générale, la culture cellulaire reste irréalisable en routine, car longue, difficile et coûteuse (Havelaar et Hogeboom, 1983 ; Beaudeau et Bertin, 1999) et l'utilisation de virus entériques pathogènes comme indicateurs de contamination virale ne paraît pas actuellement envisageable.

Recherche directe du génome viral par RT-PCR

Depuis le développement de la biologie moléculaire, la détection du génome viral ouvre de nouvelles voies dans la recherche des pathogènes (Schwartzbrod et Gantzer, 1996 ; Grabow *et al.*, 2001 ; Schvoerer *et al.*, 2001). Les résultats sont en effet extrêmement différents selon que l'on recherche des virus infectieux par inoculation sur cultures cellulaires ou leur génome par des techniques de biologie moléculaire (RT-PCR). Par exemple, Puig *et al.* (1994) travaillant sur les mêmes échantillons d'eau trouvent que 75 % des échantillons contiennent du génome d'*entérovirus* alors que des *entérovirus* infectieux ne sont rencontrés que dans 31 % des échantillons.

De même, Grabow *et al.* (2001) émettent une opinion favorable vis à vis de la biologie moléculaire et remettent totalement en cause l'intérêt des indicateurs bactériens (flore totale, coliformes fécaux et totaux) ou viraux (coliphages somatiques et bactériophages F-spécifiques) pour l'évaluation de la contamination virale. Les auteurs en arrivent à cette conclusion car ils ne retrouvent aucun de ces

indicateurs dans de l'eau potable présentant 23 % d'échantillons positifs par RT-PCR (*entérovirus* 17 %, *adénovirus* 4 % et HAV 3 %) (n=413). Il faut préciser qu'aucun virus infectieux n'a pu être mis en évidence dans ces mêmes échantillons ce qui limite très largement les conclusions quant à l'évaluation du risque sanitaire.

Par ailleurs, la biologie moléculaire permet une identification rapide du virus. Elle permet en outre de déterminer l'origine exacte d'une épidémie en comparant les séquences de génome viral de différents échantillons (épidémiologie moléculaire). Ainsi, Häfliger *et al.* (2000) constatent la présence de génome de NLV (GGI) par RT-PCR simultanément dans les selles des personnes malades et dans l'eau potable. Selon les auteurs, la technique de biologie moléculaire est un outil puissant d'investigation pour la recherche des causes épidémiques.

Concernant le choix de la cible, Pina *et al.* (1998) suggèrent la recherche des *adénovirus* par PCR plutôt que celle des *entérovirus* en tant qu'index de la contamination virale dans la mesure où ceux-ci sont plus stables aux conditions environnementales. Ils sont en effet plus résistants au rayonnement ultraviolet et aux agents biocides (Irving et Smith, 1981 ; Sobsey *et al.*, 1980 ; Enriquez *et al.*, 1995 ; Meng et Gerba 1996).

Cependant, pour Gantzer *et al.* (1998a), la recherche du génome de virus entériques par biologie moléculaire n'est intéressante que si elle est adaptée à la recherche en multiplex du génome des principaux virus entériques pathogènes. Cet avis est partagé par Lee et Kim (2002) qui proposent de rechercher simultanément les *entérovirus* et les *adénovirus* car ils présentent des distributions saisonnières différentes (Tani *et al.*, 1995) et parce que la présence de l'un ne donne aucune indication sur la présence de l'autre. Ainsi, sur un total de 23 échantillons d'eau du robinet, Lee et Kim (2002) retrouvent des *entérovirus* dans 48 % des cas et des *adénovirus* dans 39 % des cas. Seuls 5 échantillons (22 %) s'avèrent positifs pour les deux types de virus simultanément. Par ailleurs, Cho *et al.* (2000) montrent que la recherche simultanée des *entérovirus* et des *adénovirus* (en multiplex) n'interfère pas sur les résultats que ce soit dans des eaux contaminées artificiellement ou dans des échantillons de l'environnement (eaux de rivière et eau du robinet).

En fait à l'heure actuelle, la recherche du génome par PCR souffre de deux inconvénients majeurs : la présence d'inhibiteurs de PCR dans les échantillons de l'environnement (Wilson, 1997) et l'interprétation difficile des résultats dans la mesure où la PCR ne permet pas de différencier les particules virales infectieuses des particules virales non-infectieuses (Sobsey *et al.*, 1998, Leclerc *et al.*, 2000). De plus, la détection reste restrictive à des séquences de virus connus (Grabow *et al.*, 2001).

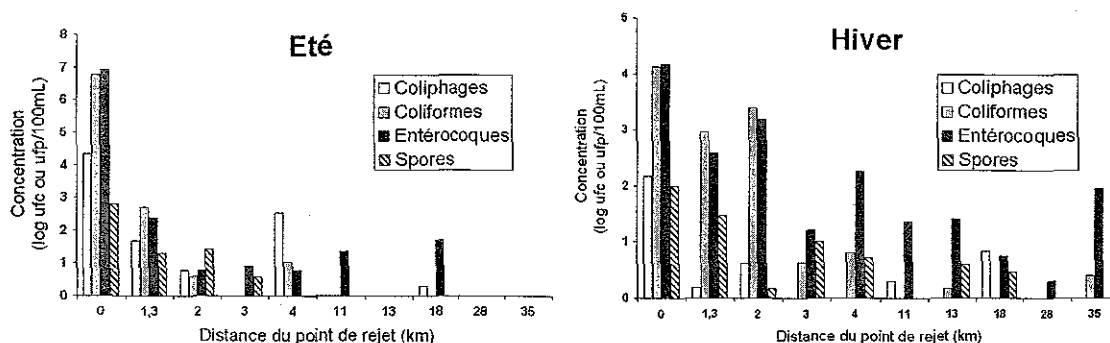
En conclusion, la biologie moléculaire adaptée à la recherche de virus pathogènes dans l'environnement est un outil prometteur pour la gestion du risque sanitaire dans le milieu hydrique, mais de nombreuses études sont encore nécessaires pour définir précisément ses applications.

3 Influence des facteurs environnementaux sur le devenir des indicateurs bactériens et viraux dans les eaux de surface

Il a été montré, notamment par Lucena *et al.* (2002) que dans les eaux usées, les indicateurs bactériens et viraux étaient bien corrélés. Cependant, les données rapportées dans la littérature semblent indiquer qu'après rejet dans le milieu naturel, l'évolution des divers indicateurs est très différente (Ricca et Cooney, 1999 ; Lucena *et al.*, 2002; Borrego *et al.*, 1987 ; Morinigo *et al.*, 1992 ; Rajala et Tanski, 1998).

Ainsi, en eau de rivière, la diminution des concentrations en indicateurs bactériens de contamination fécale (coliformes et streptocoques) et le maintien des concentrations en coliphages somatiques durant la saison estivale a été observés (Keswick *et al.*, 1984). En eau de lac, Rajala et Tanski (1998) remarquent que la persistance des indicateurs bactériens et viraux varie. Tous les indicateurs sont retrouvés en grand nombre à proximité du point d'émission de la pollution fécale, mais en s'éloignant les concentrations en indicateurs diminuent de manière hétérogène (Figure 8). En eau de mer, Ricca et Cooney (1999) notent que sur 108 échantillons analysés sur une période d'un an, les coliphages somatiques (99 % d'analyses positives) et les coliformes fécaux (97 %) sont plus persistants surtout en période estivale que les entérocoques (54 %) et les bactériophages F-spécifiques (68 %). Dans une autre étude, Cornax *et al.* (1991) montrent que les streptocoques fécaux et les coliphages somatiques sont significativement plus nombreux que les phages de *Bacteroides fragilis* ou les bactériophages F-spécifiques dans plus de 75 % des analyses d'eau de mer présentant un faible degré de pollution (coliformes fécaux < 100 ufc/100mL).

Figure 8: Concentrations de différents microorganismes en eau de lac en fonction de la distance du point de rejet, en hiver et en été (d'après les résultats de Rajala et Tanski, 1998)



En fait, outre le phénomène de dilution (Ben-Dan *et al.*, 2001) qui agit de la même manière sur tous les indicateurs, il apparaît que les différents microorganismes se comportent de manière très variable vis-à-vis des différents facteurs qui sont à l'origine du pouvoir « auto-épurateur » d'une eau de surface. Ces facteurs sont très nombreux, mais il est possible de considérer que les plus importants sont la prédation (Fujioka *et al.*, 1981 ; Mc Cambridge and Mc Meekin, 1981 ; Servais *et al.*, 1985), la compétition avec des bactéries allochtones (Flint, 1987), l'augmentation de la température de l'eau (Mancini, 1978 ; Flint, 1987), les effets du rayonnement solaire (Fujioka *et al.*, 1981 ; Kapuscinski

and Mitchell, 1981), les chocs osmotiques (Dupray et Derrien, 1995) la présence de matières organiques (Bonnefont *et al.*, 1990 ; Beaudeau *et al.*, 1998) ou l'adsorption aux matières en suspension suivie par une sédimentation (Gannon *et al.*, 1983 ; Wilkinson *et al.*, 1995).

3.1 La prédation

En eau de rivière, le rôle des prédateurs dans la disparition des bactéries est fréquemment évoqué (Mancini, 1978 ; Mc Cambridge et Mc Meekin, 1981 ; Guerrero *et al.*, 1986 ; Garcia-Lara *et al.*, 1991 ; Gonzalez et Suttle, 1993 ; Guillaud *et al.*, 1993 ; Davies *et al.*, 1995 ; Mezrioui *et al.* 1995 ; Menon *et al.*, 1996 ; Barcina *et al.*, 1997 ; Rice *et al.*, 1998 ; Suttle et Chen, 1998 ; Wilkinson, 2001 ; Beaudeau *et al.*, 1998 et 2001). Ces agents bactérivores sont des organismes benthiques, des protozoaires, des bactéries ou des bactériophages. Par contre leur rôle dans l'élimination des virus s'il est parfois évoqué n'est jamais réellement prouvé et seuls les protozoaires semblent impliqués.

Les organismes benthiques

Les organismes benthiques encore désignés sous le terme de « benthos », sont des macro-invertébrés qui vivent au fond des lacs ou des cours d'eau. Il s'agit d'un groupe très hétérogène qui comprend des mollusques, des vers, des larves d'insectes, etc... Pour Beaudeau *et al.* (1998 et 2001), le benthos pourrait jouer un rôle non négligeable dans la disparition des entérobactéries dans les rivières. Les auteurs se fondent sur une étude (modélisation mathématique) de la disparition des *E. coli* dans les rivières normandes. Cette disparition est d'autant plus rapide que le débit de la rivière est faible (<10 m³/s). D'après les auteurs, les faibles débits permettraient un contact plus important entre les bactéries et le lit de la rivière ce qui favoriserait les phénomènes de prédation par le benthos. De même, le fait que l'élévation de la température soit corrélée avec une disparition accrue des *E. coli* pourrait correspondre à une augmentation de l'activité biologique de prédation.

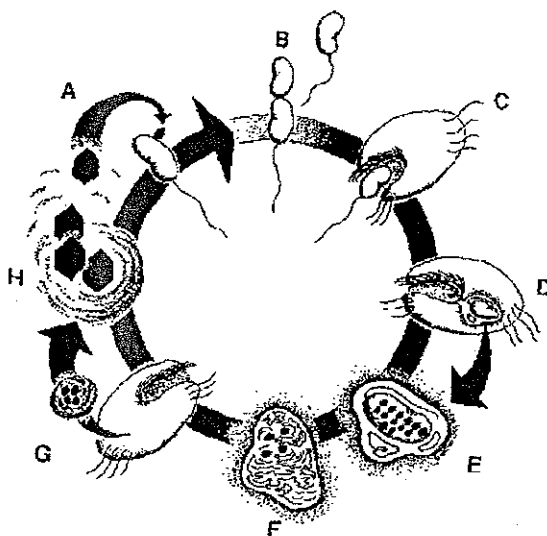
Les protozoaires

En eau douce, les protozoaires responsables de la mortalité bactérienne appartiendraient essentiellement aux embranchements des *Sarcomastigophora* et *Ciliophora* (Beaudeau *et al.*, 1998). Le niveau de prédation suit un cycle saisonnier et dépend de la température. Ainsi la surmortalité des *E. coli* constatée en été serait due à une augmentation de l'activité bactérivore des protozoaires. Dans le milieu marin, l'ingestion des bactéries par les protozoaires a également été rapportée (Davies *et al.*, 1995 ; Gonzalez *et al.* 1992). Ainsi Gonzalez *et al.* (1992) constatent une diminution du nombre d'*E. coli* cultivables (3 log) et du nombre de bactéries totales déterminé par marquage à la rhodamine (5 log) après cinq jours d'expérience en eau de mer naturelle *in vitro* alors que ces deux paramètres restent constants si l'eau de mer est préalablement filtrée sur filtre de porosité 0,2 µm qui retient les protozoaires. De même, Davies *et al.* (1995), comparant la survie d'entérobactéries dans les sédiments marins en présence et en absence de cyclohexamidine qui inactiverait sélectivement les protozoaires, remarquent que la survie des coliformes fécaux est améliorée en présence de cyclohexamidine, donc en l'absence d'activité bactérivore de la part des protozoaires. Des phénomènes de prédation des bactéries par des protozoaires ont également été mentionnés dans le réseau de distribution de l'eau potable (Sibille *et al.*, 1998).

Concernant la prédation des virus dans le milieu hydrique par les protozoaires, celle-ci est rarement abordée. On notera cependant le travail de Kim et Unno (1996) qui ont étudié la disparition virale au cours du traitement biologique d'épuration. Les auteurs expliquent le mécanisme de disparition des virus au cours de traitement par boues activées par l'adsorption des particules virales aux bactéries et flocs bactériens, puis l'ingestion de ces derniers par des protozoaires ou des métazoaires. Dans le milieu marin, l'ingestion des virus par les protozoaires a également été évoquée (Gonzalez et Suttle, 1993 ; Suttle et Chen, 1998). Dans l'eau de rivière, la filtration de l'eau par les protozoaires pourrait également contribuer à une diminution de la concentration virale de la même manière qu'elle semble agir sur les populations bactériennes. Toutefois, le manque d'information sur le sujet interdit toute conclusion définitive.

Par ailleurs, la multiplication de bactériophages est possible au sein de bactéries ingérées par des protozoaires. C'est ce que Clarke (1998) a remarqué dans un lac anglais. L'auteur observe en effet, au microscope électronique, des particules virales dans les vacuoles digestives d'un protozoaire cilié (*Euplotes*) ainsi que dans ses matières fécales. Dix-neuf sur un total de 32 vacuoles (60 %) contenaient des virus. Six pour cent des bactéries ingérées contenaient des virus. Lors de l'analyse des matières fécales du protozoaire, 41 sur 80 (51 %) contenaient des virus libres. La Figure 9 présente un schéma hypothétique du cycle de multiplication phagique à l'intérieur du protozoaire. On peut penser, même si ce n'est pas précisé dans l'article que ce genre de phénomène concerne plus particulièrement les bactéries allochtones et les phages associés. Toutefois rien ne permet d'exclure que, dans certaines conditions, les bactériophages entériques puissent également se multiplier selon un schéma similaire, et ce malgré le fait que la plupart des bactériophages entériques ne soient pas lysogéniques.

Figure 9: Schéma de la multiplication d'un bactériophages au sein d'un protozoaire (Clarke, 1998)



- A : infection lysogénique d'une bactérie par un bactériophage ;
- B : division cellulaire ;
- C : ingestion d'une bactérie par un protozoaire (*Euplotes* cilié) ;
- D : la bactérie pénètre dans la vacuole digestive ;
- E : le bactériophage démarre un cycle lytique ;
- F : la bactérie et la plupart des virus sont digérés par le protozoaire ;
- G : les virus « survivant » sont excrétés avec les matières fécales ;
- H : les excréments se désintègrent, libérant les particules virales néoformées.

Les bactéries

Dans la catégorie des bactéries prédatrices, le genre *Bdellovibrio* est prépondérant (Guerrero *et al.*, 1986 ; Rice *et al.*, 1998 ; Wilkinson, 2001). Les bactéries appartenant à ce genre se nourrissent d'autres bactéries. Ainsi *Bdellovibrio bacteriovorus* « fonce » sur sa proie à quelque 100 $\mu\text{m/s}$ soit une distance de 70 fois sa taille en une seconde ! Lorsqu'il rencontre une bactérie gram négatif, il perce la paroi et pénètre dans l'espace périplasmique. La bactérie-proie devient alors un « bdelloplaste » attendant d'être lysé par *bdellovibrio* lors de sa division cellulaire (Wilkinson, 2001). D'autres bactéries telles que *Vampirococcus* ou *Daptobacter* ont également été citées en tant que prédatrices potentielles (Guerrero *et al.*, 1986). Toutefois, aucune étude n'a pu être trouvée qui démontre l'importance du rôle spécifique de ces bactéries dans la disparition des entérobactéries du milieu hydrique naturel.

Les bactériophages

Les bactériophages sont susceptibles de provoquer la lyse bactérienne, mais selon Beaudeau *et al.* (1998) ils joueraient un rôle mineur dans le pouvoir auto épurateur de l'eau à cause des faibles probabilités de rencontre. En effet, selon Wiggins et Alexander (1985) les bactériophages ne peuvent se multiplier et donc provoquer la lyse bactérienne si la densité de la souche hôte est inférieure à 10^4 ufc/mL ce qui est généralement le cas dans l'environnement. A l'inverse, Bergh *et al.* (1989) estiment la concentration en bactériophages par cytométrie de flux supérieure à 10^8 par millilitre dans une eau de surface faiblement polluée et suggèrent que les bactériophages pourraient jouer un rôle important de régulation vis à vis des autres microorganismes. Cette hypothèse reste cependant non démontrée. De plus, même si la concentration phagique est très élevée, la grande variété des bactériophages qui composent cette population et la proportion de particules non infectieuses dans la population phagique (Suttle et Chen, 1992) incitent à rester prudent quant au rôle de ces virus dans l'écosystème aquatique. Dans l'eau de mer par exemple ou Marie *et al.* (1999) évaluent la concentration virale à environ 10^7 par millilitre par cytométrie, il ne semble pas que les bactériophages contribuent significativement à la diminution du nombre d'*E. coli* (Rozen et Belkin, 2001).

En conclusion, l'impact dans l'environnement de la prédation par les protozoaires, les bactéries ou les bactériophages sur les populations d'entérobactéries reste difficile à évaluer car les conditions d'étude nécessitent des modifications du milieu (filtration de l'eau, ajout d'inhibiteurs, de bactéries, de prédateurs...) ce qui provoque des conditions artificielles et donc des biais importants. Même si la prédation des entérobactéries est démontrée, il est impossible à partir des données actuelles d'estimer quantitativement le phénomène dans le milieu naturel. Dans une étude bibliographique traitant de la survie des entérobactéries dans l'eau de mer, Rozen et Belkin (2001) estiment que seule la prédation par les protozoaires pourrait *potentiellement* être significative. Pour ces auteurs, le rôle des bactéries prédatrices ou des bactériophages semble insignifiant, voire non démontré dans les conditions naturelles. Quant à la prédation des virus par des protozoaires, le phénomène reste non quantifié, sinon inquantifiable.

3.2 La compétition

La présence de microorganismes autochtones, plus aptes à se multiplier dans les conditions environnementales des cours d'eau pourrait provoquer une décroissance des bactéries allochtones (Flint, 1987). Expérimentalement, LeChevallier et McFeters (1985) constatent que la présence d'une population bactérienne hétérotrophe entraîne une chute de concentration des coliformes pouvant aller jusqu'à 3 log en 8 jours. De plus, ils observent une corrélation significative ($r=0,66$; $p<0,05$) entre la concentration initiale en bactéries hétérotrophes et l'abattement en coliformes. La compétition entre populations bactériennes pour les éléments nutritifs du milieu en serait vraisemblablement la cause.

La compétition entre les bactéries allochtones et les bactéries autochtones a également été évoquée en eau de rivière (Medema *et al.*, 1997b), de lac (Scheuerman *et al.*, 1988) ou de mer (Le Guyader *et al.*, 1991 ; Rozen et Belkin, 2001).

Toutefois, même si de nombreuses études mentionnent la compétition bactérienne comme une cause possible de la diminution des bactéries entériques dans le milieu naturel, le phénomène reste mal connu et peu documenté. Les virus ne sont pas concernés par ce phénomène.

3.3 La matière organique (MO)

L'expression « matière organique » regroupe une très grande diversité de substances dont le manque de caractérisation limite souvent l'interprétation des phénomènes qui lui sont liés. Pour certains auteurs, les MO ont un rôle protecteur vis à vis des bactéries dans l'eau de mer (Bonnenfont *et al.*, 1990). Elles constituent en effet une source de nutriments importante (carbone, soufre, phosphore...) (Dupray et Derrien, 1995). Ainsi, Wada (1993) observe une augmentation de concentration des populations d'*Aéromonas*, *Pasteurella*, *Pseudomonas* et Coliformes dans l'eau de rivière corrélativement à l'augmentation de la concentration en MO. Des observations similaires ont été faites par Barillier et Garnier (1993).

Cependant, l'influence des MO ne se limite pas au seul aspect trophique. La MO serait également impliquée dans les processus d'osmorégulation (Fujioka *et al.*, 1981). Enfin, l'absorption de rayonnement lumineux par certaines MO dissoutes limiterait l'action bactéricide des UV et de ce fait favoriserait la survie bactérienne (Pommepuy *et al.*, 1996).

En fait, il apparaît que la présence de MO ne favorise pas toujours la survie des entérobactéries. En effet, lorsque la matière organique est directement assimilable (ex : glucose), Beaudeau *et al.* (1998) observent dans l'eau de mer la croissance des bactéries autochtones au détriment d'*E. coli*. De plus, et d'après Gauthier *et al.* (1993a) l'absence ou la faible concentration en MO (conditions oligotrophes) améliorerait la résistance d'*E. coli* et *Salmonella typhimurium* à d'autres stress.

Concernant les virus, de nombreuses études montrent que la présence de MO dans une eau modifie le comportement viral. Ainsi, les acides humiques et fulviques modifient les interactions entre le *poliovirus* et un filtre qu'il soit électropositif ou électronégatif (Sobsey et Hickey, 1985). Lipson et Stotsky (1984) remarquent également que la présence de certaines protéines (chymotrypsine et

ovalbumine) modifie l'adsorption des *reovirus* aux surfaces minérales. Ainsi, d'après les auteurs, la persistance des *reovirus* dans le milieu aquatique dépendrait en partie de la présence et de la nature des minéraux et de la MO. Rappelons à ce titre que la matière organique est classiquement utilisée sous forme d'extrait protéique de bœuf dans les protocoles de désorption virale.

Pourtant, Labelle et Gerba (1979) constatent que la présence de MO sous forme d'acides humiques ne modifie pas l'adsorption aux sédiments marins des différents virus testés (*poliovirus* 1, *Coxsackievirus* B3, *echovirus* 7 ou *rotavirus* SA-11) ce qui souligne l'impossibilité de généraliser quant à l'action de la MO sur le comportement virale.

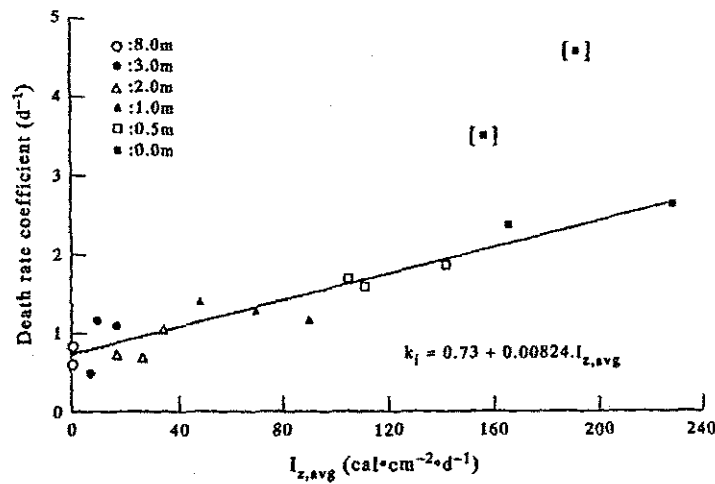
En conclusion, la MO a des effets divers sur les microorganismes. En fait, il est impossible de généraliser les observations car le mode d'action de la MO dépend du milieu, du microorganisme et de la MO elle-même.

3.4 La lumière

Le rayonnement solaire recouvre un très large spectre de longueurs d'ondes depuis les ultraviolets jusqu'aux infrarouges, en passant par le visible. La longueur d'onde la plus germicide, 260 nm, est obtenue par des lampes à vapeur de mercure. Cette longueur d'onde correspond au maximum d'absorption de l'ADN et permet un pontage entre deux thymines consécutives ce qui inhibe la réplication des microorganismes irradiés (Baron *et al.*, 1994). Les rayons solaires provoqueraient également des lésions au niveau de la membrane ainsi que des inhibitions de la chaîne respiratoire et des processus de biosynthèse (Barcina *et al.*, 1989, 1990). Expérimentalement, Auer et Niehaus (1993) observent une corrélation linéaire ($r^2=0,88$, $n=16$) inversement proportionnelle entre la profondeur (entre 0 et 8 m) dont dépend l'exposition à la lumière et la survie des coliformes dans l'eau de lac (Figure 10).

Des effets indirects tels que la formation d'espèces oxygénées photo-toxiques pour la cellule contribueraient à expliquer la mortalité bactérienne dans l'eau de mer (Gourmelon *et al.*, 1997 ; Sinton *et al.*, 2002). Pour Sinton *et al.* (2002), les entérocoques sont inactivés par un large spectre de longueur d'onde ce qui suggère une action indirecte de la lumière. À l'inverse, les coliformes sont plus particulièrement sensibles aux courtes longueurs d'onde (UV-B) ce qui accrédirait l'hypothèse d'une action directe de la lumière sur l'ADN.

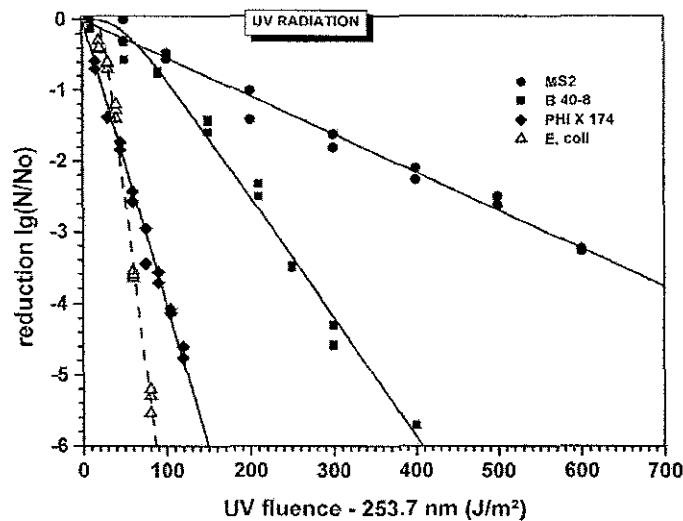
Figure 10 : Relation entre le taux d'inactivation bactérienne (ordonnée) et l'énergie lumineuse (abscisse) mesuré à différentes profondeurs (d'après Auer et Niehaus, 1993)



Les effets du rayonnement solaire sur la survie virale, et en particulier des bactériophages ont également été étudiés dans le milieu hydrique (Kapuscinski et Mitchell, 1980 et 1983 ; Suttle et Chen, 1992 ; Weinbauer *et al.*, 1999). L'inactivation virale serait en fait le résultat d'une réaction photochimique qui entraînerait une altération soit de l'acide nucléique soit des récepteurs du virus (Kapuscinski et Mitchell, 1983 ; Suttle et Chen, 1992 ; Weinbauer *et al.*, 1999).

Sommer *et al.* (2001), dans une étude comparative de l'effet des UV sur différents microorganismes, constatent une sensibilité moins importante des bactériophages par rapport à *E. coli*. Le phage MS2, un bactériophage F-spécifique, apparaît comme le plus résistant (Figure 11). Or, parmi les quatre indicateurs testés, le phage MS2 est le seul phage à ARN (monocaténaire) ce qui pourrait expliquer une plus faible sensibilité aux actions des UV. L'ARN ne contient en effet pas de thymine mais de l'uracile qui serait moins photo-réactif. Pourtant cela ne peut pas être la seule explication. En effet, le *poliovirus* qui est également un virus à ARN de taille et de structure très proche de celle du MS2 est 2 à 3 fois plus sensible que ce dernier aux UV (Baron, 1995).

Figure 11 : Inactivation par les UV (253,7 nm) de trois bactériophages (coliphages somatiques PHI X 174, bactériophages F-spécifiques MS2 et phages de *Bacteroides fragilis* B40-8) et d'*E. coli* dans l'eau du robinet (d'après Sommer *et al.*, 2001)



Il est clair que tous les virus ne présentent pas la même sensibilité aux UV, ce que confirment Gantzer *et al.* (1998c) qui montrent une différence significative de sensibilité aux UV (254nm) du poliovirus (T90 : 1,3 min) par rapport au HAV (T90 : 2,6 min). De même, Wommack *et al.* (1996) évaluent l'inactivation des bactériophages d'*Aeromonas* en fonction de l'ensoleillement et constatent une différence de sensibilité des deux bactériophages testés face aux radiations solaires. De la même manière, Weinbauer *et al.* (1999) observent que des souches de laboratoire (*Vibrio* phage PWH3a-P1, *Synechococcus* sp. phage DC2 et cyanophage SYN-M3) sont plus sensibles en eau de mer aux radiations solaires que des populations bactériophagiques sauvages.

En fait, des mécanismes différents semblent intervenir dans l'inactivation virale. Ainsi, Sinton *et al.* (2002), constatent que les bactériophages F-spécifiques sont inactivés par un large spectre de longueur d'onde alors que les coliphages somatiques ne sont sensibles qu'aux courtes longueurs d'onde. Les auteurs suggèrent une action indirecte de la lumière sur les bactériophages F-spécifiques contrairement aux coliphages somatiques.

Paradoxalement, il semble que certains virus, en l'occurrence les phages de *Vibrio natriegen* auraient besoin d'énergie lumineuse correspondant plus particulièrement à des longueurs d'onde comprise entre 370 et 550 nm, pour recouvrer leur pouvoir infectieux (Weinbauer *et al.*, 1997). Cette hypothèse se fonde sur une constatation : les virus exposés à la lumière se multiplient davantage que les mêmes populations placées à l'obscurité. En fait, l'ADN viral endommagé par le rayonnement solaire (formation de dimères) deviendrait incapable de poursuivre le cycle lytique au sein d'une cellule hôte. Les auteurs émettent l'hypothèse de l'existence d'une enzyme photo-réactive au sein de la bactérie infectée capable de réparer les dommages causés à l'ADN qu'il soit bactérien ou viral. Une telle enzyme a en effet été largement décrite chez *E. coli* : la photolyase (Todo *et al.*, 1993). Toutefois, une telle utilisation de l'énergie lumineuse par les bactéries ou les bactériophages reste très peu documentée dans le milieu naturel.

En conclusion, il est avéré que la lumière endommage le matériel génétique, en particulier l'ADN et avec des sensibilités différentes, les bactéries comme les virus sont affectées. Concernant l'impact du rayonnement, certains auteurs pensent qu'il est prépondérant dans l'effet bactéricide (Fujioka *et al.*, 1981) et virucide (Suttle et Chen, 1992) dans l'eau de mer. D'autres auteurs estiment en revanche que l'effet reste mineur en eau de rivière (Beaudeau *et al.*, 2001). La salinité joue peut être un rôle sur la photo-sensibilité des microorganismes dans l'eau comme l'indiquent Sinton *et al.* (2002).

3.5 La température de l'eau

À la lecture des différents travaux qui étudient l'effet de la température sur les microorganismes en milieu naturel, les conclusions apparaissent parfois contradictoires (Auer et Niehaus, 1993 ; Barcina *et al.*, 1997). Ainsi, en eau douce, certains auteurs ne constatent aucun effet de la température sur la survie des coliformes. C'est le cas pour des températures comprises entre 8 et 25°C en eau de rivière (Barillier et Garnier, 1993), en eau de lac (Emiliani et González de Paira, 1998) ou en eau de lac préalablement filtrée sur filtre de porosité 0,25 µm pour des températures comprises entre 10 et 35°C (Auer et Niehaus, 1993). Pourtant, d'autres travaux montrent qu'une augmentation de la température diminue la survie des coliformes en eau de lac (An *et al.*, 2002) ou en eau de rivière (Lantrip, 1983 cité par Auer et Niehaus, 1993).

En eau de mer par contre, des études rapportent qu'une élévation de la température augmente l'inactivation des entérobactéries et que de faibles températures améliorent la survie des bactéries en eau de mer (Rosen et Belkin, 2001).

Concernant les virus, de nombreux travaux montrent une différence de survie en fonction de la température. En eau de mer par exemple, Gantzer *et al.* (1998c) constatent une diminution rapide de la concentration en *poliovirus* 1 dans l'eau de mer artificielle à 25°C (T90 : 25 jours) par rapport à 4°C (T90 : 671 jours). Ces résultats sont en accord avec ceux de Enriquez *et al.* (1995) qui constatent également une diminution de la concentration en virus infectieux d'autant plus importante que la température augmente. Ils soulignent par ailleurs que, pour une même température, des différences au niveau de la survie sont constatées entre le *poliovirus*, le HAV et l'*adénovirus*. Le *poliovirus* étant le plus sensible des trois et l'*adénovirus* le plus résistant.

En fait, le paramètre température est extrêmement difficile à isoler dans la mesure où les actions indirectes qu'il provoque ne sont pas maîtrisables. La température peut en effet jouer un rôle sur l'activité de prédation d'autres espèces (Beaudeau *et al.*, 1998), augmenter l'activité métabolique et la synthèse de molécules biocides ou encore favoriser certaines réactions chimiques...

3.6 La salinité de l'eau

Pour les bactéries, une différence de salinité entre le milieu intra et le milieu extra-cellulaire peut conduire à un choc osmotique. En fait, l'osmose est le transfert d'eau d'une solution diluée ou hypotonique vers une solution concentrée ou hypertonique à travers une membrane semi-perméable

qui laisse passer l'eau mais pas les grosses molécules de cette solution. L'osmose crée progressivement l'égalité des concentrations des deux côtés de la membrane semi-perméable.

La membrane d'une bactérie constitue une membrane semi perméable au travers de laquelle l'osmose s'établit. Le choc osmotique est la conséquence de la différence de salinité entre l'intérieur et l'extérieur de la cellule. Plus cette différence est grande, plus le choc osmotique est important. Pour les bactéries entériques, tout passage d'un milieu hydrique à un autre peut constituer un risque au niveau osmotique dans la mesure où la salinité change.

La survie d'*E. coli* a été évaluée dans différents mélanges eau de mer – eau distillée avec respectivement 0, 25, 50, 75 et 100 % d'eau de mer (Carlucci et Pramer, 1960 rapporté par Rozen et Belkin, 2001). Après 48 heures, la survie est maximale dans le milieu contenant 25 % d'eau de mer (74% de survie contre 60 % et 6 % respectivement dans l'eau distillée et l'eau de mer). De même, pour Sinton *et al.* (2002) l'augmentation de la salinité d'une eau entraîne l'augmentation de l'inactivation des coliformes fécaux, des *E. coli* et des entérocoques. Des expérimentations menées dans l'estuaire du St Laurent au Québec tendent à montrer qu'une salinité à 2 ‰ constituerait les conditions les moins défavorables à la survie des bactéries provenant d'eaux usées (Monfort et Baleux, 1994).

De nombreuses études rapportent qu'un choc osmotique entraîne une perte de cultivabilité (Fujioka *et al.*, 1981 ; Barcina *et al.*, 1993 ; Troussellier *et al.*, 1998 ; Rozen et Belkin, 2001). Pour Dupray et Derrien (1995), le choc osmotique serait responsable des principaux préjudices occasionnés aux bactéries fécales lors de leur passage en eau de mer. La perte de cultivabilité correspondrait en fait à des altérations structurales et métaboliques des bactéries qui auraient pour conséquence de limiter leur développement sur des milieux de culture classiques (Dupray *et al.*, 1998). Par exemple, l'activité de la β -galactosidase, sur laquelle est fondée la détection des coliformes sur milieu spécifique au lactose, disparaît en quelques jours en eau salée (Munro *et al.*, 1987). Consécutivement au choc osmotique, les bactéries synthétisent des molécules osmoprotectrices tel que des sucres ou de l'acide glutamique (Rozen et Belkin, 2001).

Ainsi, l'aptitude des entérobactéries à résister aux chocs osmotiques dépend essentiellement :

- des caractéristiques du milieu récepteur, dont l'osmolarité (Monfort et Baleux, 1994) ou la teneur en matière organique (nutriments), semblent jouer un rôle déterminant (Munro *et al.*, 1987 ; Gauthier *et al.*, 1993a et b) ;
- de sa capacité à s'adapter au milieu en induisant l'expression de certains gènes régulateurs tels que *rpoS* qui permet de déclencher une réponse anti-stress (Troussellier *et al.*, 1998) ;
- de la phase de croissance au moment du choc osmotique, la phase exponentielle étant défavorable à la survie (Gauthier *et al.*, 1992 ; Troussellier *et al.*, 1998).

Pour Gauthier *et al.* (1993a), les entérobactéries seraient en fait pré-adaptées à la vie en milieu hypertonique du fait qu'elles sont soumises à de fortes pressions osmotiques dans l'intestin. Leur passage dans un milieu hypotonique (eau distillée ou même eau usée) constituerait donc un choc osmotique inverse. Ce choc est également responsable d'une perte de cultivabilité avec libération de

macromolécules dans le milieu extracellulaire (Gauthier *et al.*, 1993a). Celle-ci correspondrait en fait à une adaptation des bactéries aux nouvelles conditions osmotiques de la même manière que les bactéries s'adaptent au milieu hypertonique. Ainsi, plusieurs études constatent que des entérobactéries ayant préalablement séjournées en eau usée (milieu hypotonique) sont mieux protégées (adaptées) au transfert en eau de mer que si elles y avaient été placées directement (Munro *et al.*, 1987 ; Dupray et Derrien, 1995 ; Troussellier *et al.*, 1998).

Enfin, soulignons que même si les bactéries sont affectées par des chocs osmotiques consécutivement aux changements de salinité, des phénomènes de charges interviennent également. En effet, les charges de surface des parois bactériennes constituées en partie de protéines dépendent du milieu. Les variations de ces paramètres entraînent la modification des interactions entre bactérie-bactérie ou bactérie-support. Ainsi, pH et salinité conditionnent largement la formation de biofilms (Decho, 2000) ou la formation d'agrégats qui sera développée plus particulièrement dans la partie traitant de l'interaction des bactéries avec les matières en suspension.

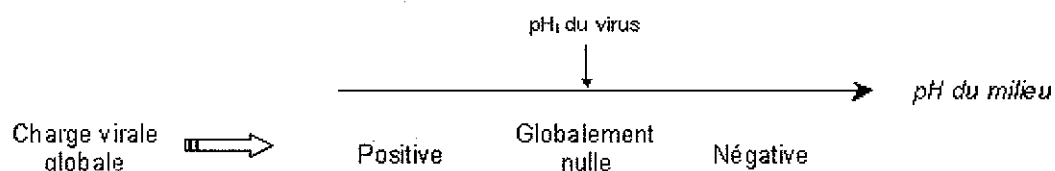
Concernant les virus non enveloppés, la salinité d'une eau ne provoque pas de choc osmotique dans la mesure où la capsid protéique ne peut être comparée à une membrane semi-perméable. Néanmoins, la salinité influence le comportement viral dans l'eau. Ainsi, une action indirecte des sels a été rapportée. Selon leur nature (valence) et leur concentration dans le milieu, les sels influencent l'adsorption virale sur argile ou biofilm (Quignon, 1995) mais aussi l'agrégation virale (Floyd et Sharp, 1978). Ces phénomènes d'adsorption et d'agrégation dépendent essentiellement de deux facteurs : la concentration en sel et le pH. Le pH détermine le signe des charges de surface de la particule virale et la salinité définit la force ionique du milieu dont dépendent les interactions virus-virus ou virus-support.

Ainsi, Floyd (1979) évalue par microscopie électronique l'influence de ces paramètres sur l'agrégation d'une suspension mixte de *poliovirus* et de *reovirus*. Pour un pH donné (pH=7) la diminution de la force ionique pour une suspension mixte de *poliovirus* 1 et *reovirus* 3 (par dilution de la solution tampon au 1/20) entraîne l'agrégation du *poliovirus* 1 exclusivement. Par ailleurs pour une force ionique constante, la diminution du pH (de 7 à 5) provoque l'agrégation des deux virus ainsi que la formation d'agrégats mixtes. Cette différence de comportement des deux virus peut s'expliquer par des différences au niveau de la capsid et notamment par des différences de valeurs du point isoélectrique (pI). Le Tableau 20 présente les points isoélectriques de différents virus. Rappelons que les charges de surface de la particule virale sont majoritairement positives lorsque le pH de l'eau est inférieur au pI, globalement nulle lorsque le pH de l'eau est égal au pI et majoritairement négatives lorsque le pH de l'eau est supérieur au pI (Figure 12). D'après les valeurs de pI données dans le Tableau 20, dans l'expérience de Floyd (1979), à pH=7, les particules virales de *poliovirus* 1 sont chargées positivement et les particules virales de *reovirus* 3 sont chargées négativement. Or l'agrégation entre les deux virus n'est observée que lorsque le milieu tampon est dilué, soulignant ainsi le rôle important de la concentration ionique du milieu. Les charges de surface des particules virales sont neutralisées par la présence d'ions en fortes concentrations ce qui limite l'interaction entre virus. Inversement, pour une forte concentration ionique, la diminution du pH modifie les interactions entre virus et entraîne leur agrégation.

Tableau 20 : Point isoélectrique (pI) de différents virus (d'après Gerba, 1984)

Virus	pI
<i>Poliovirus 1</i> (Mahoney)	8,2
<i>Reovirus 3</i>	3,9
<i>Echovirus 1</i> (Farouk)	5,1
<i>Coxsackievirus A21</i>	6,1 ; 4,8
Phage MS2	3,9
Phage T2	4,2

Figure 12 : Effet du pH sur la charge de surface d'un virus en fonction de son point isoélectrique



Toutefois, la complexité du milieu naturel ne permet pas de prévoir le comportement viral à partir des seules valeurs de pH et de salinité. La variation de l'un ou de l'autre paramètre ne suffit en général pas à prédire le comportement viral. Ainsi, à pH constant, malgré une forte variation de la salinité du milieu (entre 1 et 40 g/L), Labelle et Gerba (1979) n'observent pas d'évolution du pourcentage d'adsorption du *poliovirus 1* (>99 %) sur des sédiments marins naturels. Les mêmes auteurs constatent également qu'à salinité constante (26 g/L), une variation du pH entre 6 et 9 ne modifie pas le taux d'adsorption pour trois virus différents (*poliovirus 1*, *rotavirus* et *Coxsackievirus B3*).

Outre les effets sur les interactions entre particules virales, la salinité ne semble pas affecter le pouvoir infectieux des virus. Ainsi, pour Gantzer *et al.* (1998c) l'augmentation de la salinité de 14 à 33 g/L n'affecte pas la survie du *poliovirus 1* ou du HAV en eau de mer synthétique à 25°C. Notons qu'en eau de surface, Quignon *et al.* (1998) constatent qu'une augmentation de la conductivité est linéairement corrélée à l'inactivation des virus. Toutefois, pour les auteurs, l'augmentation de la concentration en sel agit de manière indirecte en favorisant l'activité anti-virale de certains produits d'origine microbiologique. Pour Sinton *et al.* (2002) par contre, l'augmentation de la salinité d'une eau entraîne l'augmentation de l'inactivation des coliphages somatiques et des bactériophages F-spécifiques.

En conclusion, la salinité de l'eau influence le comportement aussi bien les bactéries que les virus. Elle agit sur les charges de surface et conditionne les phénomènes d'adsorption/agrégation. De plus, une augmentation ou une diminution de la salinité du milieu induit des chocs osmotiques chez les bactéries dont les dommages occasionnés seront d'autant plus importants que la différence de salinité est importante.

3.7 La sédimentation et le rôle des matières en suspension (MES)

L'expression « matière en suspension » regroupe un très grand nombre de substances de nature organique ou minérale et de taille variable. Or la recherche classique des MES dans l'eau se résume généralement à une filtration suivie du séchage du filtre et enfin de sa pesée. La caractérisation précise des MES est rarement abordée ce qui limite les interprétations. Pourtant, la fixation des bactéries sur les MES varie énormément avec les caractéristiques de celles-ci et notamment la surface disponible et sa nature. Ainsi Brisou et Makhoul (1982) ont montré que certaines qualités d'argile constituent un support particulièrement efficace, puisqu'ils dénombrent 100 fois plus de bactéries dans la phase liquide après débusquement enzymatique qu'en l'absence de traitement.

Consécutivement à l'adsorption, certains auteurs pensent que la sédimentation est en partie responsable de la disparition des bactéries dans le milieu hydrique (Gannon *et al.*, 1983 ; Nestor et Brisou, 1986 ; Wilkinson *et al.*, 1995 ; Ben-Dan *et al.*, 2001 ; An *et al.*, 2002). Les bactéries sédimentent en effet spontanément avec une vitesse qui dépend principalement de leur faculté à s'agréger. En eau de mer, il y a 10 à 100 fois plus de bactéries dans les sédiments que dans la phase eau (Rozen et Belkin, 2001). De plus, la durée de survie des *E. coli* est plus importante dans les sédiments que dans l'eau de mer. La présence de matière organique en plus grande quantité dans les sédiments en serait la raison (Rozen et Belkin, 2001).

En rivière, le stockage temporaire des bactéries fécales dans les sédiments est un fait (Wilkinson *et al.*, 1995) mais son importance est difficilement quantifiable. Elle dépend en effet de la charge sédimentaire de la rivière, de sa morphologie (zones calmes, zones tumultueuses), de la qualité des sédiments, de la conjoncture hydrologique (valeur de débit). Cette complexité explique qu'il n'existe pas de corrélation directe entre le taux de contamination des sédiments et celui de l'eau (Doyle *et al.*, 1992).

Certains auteurs ont tenté de déterminer la proportion de bactéries capables de s'agréger ainsi que les conditions favorables à cette aggrégation. Dans la rivière Danube par exemple, Berger *et al.* (1996) constatent au microscope que 39 % des MES sont colonisées par des bactéries marquées au bleu d'Alcian ce qui représente en moyenne 9,5 % de la population bactérienne totale. La concentration en bactéries libres étant estimée entre $2,4$ et $7,8 \cdot 10^6$ par millilitre. Les MES sont colonisées par 8 bactéries en moyenne, les particules les plus petites étant plus largement colonisées. Dans cette rivière, 60 % des MES ont une surface de 9 à $100 \mu\text{m}^2$ (rayon moyen de 2 à $6 \mu\text{m}$) et 57 % des bactéries colonisent cette classe de taille.

Pour Auer et Niehaus, 90 % des coliformes sont associés à des particules de $0,45$ à $10 \mu\text{m}$ en eau de lac. Cinq pour cent seulement seraient attachés à des particules de taille supérieure à $10 \mu\text{m}$. Pour Ben-Dan *et al.* (2001), la plupart des bactéries sont fixées à des particules d'un diamètre moyen de $13 \mu\text{m}$ en eau de rivière. Par ailleurs, de fortes corrélations ont pu être mises en évidence entre les fractions de particules de taille ($5 - 7 \mu\text{m}$) et ($7 - 9 \mu\text{m}$) et la présence de coliformes fécaux ($r^2=0,85$ et $0,83$ respectivement). Pour les auteurs, la disparition des bactéries adsorbées aux MES est largement dépendante du débit.

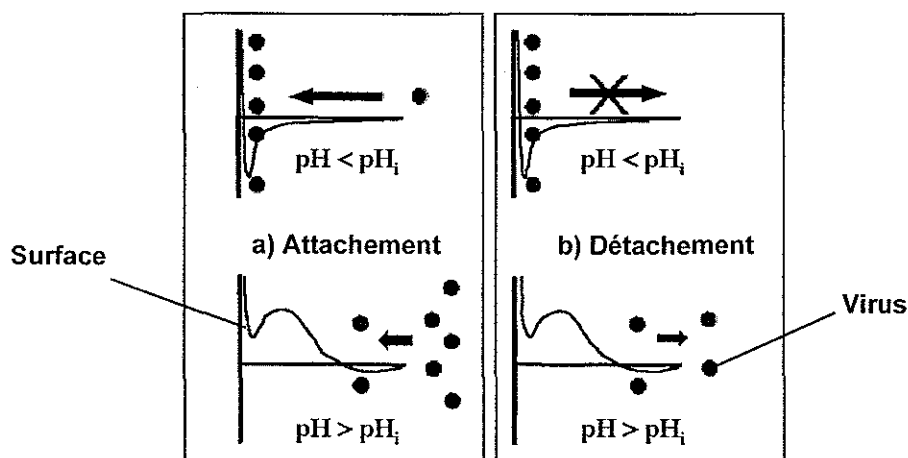
Ainsi, les principales causes de disparition des coliformes provenant de l'eau de rivière et arrivant en eau de lac seraient :

- la dilution lorsque le débit est supérieur à 1,54 m/s
- la dilution et la sédimentation lorsque le débit est comprise entre 0,68 et 1,22 m/s
- la sédimentation lorsque le débit est inférieur à 0,68 m/s

Les MES joueraient finalement un rôle complexe, voire contradictoire, vis-à-vis de la survie bactérienne. Elles favoriseraient une disparition par co-sédimentation, mais offriraient une protection aux bactéries contre les agressions du milieu. Par exemple, les MES limiteraient en particulier la pénétration des rayons lumineux bactéricides prolongeant ainsi les temps de survie (Kapuscinski et Mitchell, 1981).

Concernant les virus, Payment *et al.* (1988) considèrent que 77 % des *entérovirus* infectieux et 66 % des coliphages sont soit libres dans l'eau de rivière, soit associés à des particules de taille inférieure à 0,25 μm . Rappelons que la fixation d'un virus à un support dans le milieu aqueux est dominée par les interactions électrostatiques (Gerba, 1984). Si les charges de la particule virale et de la surface sont connues, il est possible de prédire le phénomène d'adsorption, au moins qualitativement en se basant sur la théorie DLVO (du nom de ses auteurs : Derjaguin, Landau, Verwey et Overbeek). (Figure 13). Les conditions qui réduisent les répulsions électrostatiques telles que faible pH, présence d'ions divalents ou force ionique importante, favorisent l'adsorption (Penrod *et al.*, 1996 ; Zerda *et al.*, 1985). Comme la plupart des virus sont chargés négativement dans les conditions de pH du milieu hydrique, l'adsorption est favorisée par la présence de surface chargée positivement (Murray et Parks, 1980 ; Taylor *et al.*, 1981 ; Loveland *et al.*, 1996 ; Ryan *et al.*, 1999).

Figure 13: Mécanisme de l'adsorption virale basé sur la théorie DLVO en fonction des conditions de pH (d'après Loveland *et al.*, 1996)

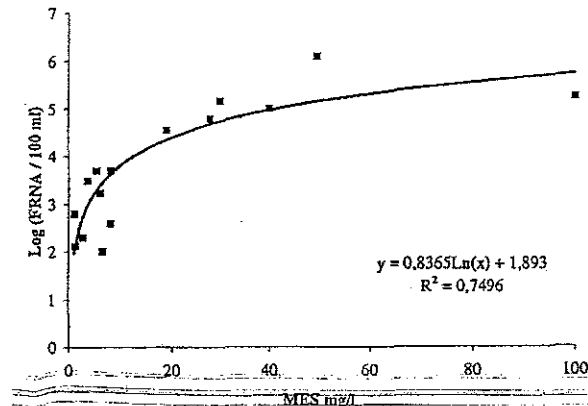


Le pH_i correspond au pH qui permet d'obtenir le point isoélectrique de la particule virale (charge globale nulle)

En eau de rivière, la capacité des coliphages à s'adsorber aux sédiments dépendrait essentiellement de la vitesse du courant. Ainsi Zaiss (1981) constate que dans la partie canalisée de la rivière, les

phages sont majoritairement associés aux sédiments alors que dans la partie non canalisée (débit plus fort) ils restent dans la phase eau. Pour Baron (1997) il existe clairement une relation entre les concentrations bactériophages F-spécifiques et la teneur en MES dans les eaux usées épurées (Figure 14).

Figure 14 : Concentrations en bactériophages F-spécifiques en fonction de la teneur en MES dans les eaux usées épurées (d'après Baron, 1997)



Pour Gantzer *et al.* (1998c) la présence de 3, 15 et 500 mg/L de Na-montmorillonite provoque l'adsorption de la majorité des virus (90 à 99,9 %). La survie de ces virus n'est pas améliorée pour les faibles concentrations de MES (3 et 15 mg/L) (T90 : 26 et 31 jours) alors qu'une augmentation significative de la durée de survie est observée pour les fortes concentrations (500 mg/L) (T90 : 36 jours). L'expérience s'est déroulée à l'obscurité ce qui montre que les MES pourraient jouer un rôle protecteur vis-à-vis des virus autres que celui de limiter la diffusion de la lumière dans le milieu. Toutefois, cette protection ne semble pas jouer un rôle majeur et d'autre part, dans l'eau de mer, les concentrations en MES sont généralement comprises entre 3 et 15 mg/L (Gantzer *et al.*, 1998).

En conclusion, les matières en suspension agissent aussi bien sur les bactéries que sur les virus. En fonction de la nature des MES, de leurs tailles et de leurs concentrations ils joueraient selon le cas soit un rôle d'adsorbant et/ou de protecteur vis à vis des microorganismes.

4 Étude bibliographique sur les indicateurs bactériens et phagiques dans le milieu hydrique

De nombreux travaux, parfois contradictoires, préconisent tel ou tel indicateur, bactérien ou phagique, dénigrent tel ou tel autre selon les résultats obtenus. Or, le caractère contradictoire, le manque de consensus sur le sujet est largement responsable de la situation, à savoir qu'aucun indicateur n'a, à ce jour remplacé *E. coli* pourtant reconnu comme un mauvais indicateur de la contamination virale des eaux. Ainsi, cette étude vise à regrouper plusieurs travaux ayant recherché des indicateurs bactériens et/ou phagiques et/ou certains virus pathogènes cultivables dans différents milieux. L'objectif est de déterminer d'une part comment se comportent les différents indicateurs entre eux et d'autre part, leur éventuelle corrélations avec la contamination virale. Le comportement des indicateurs peut-il être considéré comme un système « simple » dans lequel il suffit de connaître l'un des paramètres pour pouvoir prédire avec une certaine probabilité la présence/concentration d'un autre paramètre ou s'agit-il d'un système « complexe » dans lequel les indicateurs ont un comportement holistique dont il est impossible de prédire la situation globale connaissant l'un des paramètres ?

Le travail de synthèse personnel qui est proposé ici a pour objectif d'apporter des éléments de réponse à ces interrogations.

4.1 Choix des publications de références

Pour le choix des publications, deux critères ont été déterminants :

- D'une part que le sujet d'étude concerne le milieu hydrique,
- D'autre part que l'identification des paramètres microbiologiques étudiés et que les résultats (concentrations) soient clairs.

Il faut préciser que des données relatives à des concentrations en indicateurs dans les boues ou dans les sédiments marins ont également été rapportées dans les publications sélectionnées. Ces valeurs ont été prises en compte à titre indicatif, mais ne constituent pas le sujet de la présente étude.

Trente trois publications (Dutka, 1973 ; Keswick *et al.*, 1984 ; Funderburg et Sorber, 1985 ; Tartera, 1986 ; Nieuwstad *et al.*, 1988 ; Grabow *et al.*, 1989 ; Jofre *et al.*, 1989 ; O'Keefe et Green, 1989 ; Payment, 1990 ; Cornax *et al.*, 1991 ; Palmateer *et al.*, 1991 ; Havelaar, 1993 ; Donnison et Ross, 1995 ; Havelaar *et al.*, 1995 ; Jagals *et al.*, 1995 ; Jofre *et al.*, 1995 ; Armon et Kott, 1996 ; Lucena *et al.*, 1996 ; Lee *et al.*, 1997 ; Payment *et al.*, 1997 ; Vilagines *et al.*, 1997 ; Chung *et al.*, 1998 ; Gantzer *et al.*, 1998b ; Rajala et Tanski, 1998 ; Schijven *et al.*, 1998 ; Espigares *et al.*, 1999 ; Lasobras *et al.*, 1999 ; Muniesa *et al.*, 1999 ; Ricca et Cooney, 1999 ; Collivignarelli *et al.*, 2000 ; Baggi *et al.*, 2001 ; Taylor *et al.*, 2001 ; Skraber *et al.*, 2002) ont été sélectionnées dont les dates de parution s'échelonnent de 1973 à 2002. Elles proviennent de 12 journaux différents, un rapport européen, une thèse de recherche et une publication de colloque. Deux de ces travaux constituent

des reviews sur le sujet : Armon R. et Y. Kott (1996) et Havelaar (1993).

Un total de 351 échantillons d'eau ont été pris en compte, représentant 8 types d'eaux soit un total de 1226 valeurs de densités dont 601 concernent les indicateurs bactériens, 496 les indicateurs phagiques et 129 les virus entériques infectieux dont 119 *entérovirus*. Pour cette étude, nous avons arbitrairement regroupé coliformes thermotolérants, coliformes fécaux et *E. coli* d'une part et streptocoques fécaux et entérocoques d'autre part. Les détails sont donnés dans le Tableau 21. Les coliformes et les coliphages somatiques étant les indicateurs les plus fréquemment recherchés, le nombre d'analyse les concernant est le plus important.

Tableau 21 : Récapitulatif des données bibliographiques

Bactéries	Coliformes	Streptocoques	Spores de <i>Clostridium</i>	
n	303	207	91	

Virus	Coliphages somatiques	Bactériophages F-spécifiques	Phages de <i>Bacteroides fragilis</i>	Virus entériques cultivables
n	244	174	78	129

Tous les résultats sont présentés sous forme graphique en annexe 1.

Nous avons choisi d'analyser les relations entre indicateurs plus particulièrement à partir de deux exemples :

- la relation entre coliformes et streptocoques
- la relation entre coliformes et coliphages

La légende suivante est utilisée pour les graphiques distinguant le type d'eau

- | | |
|---------------------------------|-----------------------|
| × Eaux usées brutes | □ Eaux usées traitées |
| + Boues | ◇ Lagunage |
| × Eaux de surface | △ Eaux de mer |
| ▲ Sédiments marins | - Eaux souterraines |
| ○ Traitements de potabilisation | ◇ Eaux potables |
| --- y=x | |

4.2 Relation entre coliformes et streptocoques

Sur l'ensemble des valeurs de densités (n=195), il existe une très bonne corrélation ($r^2=0,90$) entre les concentrations en coliformes et les concentrations en streptocoques (Figure 15). La Figure 16 précise pour chaque concentration obtenue le type d'eau correspondant. À titre indicatif la droite d'équation $y=x$ représente l'égalité parfaite des concentrations entre les deux microorganismes. Ainsi, les concentrations en coliformes sont dans la très grande majorité des cas supérieures à celles des streptocoques. Seuls quelques échantillons d'eau de surface ou de sédiments marins présentent une proportion inverse.

Figure 15 : Concentrations en streptocoques en fonction des concentrations en coliformes dans l'ensemble des milieux hydriques

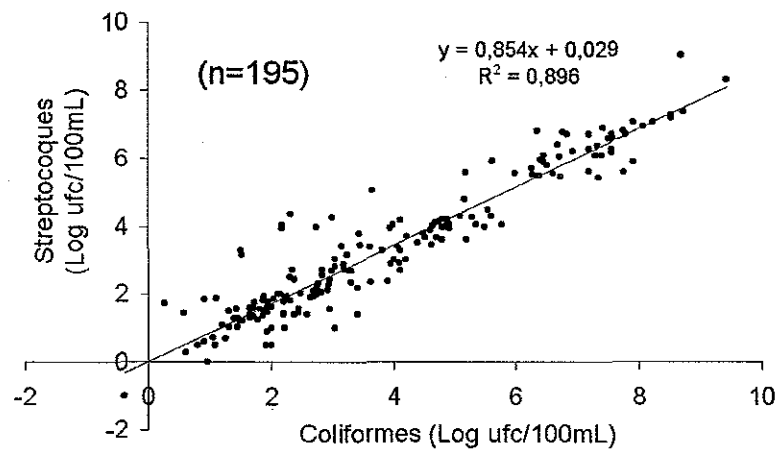
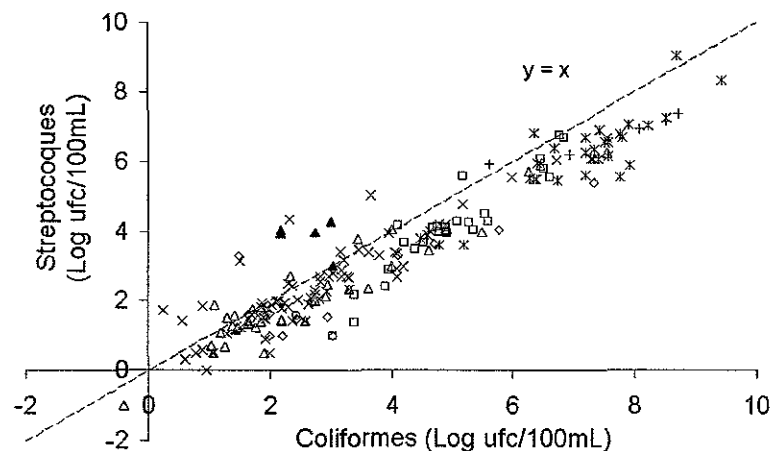


Figure 16 : Comparaison des concentrations en streptocoques par rapport aux concentrations en coliformes en fonction du milieu



4.3 Relation entre coliformes et coliphages

De la même manière que précédemment, si nous examinons la relation entre un indicateur bactérien et un indicateur phagique dans le milieu hydrique (Figure 17), il apparaît que la corrélation entre les deux indicateurs, calculée sur l'ensemble des données recueillies ($n=175$) est élevée ($r^2=0,81$). La Figure 18 précise pour chaque concentration obtenue le type d'eau correspondant. En comparaison avec la droite d'équation $y=x$, il apparaît que les concentrations en coliformes sont majoritairement supérieures à celles des coliphages. Toutefois, quelques échantillons, en particulier dans les eaux de surface présentent une proportion inverse.

Figure 17 : Concentrations en coliphages en fonction des concentrations en coliformes dans l'ensemble des milieux hydriques

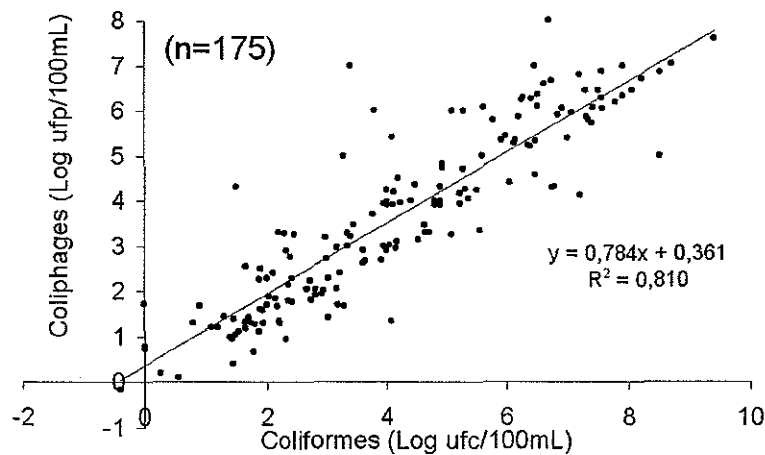
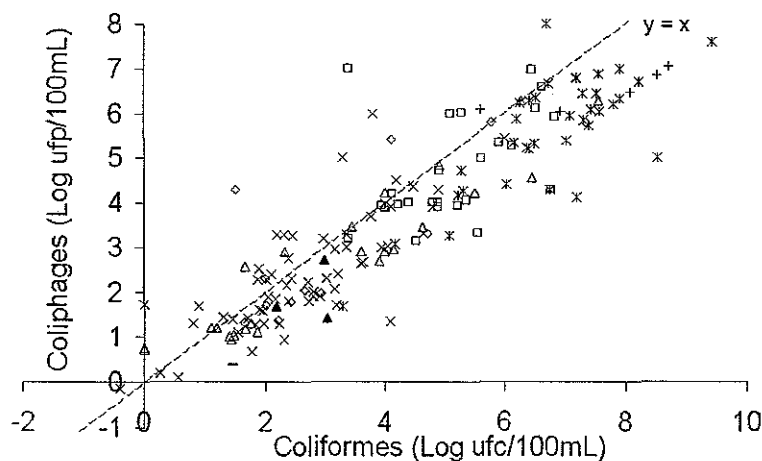


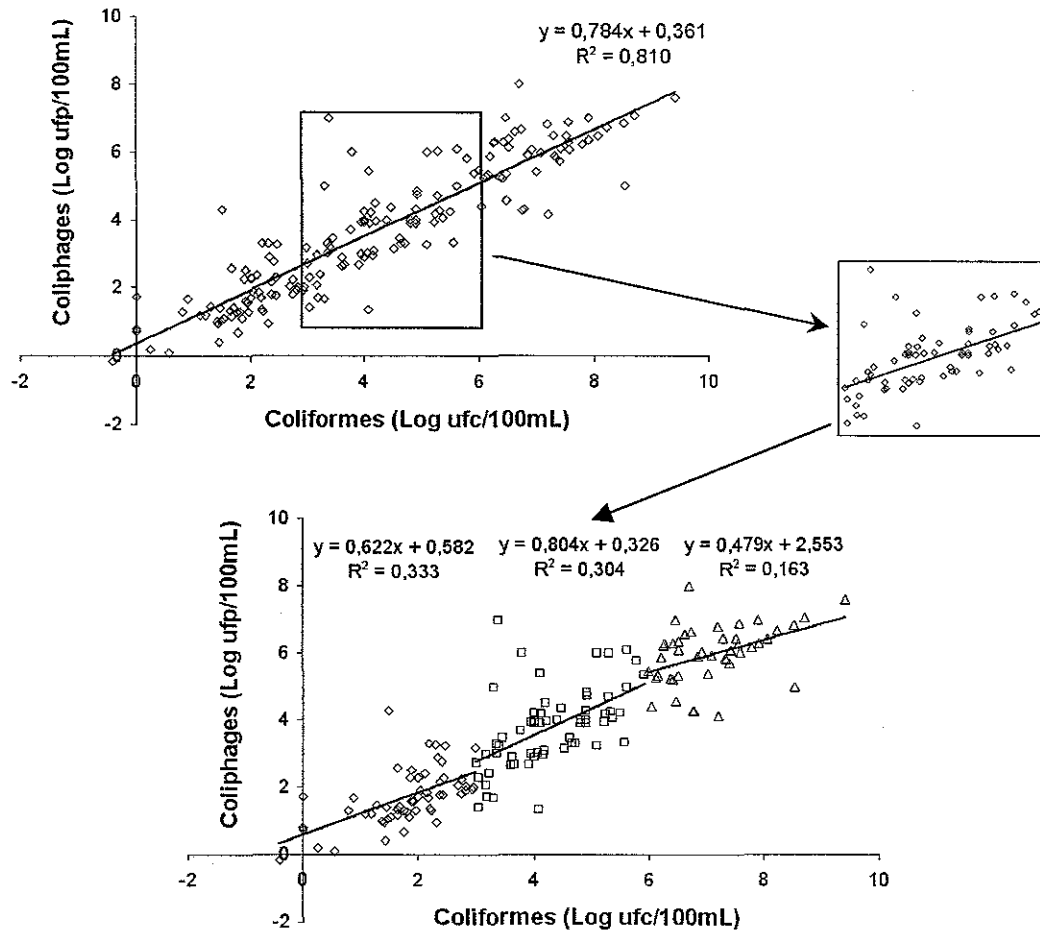
Figure 18 : Comparaison des concentrations en coliphages par rapport aux concentrations en coliformes en fonction du milieu



4.4 Analyse des résultats en fonction de la charge fécale

Nous avons montré précédemment qu'il existait des corrélations entre les différents indicateurs lorsque l'on prenait en compte l'ensemble des résultats obtenus à partir de catégories d'eau extrêmement différentes (de l'eau usée à l'eau souterraine). Aussi, il nous a paru intéressant de déterminer si ces corrélations étaient confirmées dans le cas où ne seraient pris en compte que les résultats correspondants à une charge fécale donnée (déterminée par la concentration en coliformes). La Figure 19 présente graphiquement les corrélations entre coliformes thermotolérants et coliphages somatiques dans le milieu hydrique en tenant compte dans un premier temps de l'ensemble des concentrations déterminé pour chaque type d'eau, puis dans un second temps, en considérant une gamme de 3 log de la charge fécale déterminée par les concentrations en coliformes thermotolérants. Il s'agit en fait de réduire la fenêtre de lecture des résultats.

Figure 19: Principe de réduction de la fenêtre de lecture



Il apparaît que les corrélations entre les différents indicateurs et les coliformes (Tableau 22) s'estompent dès lors que l'on diminue la fenêtre d'observation des données et ce malgré un nombre de points important ($n > 25$). Ceci montre en l'occurrence que lorsque la charge fécale déterminée à l'aide des coliformes thermotolérants est faible (< 3 log), les corrélations entre cet indicateur et les autres deviennent faibles. Cette très faible corrélation souligne le fait que les coliformes ne représentent pas le comportement des autres indicateurs dans le milieu hydrique.

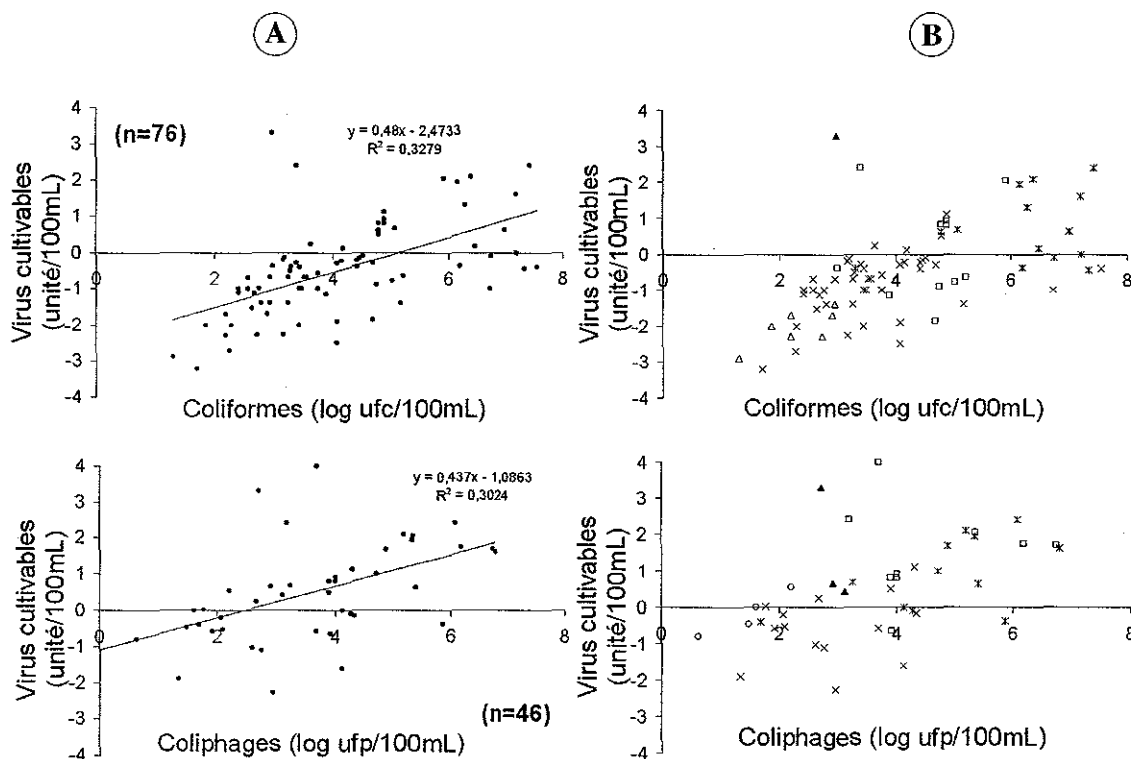
Tableau 22 : Corrélations entre les concentrations en coliformes et les différents indicateurs en fonction de la concentration en coliformes

	Concentrations en coliformes (Log ufc/100mL)		
	0 - <3	3 - <6	≥ 6
Streptocoques	$r^2=0,33$ (n=82)	$r^2=0,49$ (n=64)	$r^2=0,55$ (n=49)
Spores	$r^2=0,72$ (n=44)	$r^2=0,12$ (n=36)	(n=7)
Coliphages	$r^2=0,33$ (n=58)	$r^2=0,30$ (n=64)	$r^2=0,16$ (n=53)
Phages F-sp.	$r^2=0,26$ (n=44)	$r^2=0,16$ (n=46)	$r^2=0,14$ (n=33)
Phages de Bf	(n=8)	$r^2=0,17$ (n=17)	$r^2=0,10$ (n=27)

4.5 Relation entre indicateurs et pathogènes

Si l'on observe le comportement des indicateurs par rapport aux virus pathogènes infectieux (Figure 20) les corrélations sont très faibles ($r^2=0,3$). À noter toutefois que les concentrations des indicateurs tendent à augmenter lorsque la concentration viral augmente. Une des raisons majeures qui permet d'expliquer la faible corrélation entre indicateur et pathogènes est le caractère très régulier de « l'émission » des virus pathogènes par rapport à celle régulière des indicateurs.

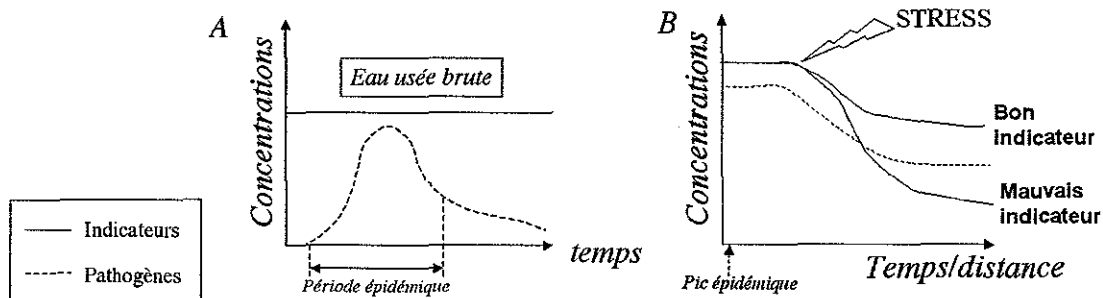
Figure 20 : Concentrations en coliformes ou en coliphages en fonction des concentrations en virus pathogènes infectieux dans l'ensemble des milieux hydriques (A) et en fonction du type d'eau (B)



Afin d'illustrer ce propos, la Figure 21 schématise les variations théoriques des concentrations en indicateurs et en virus pathogènes qui peuvent survenir dans l'eau usée (graphique A) et dans l'environnement (graphique B). Dans les eaux usées brutes, les concentrations en indicateurs bactériens et viraux varient peu au cours de l'année sauf conditions exceptionnelles (pluies diluviennes, changement important du comportement de la population). À l'inverse, les virus pathogènes sont émis plus sporadiquement, notamment en périodes épidémiques pendant lesquelles plus le nombre d'individus atteint est grand, plus les concentrations virales dans les selles sont fortes. En dehors des périodes épidémiques, les concentrations virales dans l'environnement deviennent très faibles, voire nulles.

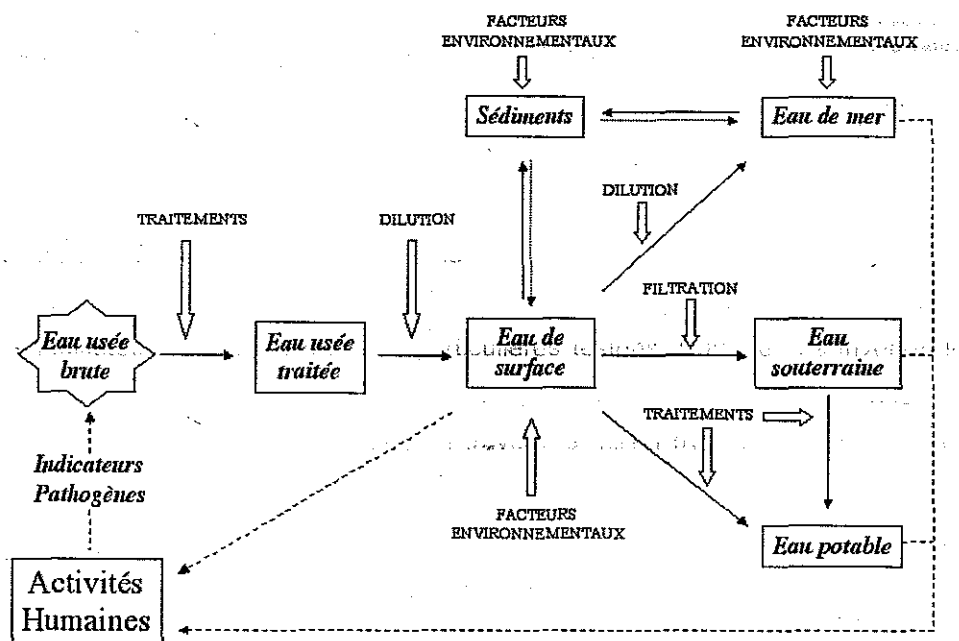
Rappelons qu'un bon indicateur ne doit pas être plus sensible à un stress environnemental que le pathogène dont il est sensé indiquer la présence potentielle.

Figure 21: Variations théoriques des concentrations en indicateurs et pathogènes A : dans l'eau usée brute, B : dans l'environnement lors d'un stress



Dans l'environnement, les indicateurs, comme les pathogènes subissent les mêmes stress. Si l'indicateur est plus sensible au stress que le pathogène, il est possible de considérer comme un « mauvais » indicateur dans les conditions particulières testées. Dans le cas inverse, il peut être considéré comme un bon indicateur. La Figure 22 présente les différents parcours que peuvent emprunter les indicateurs et les pathogènes à travers le milieu hydrique ainsi que les nombreux paramètres qui peuvent agir sur leur concentration (traitements, dilution, facteurs environnementaux, filtration sur sol).

Figure 22: Parcours des indicateurs et des pathogènes dans le milieu hydrique



En conclusion, cette étude de synthèse ne permet pas de préciser quel indicateur est le plus pertinent quant à l'évaluation du risque viral. Elle permet toutefois de montrer que les indicateurs ne se comportent pas toujours de la même manière dans le milieu hydrique.

Aussi, plutôt que de considérer le risque viral par rapport à un indicateur dans un milieu donné, il serait intéressant de comparer le comportement de différents indicateurs dans chacun des milieux présentant un intérêt sur le plan sanitaire puis de déterminer les conditions pour lesquels deux indicateurs ne donnent pas la même information. Une fois ces conditions définies, il conviendrait d'évaluer le risque viral en recherchant un certain nombre de virus entériques pathogènes pour l'homme. Ces résultats permettraient de définir si l'indicateur qui détermine le risque sanitaire le plus élevé est judicieux ou non à considérer dans le cadre de l'évaluation du risque viral.

MATERIELS ET METHODES

1	Les eaux analysées	74
1.1	<i>Échantillonnage en station d'épuration d'eaux usées urbaines</i>	74
1.2	<i>Échantillonnage au niveau de la rivière Moselle</i>	75
1.3	<i>Échantillonnage en eaux souterraines</i>	77
1.4	<i>Les dates de prélèvement</i>	78
2	Méthodes de concentration des microorganismes à partir des échantillons d'eau	79
2.1	<i>Concentration des échantillons pour la recherche des bactériophages</i>	79
2.2	<i>Concentration des échantillons pour la recherche de virus pathogènes</i>	79
3	Méthodes de détection et de quantification des microorganismes étudiés	80
3.1	<i>Les indicateurs de la contamination fécale</i>	80
3.2	<i>Les virus pathogènes</i>	84
3.3	<i>Mise en évidence des entérovirus infectieux sur culture cellulaire</i>	89
4	Les analyses physico-chimiques	92
5	Détermination de la sensibilité aux ultra-violets des indicateurs présents dans les eaux usées	92
5.1	<i>Réalisation du test</i>	93
5.3	<i>Eau analysée</i>	93
5.4	<i>Calcul de la dose UV</i>	94
6	Études expérimentales de survie des microorganismes	95
6.1	<i>Survie des coliphages somatiques, des coliformes thermotolérants et du Poliovirus de type 1 dans l'eau de rivière en fonction de la température</i>	95
6.2	<i>Survie des coliphages somatiques et des coliformes thermotolérants en fonction de la composition de l'eau (eau de rivière – PBS)</i>	96
7	Observation microscopique des coliformes thermotolérants au DAPI	97
8	Calcul des abattements et analyses statistiques des résultats	98

Matériels et méthodes

1 Les eaux analysées

Au cours de cette étude, des eaux ont été prélevées au niveau :

- de trois stations d'épuration d'eaux usées urbaines ;
- de la rivière Moselle ;
- de six forages en nappe phréatique ;

1.1 Échantillonnage en station d'épuration d'eaux usées urbaines

L'échantillonnage a été réalisé dans deux stations d'épuration de capacités très différentes allant de 80.000 à 300.000 équivalents habitants. Dans ces deux stations, les échantillons ont été prélevés dans des bouteilles stériles de 1 L, conservés et transportés dans une glacière à 4°C et analysés dans un délai de 2 heures.

1.1.1 La station de Nancy

La station d'épuration de Nancy comprend deux filières distinctes, une filière industrielle traitant les effluents de la brasserie de Champigneulle et une filière urbaine d'une capacité de 300.000 équivalent-habitants. Les prélèvements ont été effectués uniquement sur la filière urbaine. Le débit moyen journalier en entrée est d'environ 100.000 m³ par jour pour cette filière qui comporte un prétraitement (dégrillage, désablage et déshuilage), une décantation primaire, un traitement par boues activées et une décantation secondaire. Le temps de séjour global peut être estimé entre 8 et 12 heures. Durant la campagne de prélèvement, les eaux usées brutes étaient caractérisées par des concentrations moyennes en MES de 150 mg.L⁻¹, en DBO₅ de 120 mg.L⁻¹, en DCO de 260 mg.L⁻¹, en azote total de 30 mg.L⁻¹ et en phosphore total de 10 mg.L⁻¹ et les eaux usées traitées par des concentrations moyennes en MES de 14 mg.L⁻¹, en DBO₅ de 14 mg.L⁻¹, en DCO de 43 mg.L⁻¹, en azote total de 20 mg.L⁻¹ et en phosphore total de 5 mg.L⁻¹. Le traitement d'épuration permettait donc d'obtenir un abattement d'un facteur 11 pour les MES, d'un facteur 8 pour la DBO₅, d'un facteur 6 pour la DCO, d'un facteur 1,5 pour l'azote total et d'un facteur 2 pour le phosphore total.

Cette station d'épuration respecte les normes de rejets de la directive européenne 91/271/CEE, du 21 mai 1991, relative au traitement des eaux urbaines résiduaires en matière de MES (35 mg.L⁻¹), DBO₅ (25 mg.L⁻¹) et de DCO (125 mg.L⁻¹) mais pas en matière d'azote total (15 mg.L⁻¹) ni en phosphore total (2 mg.L⁻¹).

Les trois points de prélèvements d'eaux usées sont situés respectivement :

- à l'entrée de la station, après le prétraitement des eaux brutes ;
- après décantation primaire;
- à la sortie de la station, après traitement secondaire et avant rejet dans la rivière Meurthe (eaux traitées).

1.1.2 La station d'Epinal

La station d'épuration d'Epinal a une capacité nominale de 80.000 équivalent-habitants. Le débit moyen journalier en entrée est d'environ 20.000 m³ par jour pour cette filière de traitement qui comprend un prétraitement (dégrillage, désablage et déshuilage), une décantation primaire, un traitement biologique fonctionnant en alternance en phase d'aération et en phase d'anoxie permettant d'éliminer l'azote par nitrification-dénitrification, une décantation secondaire et un traitement tertiaire de déphosphatation (coagulation avec un sel de fer, floculation avec un polymère et décantation lamellaire). Le temps de séjour global est supérieur à 30 heures, dont 24 heures dans le bassin d'aération. Durant la campagne de prélèvement, les eaux usées brutes étaient caractérisées par des concentrations moyennes en MES de 151 mg.L⁻¹, en DBO₅ de 229 mg.L⁻¹ et en DCO de 456 mg.L⁻¹ et les eaux usées traitées par des concentrations moyennes en MES de 6,5 mg.L⁻¹, en DBO₅ de 8 mg.L⁻¹ et en DCO de 27 mg.L⁻¹. Le traitement d'épuration permettait ainsi d'obtenir un abattement d'un facteur 23 pour les MES, d'un facteur 29 pour la DBO₅ et d'un facteur 17 pour la DCO et satisfait donc aux normes de rejets de la directive européenne pour tous les paramètres. Mais il faut souligner que nous n'avons pu disposer d'informations concernant le phosphore et l'azote.

Les trois points de prélèvements d'eaux usées sont situés respectivement:

- à l'entrée de la station, avant le prétraitement des eaux brutes ;
- dans le bassin de décantation secondaire, après le traitement biologique;
- à la sortie de la station, avant le rejet dans la rivière Moselle (eaux traitées).

Remarque : Pour des raisons d'ordre pratique, tous les prélèvements provenant d'une même station d'épuration ont été réalisés le matin (aux alentours de 9h00). Ainsi, il n'a pas été tenu compte du temps de séjour des eaux usées dans les différents bassins. Cependant, compte tenu du fait que les temps de séjour globaux sont estimés entre 12 heures à Nancy et plus de 24 heures à Épinal, Il est possible de considérer qu'il y a une certaine homogénéisation du niveau de pollution dans les différents bassins et que dans ces conditions il est possible de calculer des abattements.

1.2 Échantillonnage au niveau de la rivière Moselle

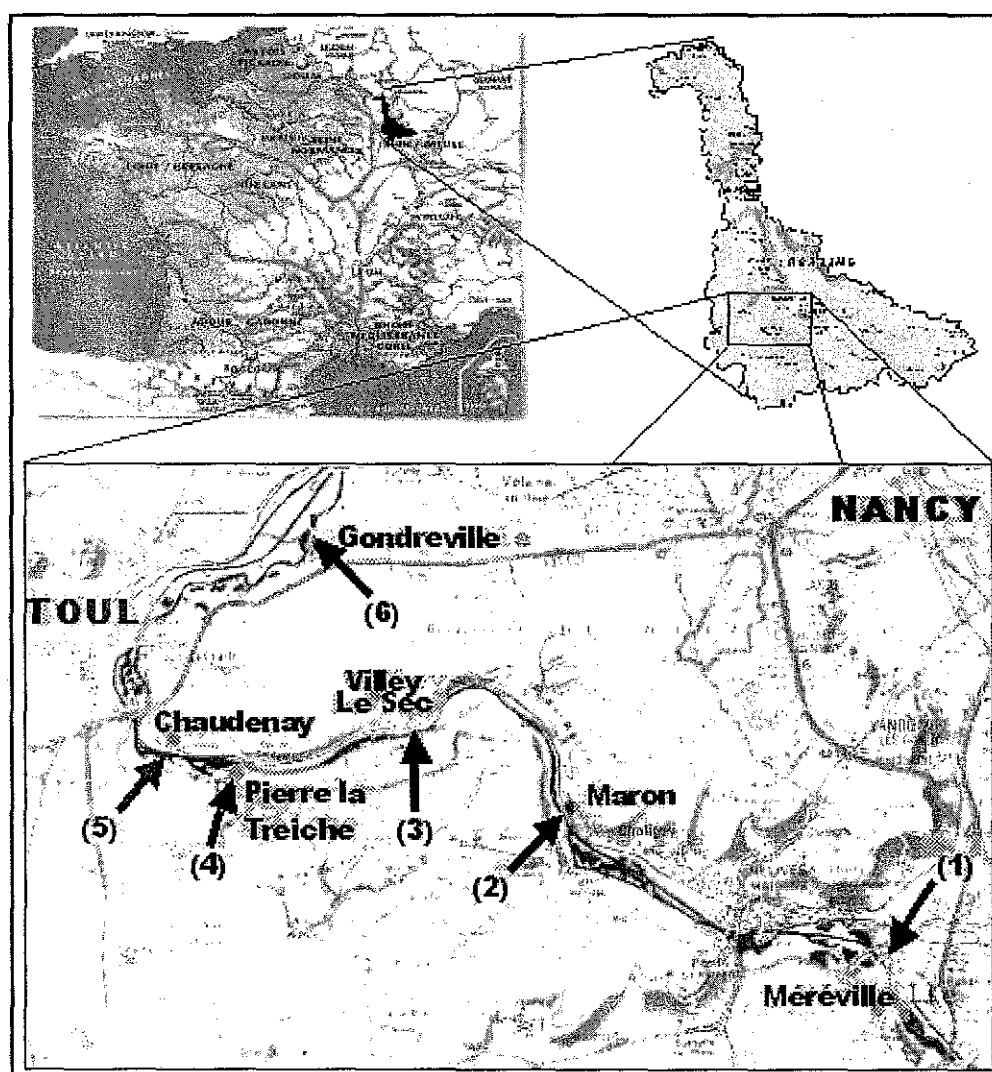
Les sites de prélèvement de l'eau de rivière ont été choisis en fonction de leur position par rapport aux apports de contamination fécale représentés par les rejets d'eaux usées brutes ou épurées.

1.2.1 Les sites de prélèvement

Les eaux de rivière ont été prélevées dans la rivière Moselle dans le département de la Meurthe et Moselle (Figure 23). Cinq sites, dans le sens amont-aval, ont été choisis :

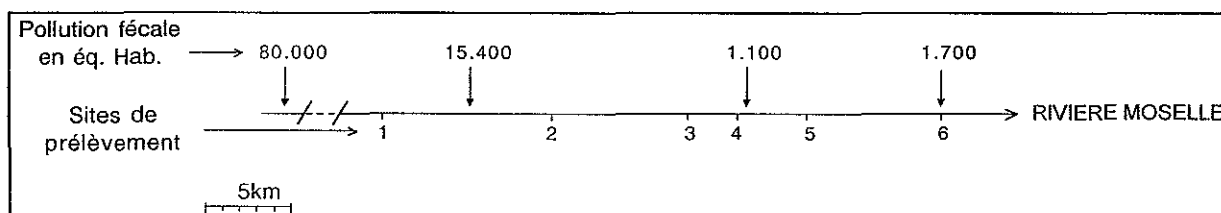
- Méréville (site 1) : au niveau du pont, sur la route départemental D115^B ;
- Maron (site 2) : au niveau du pont, sur la route départementale D92 ;
- Villey le Sec (site 3) : au niveau du barrage hydroélectrique ;
- Pierre la Treiche (site 4) : au niveau du pont ;
- Chaudenay (site 5) : au niveau du barrage hydroélectrique, sur la route départementale D77 ;
- Gondreville (site 6) : au niveau du pont ;

Figure 23 : Carte de localisation des points de prélèvements



La Figure 24 schématise la localisation des 6 sites de prélèvement qui s'étendent sur 33 km. Il est important de noter que sur cette section, une portion de 10 km ne reçoit aucun apport connu de contamination fécale d'origine humaine ou animale.

Figure 24 : Schéma des différents sites de prélèvement sur la Moselle en fonction de l'apport contaminant



1.2.2 Les modalités de prélèvement

L'échantillonnage au niveau de chacun des six sites a été systématiquement réalisé à partir de ponts ou du barrage qui surplombent la Moselle, à mi-chemin entre les deux rives, à l'aide d'un préleveur. Ce préleveur est constitué d'une nacelle lestée pouvant contenir jusqu'à quatre bouteilles d'un litre fermement maintenues. Il est introduit dans l'eau, puis remonté à l'aide d'une corde. L'eau est prélevée en surface, la profondeur étant comprise entre 0 et 50 cm.

1.3 Échantillonnage en eaux souterraines

Afin d'évaluer la présence des différents microorganismes dans les eaux souterraines, des sites potentiellement contaminés ont été choisis en fonction d'analyses microbiologiques effectuées lors du contrôle systématique des eaux.

1.3.1 Les sites de prélèvement

Les eaux souterraines ont été prélevées dans six communes situées dans le département de la Meurthe et Moselle :

- Méréville : il s'agit d'un forage situé sur les bords de la Moselle ;
- Neuves-Maisons : il s'agit d'une résurgence d'eau provenant d'une nappe phréatique. Cette eau est collectée dans un lavoir ;
- Dommartin-les-Toul : il s'agit d'un forage situé sur les bords de la Moselle ;
- Champigneulle : il s'agit d'un forage situé en lisière de forêt sur le domaine de Bellefontaine ;
- Bouxières-aux-Dames : il s'agit d'un forage situé sur les hauteurs de la commune ;

Toutes ces eaux sont utilisées comme ressource pour la production d'eau potable à l'exception des eaux de Neuves-Maisons qui, trop contaminées, ne sont plus utilisées car elles nécessitaient l'apport de doses trop élevées de chlore pour satisfaire aux normes de potabilité. Il est important de souligner que toutes les eaux que nous avons analysées ont été prélevées avant l'étape de chloration.

1.3.2 Les modalités de prélèvement

L'échantillonnage a été réalisé selon les modalités préconisées pour les analyses d'eau d'alimentation.

1.4 Les dates de prélèvement

Le Tableau 23 présente les dates de prélèvement pour chaque type d'eau.

Tableau 23 : Les dates de prélèvement pour chaque type d'eau

Eaux de rivière (a)		Eaux usées (b)		Eaux souterraines (c)	
22/02/00	EdL	10/05/99	N	7/03/00	4,5,6
25/02/00	EdL	24/05/99	N	9/03/00	1,3,2
29/02/00	EdL	31/05/99	N	13/03/00	1,2
16/03/00	EdL	7/06/99	N	5/04/00	1,3,4,5
3/04/00	EdL	6/09/99	N	28/08/00	5,4,3
11/04/00	EdL	20/09/99	N	21/02/01	1,3,4,5,2
27/04/00	EdL	21/03/00	E	1/03/01	1,3,4,5
18/05/00	EdL	23/03/00	E	6/03/01	2
8/06/00	EdL	27/03/00	E		
21/06/00	EdL	29/03/00	E		
17/07/00	EdL	13/04/00	E		
3/08/00	EdL	25/04/00	E		
21/08/00	EdL	2/05/00	E		
12/09/00	EdL	19/06/00	N		
27/09/00	EdL	19/06/00	E		
31/10/00	EdL	21/06/00	N		
13/11/00	EdL	24/07/00	N		
5/12/00	VP	24/07/00	E		
11/12/00	VP	26/07/00	N		
14/12/00	VP	9/08/00	N		
4/01/01	VP	17/08/00	N		
9/01/01	VP	21/08/00	N		
17/01/01	VP	23/08/00	N		
12/06/01	VP	30/08/00	N		
26/06/01	VP	4/09/00	N		
26/07/01	VP				
1/08/01	VP				
3/08/01	VP				
28/08/01	VP				
11/09/01	VP				
4/09/01	S				
10/01/02	S				

a) Prélèvements effectués pour l'état des lieux (EdL), la recherche de virus pathogènes (VP) ou l'étude de survie (S) ;

b) Prélèvements effectués à Nancy (N) ou Epinal (E) ;

c) Prélèvements effectués à Méréville (1), Neuves-Maisons (2), Dommartin-les-Toul (3), Champigneulle (4), Bouxières-aux-Dames (5) ou Dieulouard (6).

2 Méthodes de concentration des microorganismes à partir des échantillons d'eau

Lorsque les concentrations en microorganisme d'une eau sont faibles, il est possible, soit d'augmenter le volume de la prise d'essai lorsque cela est possible, soit de recourir à des techniques de concentration de l'échantillon.

2.1 Concentration des échantillons pour la recherche des bactériophages

La recherche des bactériophages dans les eaux souterraines nécessite une étape préliminaire de concentration :

Après ajout de 15 mL de $MgCl_2$ 4,14 M à 1 L d'eau, l'échantillon est homogénéisé puis laissé au repos pendant deux minutes. La totalité du volume est alors filtré sur une membrane de porosité 0,22 μm (Millipore, GSWP47) à l'aide d'une rampe de filtration dont la dépression est réalisée par une trompe à eau. La membrane est ensuite placée dans un tube contenant 5 mL de solution éluante stérile composée d'extrait de bœuf (1 %), de tween 80 (3 %) et de NaCl 0,5M à pH=9. Ce tube est introduit dans un bain à ultra-sons (DELTASONIC type 011C) pendant 3 minutes. Le pH de l'éluat est alors amené à pH 7,2 (+/-0,2) et la totalité du volume (5 mL) est analysée pour la quantification des bactériophages.

2.2 Concentration des échantillons pour la recherche de virus pathogènes

Deux techniques ont été utilisées pour la concentration des virus entériques à partir de l'eau de rivière. La filtration/élution et l'ultrafiltration.

2.2.1 Filtration/élution

La concentration des virus pathogènes est réalisée par filtration d'après un protocole adapté de Gilgen et al. (1997). La filtration est réalisée sur membrane de porosité 0,45 μm chargée positivement (CUNO NM04701 045SP). Un préfiltre en ester de cellulose de porosité 8 μm (Millipore SCWP04700) est utilisé afin de limiter le colmatage. Un litre d'eau de rivière est filtré. La dépression nécessaire est obtenue à l'aide d'une pompe à vide électrique qui permet d'atteindre une dépression de 0,75 à 0,80 bar.

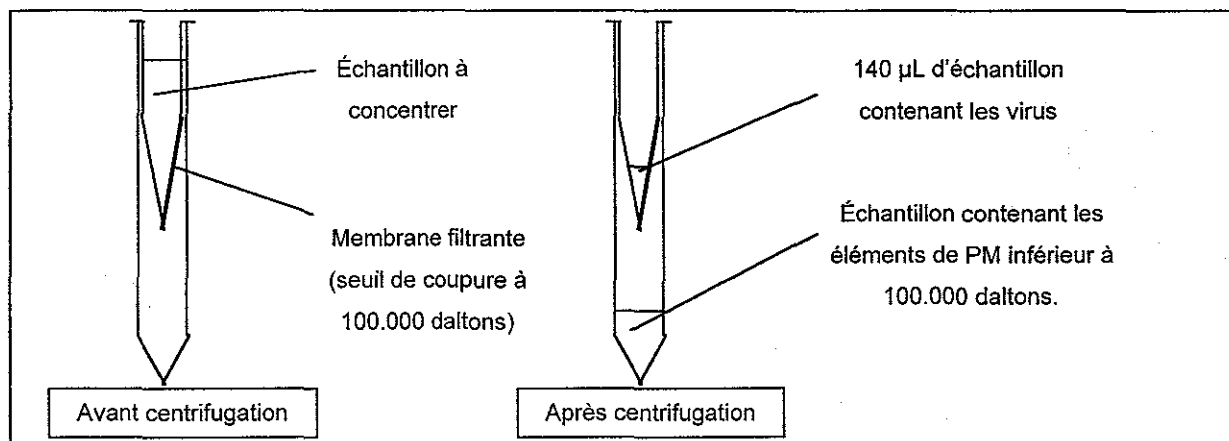
Le filtre et le préfiltre sont ensuite élués par immersion dans 4,6 mL de tampon glycine (0,4 %), extrait de viande stérile (1 %) à pH=9,5 dans des boîtes de pétri de 55 mm. Après dix minutes d'agitation à 100 rpm, l'éluat est centrifugé à 1500 g pendant 10 minutes et le surnageant est pipeté (environ 4 mL) et mesuré précisément. Le pH est ajusté à 7,2 par ajout d'acide chlorhydrique fumant. L'éluat est alors réparti en deux volumes égaux dans des cryotubes (environ 2mL/tube) et placés à $-80^{\circ}C$. L'un de ces cryotubes sera utilisé pour la recherche de génome viral par RT-PCR après concentration par

ultrafiltration, et l'autre pour la recherche d'*entérovirus* infectieux par inoculation sur cultures cellulaires.

2.2.2 Ultrafiltration pour la recherche du génome viral

L'éluat d'eau de rivière obtenu précédemment par filtration/élution et conservé à -80°C est introduit, après décongélation à température ambiante, dans un tube d'ultrafiltration (Millipore, UFV4BHK00) qui est soumis à une centrifugation de 5 minutes à 3100 g ce qui permet de concentrer l'échantillon sous 140 μL environ à partir d'un volume de 2 mL (Figure 25). Si le volume restant est inférieur à 140 μL , celui-ci est ajusté à l'aide d'une solution stérile de PBS (BioMérieux, 75511). La membrane d'ultrafiltration est rincée plusieurs fois avec l'échantillon, puis ce dernier est récupéré en totalité pour subir l'étape d'extraction de l'ARN.

Figure 25 : Principe de l'ultrafiltration



3 Méthodes de détection et de quantification des microorganismes étudiés

Les différents indicateurs bactériens, phagiques ainsi que les virus pathogènes ont été mis en évidence à l'aide de méthodes spécifiques.

3.1 Les indicateurs de la contamination fécale

Six indicateurs de contamination fécale ont été étudiés. Parmi eux, trois sont de nature bactérienne : les coliformes thermotolérants, les entérocoques et les spores de bactéries anaérobies sulfite-réductrices ; et trois sont de nature virale : les coliphages somatiques, les bactériophages F-spécifiques et les phages de *Bacteroides fragilis*.

3.1.1 Les coliformes thermotolérants

La mise en évidence et la quantification des coliformes thermotolérants sont réalisées selon les modalités décrites dans la norme ISO 9308/1 (1990), à l'aide d'une rampe de filtration en acier inoxydable (Sartorius GmbH SM16824).

La méthode consiste à filtrer un volume d'eau connu à travers une membrane stérile à base d'esters cellulosiques de 47 millimètres de diamètre et de 0,45 µm de porosité (Millipore HAWG047S3). Les bactéries, présentes en suspension dans l'échantillon d'eau à analyser, sont retenues à la surface de cette membrane.

Après filtration, la membrane est déposée face de retenue vers le haut, sur du milieu mFC (Merck 11278.0500) coulé en boîtes de Pétri. Celles-ci sont incubées à 44°C +/-0,25°C pendant 18 à 24 heures. À l'issue de la période d'incubation, les colonies présentant une coloration bleue sont dénombrées.

Le volume d'échantillon filtré (pur ou dilué) est de 10 à 100 mL, selon la nature de l'eau analysée. Les résultats sont exprimés en unités formant colonies pour 100 millilitres (ufc/100 mL) selon la formule : $[(N.F)/V].100$ où N est le nombre de colonies comptées, V le volume analysé et F le facteur de dilution.

3.1.2 Les entérocoques

Les entérocoques sont mis en évidence et quantifiés selon la norme ISO 7899/2 (1984) à l'aide d'une rampe de filtration en acier inoxydable (Sartorius GmbH SM16824).

Après filtration d'un volume connu d'échantillon d'eau à analyser sur une membrane filtrante stérile en nitrate de cellulose de 47 mm de diamètre et de 0,45 µm de porosité (Millipore HAWG047S3), celle-ci est appliquée sur le milieu nutritif gélosé de Slanetz et Bartley (Merck 1052620500). Ce milieu présomptif contient de l'azoture de sodium (inhibiteur de la croissance des entérobactériacées) et du chlorure 2,3,5-triphényl-tétrazolium (indicateur incolore réduit par les streptocoques fécaux et qui leur donne une coloration rouge).

La membrane est mise à incuber à 37°C +/-1 pendant 40 à 48 heures ce qui permet le développement des colonies d'entérocoques présumés qui apparaissent rouges, violettes ou roses, soit en leur centre, soit à leur périphérie.

Les colonies d'entérocoques présumés sont transférées sur le milieu confirmatif gélosé BEA ou Bile Esculine Agar (Merck 1114320500) et placées à 44 +/-1°C pendant 1 à 2 heures. Les entérocoques hydrolysant l'esculine, le produit final, la dihydroxy-6,7 coumarine se combine avec les ions fer (III) et donne un composé de coloration foncée à noire qui diffuse dans le milieu.

Le volume d'échantillon filtré (pur ou dilué) est de 10 à 100 mL, selon la nature de l'eau analysée. Les résultats sont exprimés en unités formant colonies pour 100 millilitres (ufc/100 mL) selon la formule : $[(N.F)/V].100$ où N est le nombre de colonies comptées, V le volume analysé et F le facteur de dilution.

3.1.3 Les spores de bactéries anaérobies sulfito-réductrices

La mise en évidence des spores est réalisée selon la méthode préconisée par la norme ISO 6461/1 (1986). L'échantillon d'eau est d'abord chauffé à 80°C +/-2°C pendant 10 minutes afin de détruire les formes bactériennes végétatives, puis, après refroidissement, il est incorporé à du milieu SPS agar (réf: Merck 1102350500) en surfusion à 45°C utilisé comme révélateur du caractère réducteur des germes sulfito-réducteurs.

Sont considérées comme anaérobies sulfito-réductrices les colonies réduisant le sulfite de sodium en sulfure de fer qui apparaissent noires ou entourées d'un halo noir.

Le volume d'échantillon incorporé (pur ou dilué) est de 1 à 3 mL dans 10 mL de milieu SPS selon la nature de l'eau analysée. Deux lectures sont pratiquées, à 24 et 48 heures. Le résultat est exprimé en unités formant colonies pour 100 millilitres (ufc/100 mL).

3.1.4 Les coliphages somatiques

La mise en évidence et la quantification des coliphages somatiques ont été réalisées selon la norme ISO/FDIS 10705-2 (1999). La composition de tous les milieux, ainsi que le protocole de conservation de la souche hôte et du bactériophage témoin sont décrits en annexe 2.

Sur le plan pratique, cette méthode consiste à :

- préparer une culture, en phase exponentielle de croissance (environ 3 heures à 37°C, contrôlée par une mesure d'absorbance à 620 nm) d'*Escherichia coli* WG5 souche ATCC 700078,
- faire fondre du milieu gélosé (ssMSA), le compléter à l'aide d'une solution de CaCl₂ 1M (stérilisée par filtration 0,22 µm) à raison de 600 µL pour 100 mL de milieu, l'aliquoter en volume de 2,5 mL, puis le maintenir en surfusion dans un bain marie à 45°C ;
- mélanger :
 - * 2,5 mL de milieu ssMSA en surfusion à 45°C,
 - * 1 mL de la culture d'*Escherichia coli* WG5 en phase exponentielle,
 - * 1 mL d'échantillon à analyser, pur ou dilué ;
- couler le mélange, après homogénéisation à l'aide d'un vortex, en boîte de Pétri de 90 mm de diamètre contenant déjà une couche de gélose MSA ;
- incubé à 37°C, après solidification, pendant 8 à 12 heures.

La numération des plages de lyse est effectuée et rapportée au volume analysé. Le titre en coliphages somatiques est donné en unités formant plaque pour 100 millilitres (ufp/100 mL).

Afin de valider les résultats, le bactériophage ϕ X174 (souche ATCC 13706-B1) a été utilisé comme témoin positif. Il est le garant de la bonne réceptivité de la souche hôte et du bon déroulement de l'analyse. Un millilitre d'une suspension contenant environ 100 ufp/mL, aliquotée et conservée à -80°C, a été ainsi systématiquement titré lors de chaque série d'analyses.

3.1.5 Les phages F-spécifiques

La mise en évidence et la quantification des bactériophages F-spécifiques ont été réalisées selon la norme ISO/FDIS 10705-1 (1997). La composition de tous les milieux, ainsi que le protocole de conservation de la souche hôte et du bactériophage témoin sont décrits en annexe 2.

Sur le plan pratique, cette méthode consiste à :

- préparer une culture, en phase exponentielle de croissance (environ 3 heures à 37°C, contrôlée par une mesure d'absorbance à 620 nm) de *Salmonella typhimurium* modifiée WG49 souche ATCC 700730,
- faire fondre du milieu gélosé (ssTYGA), le compléter à l'aide d'une solution de Glucose-Calcium 1M (stérilisée par filtration 0,22 µm) à raison de 1 mL pour 100 mL de milieu, l'aliquoter en volume de 2,5 mL, puis le maintenir en surfusion dans un bain marie à 45°C ;
- mélanger :
 - * 2,5 mL de milieu ssTYGA en surfusion à 45°C,
 - * 1 mL de la culture de *Salmonella typhimurium* WG49 en phase exponentielle,
 - * 1 mL d'échantillon à analyser, pur ou dilué ;
- couler le mélange, après homogénéisation à l'aide d'un vortex, en boîte de Pétri de 90 mm de diamètre contenant déjà une couche de gélose TYGA ;
- incubé à 37°C, après solidification, pendant 12 à 18 heures.

La numération des plages de lyse est effectuée et rapportée au volume analysé. Le titre en bactériophages F-spécifiques est donné en unités formant plaque pour 100 millilitres (ufp/100 mL).

Afin de valider les résultats, le bactériophage MS2 (souche ATCC 15597-B1) sert de témoin positif. Il est le garant de la bonne réceptivité de la souche hôte et du bon déroulement de l'analyse. Un millilitre d'une suspension contenant environ 100 ufp/mL, aliquotée et conservée à -80°C, a été ainsi systématiquement titré lors de chaque série d'analyses.

3.1.6 Les phages de *Bacteroides fragilis*

La mise en évidence et la quantification des phages de *Bacteroides fragilis* ont été réalisées selon la norme ISO/FDIS 10705-4 (1999). La composition de tous les milieux, ainsi que le protocole de conservation de la souche hôte et du bactériophage témoin sont décrits en annexe 2.

Sur le plan pratique, cette méthode consiste à :

- préparer une culture, en phase exponentielle de croissance (environ 6 heures à 37°C, contrôlée par une mesure d'absorbance à 620 nm) de *Bacteroides fragilis* RYC2056 souche ATCC 700786. Cette culture s'effectue en anaérobiose dans des tubes en verre de 25 mL complètement remplis et hermétiquement fermés,
- faire fondre du milieu gélosé (ssBPRMA), le compléter à l'aide d'une solution de Na₂CO₃ (stérilisée par filtration 0,22 µm) à raison de 2,5 mL pour 100 mL de milieu et d'une solution d'Hémine (stérilisée par autoclavage 121°C, 15 min.) à raison de 1 mL pour 100 mL de milieu. Le pH est alors ajusté à 6,8

(+/-0,5) par ajout de 250 µL d'une solution de HCl fumant. Le milieu obtenu est aliquoté en volume de 2,5 mL, puis maintenu en surfusion dans un bain marie à 45°C ;

- mélanger :

* 2,5 mL de milieu ssBPRMA en surfusion à 45°C,

* 1 mL de la culture de *Bacteroides fragilis* RYC 2056 en phase exponentielle,

* 1 mL d'échantillon à analyser, pur ou dilué ;

- couler le mélange, après homogénéisation à l'aide d'un vortex, en boîte de Pétri de 90 mm de diamètre contenant déjà une couche de gélose BPRMA;

- incuber en anaérobiose à 37°C, après solidification, pendant 12 à 18 heures.

L'anaérobiose est obtenue à l'intérieur de boîtes hermétiques grâce à des sachets « GENbox anaer » (BioMérieux 96124) et contrôlée à l'aide de bandelettes indicatrices (BioMérieux 96118) dont la couleur bleue en présence d'oxygène vire au blanc en milieu anaérobie.

La numération des plages de lyse est effectuée et rapportée au volume analysé. Le titre en phages de *Bacteroides fragilis* est donné en unités formant plaque pour 100 millilitres (ufp/100 mL).

Afin de valider les résultats, le bactériophage B56-3 (souche ATCC 700786-B1) sert de témoin positif. Il est le garant de la bonne réceptivité de la souche hôte et du bon déroulement de l'analyse. Un millilitre d'une suspension contenant environ 100 ufp/mL, aliquotée et conservée à -80°C, a été ainsi systématiquement titré lors de chaque série d'analyses.

3.2 Les virus pathogènes

Au cours de cette étude, il a été choisi de rechercher les *entérovirus* et les *NLV* GGII dans l'eau de rivière après concentration (cf. §2.2 p79). La détection a été réalisée par mise en évidence du génome viral pour les *entérovirus* et les *NLV*. Les échantillons positifs en *entérovirus* ont également été analysés par inoculation sur cultures cellulaires (infectiosité).

Par ailleurs, la recherche quantitative du génome viral et des particules infectieuses a été réalisée lors des expériences de survies pour lesquelles du *poliovirus* de type 1 a été rajouté dans l'eau de rivière comme modèle de virus pathogène (cf. §6.1 p95).

3.2.1 Mise en évidence du génome viral par RT-PCR (méthode qualitative)

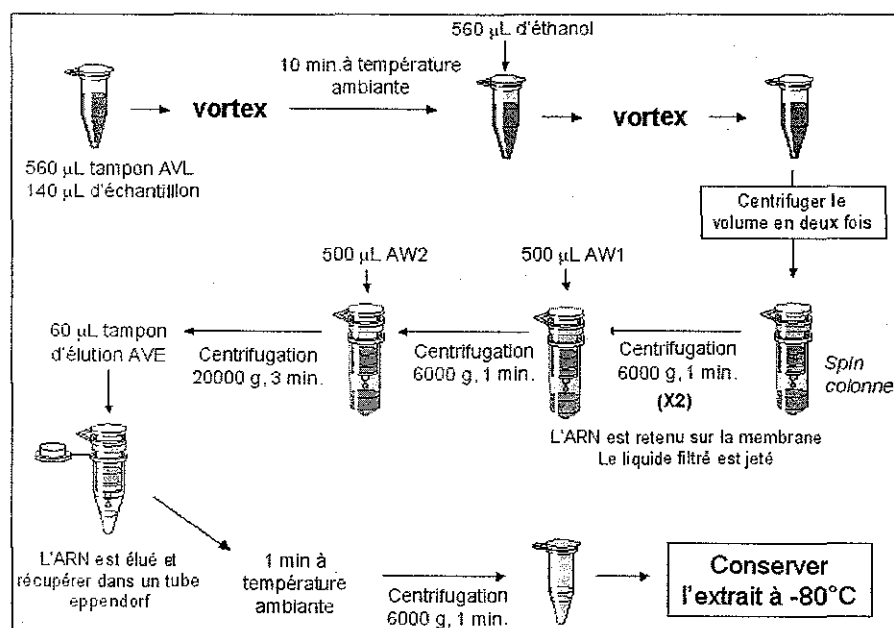
Le génome viral a été recherché dans des échantillons d'eau de rivière après concentration-élution, puis ultrafiltration, soit à partir d'un volume de 140µL.

À partir de ce concentrat, la mise en évidence de l'ARN viral par RT-PCR s'effectue en quatre étapes distinctes : l'extraction de l'ARN viral, la Rétro-Transcription (RT), la Polymerase Chain Reaction (PCR), et la détection du fragment de génome amplifié.

3.2.1.1 Extraction du génome viral

Le but de cette étape est de libérer l'ARN de la capside virale, d'éliminer une partie des inhibiteurs et d'inactiver les ribonucléases (RNases). L'ARN viral est extrait à l'aide du kit « QIAamp Viral RNA » (QIAGEN ; 52904) selon le protocole schématisé dans la Figure 26. L'extraction est réalisée en faisant passer l'échantillon dans une « spin colonnes » contenant une membrane sur laquelle se fixe l'ARN. Après deux lavages et une élution à l'aide d'une solution tampon, l'ARN est récupéré dans un tube eppendorf qui est ensuite congelé à -80°C et constitue l'extrait.

Figure 26 : Protocole d'extraction de l'ARN viral à l'aide du kit « QIAamp Viral RNA »



Un deuxième kit d'extraction de l'ARN viral a été testé dans le cadre de la recherche du génome de virus pathogènes dans l'eau de rivière. Il s'agit du « RNeasy Plant Mini Kit ». Le protocole est similaire à celui du kit « QIAamp Viral RNA » avec un traitement préliminaire de l'échantillon au β -mercaptoéthanol.

3.2.1.2 Rétro-transcription (RT)

La rétro-transcription permet de transcrire l'ARN viral en ADN complémentaire ou ADNc.

Le volume réactionnel de 20 μL est composé de :

- 5 μL d'extrait à analyser ;
- 1 μL d'amorce dont la séquence dépend de l'ARN cible.

Les amorces utilisées sont :

Pour les entérovirus	Ent2 (oligo 2)	5'-ATTGTCACCATAAGCAGCCA-3'
Pour les calicivirus GGII	NVP110	5'-ACDATYTCATCATCACCATA-3'

Ent2 (10 μ M) est utilisé en concentration finale de 0,5 μ M ;
NVP110 (66 μ M) est utilisé en concentration finale de 3,3 μ M

Ce mélange de 6 μ L est dénaturé par chauffage à 95°C pendant 3 minutes dans un thermocycleur GeneAmp 2700 (Applied Biosystem) puis refroidi rapidement à 4°C. Ceci permet de linéariser l'ARN afin de faciliter l'action ultérieure de la reverse transcriptase.

Sont alors ajoutés 14 μ L d'un mix constitué de:

- 4,6 μ L d'eau traitée au DEPC (Sigma W4502),
- 1,4 μ L de T4gene32 à 1 μ g/ μ L (Roche, 972 991),
- 4 μ L de tampon 5X de rétro transcription (Promega, M515A),
- 1 μ L d'inhibiteur de RNase à 40 unités/ μ L (Promega, N2115),
- 2 μ L de désoxynucléosides triphosphate à 10 mM (PE, N808-0260),
- 1 μ L d'AMV reverse transcriptase à 8 unités/ μ L (Promega, M510A).

La rétro transcription est réalisée dans un thermocycleur GeneAmp 2700 (Applied Biosystem). Le mélange est porté à 42°C, pendant 60 minutes, puis par chauffage à 95°C pendant 5 minutes, la reverse transcriptase est inactivée et les hybrides ARN-ADN sont dénaturés. L'ADNc peut alors être amplifié par polymérase chain reaction ou PCR.

3.2.1.3 Amplification par PCR

Cinq microlitres d'ADNc prélevés directement du milieu réactionnel ayant servi à la rétro-transcription sont ajoutés à 45 μ L de "Mix PCR" contenant :

- 23 μ L d'eau traitée au DEPC (Sigma W4502),
- 11 μ L de glycérol à 20%,
- 5 μ L de tampon PCR 10X (Qiagen, 1005479),
- 5 μ L de désoxynucléosides triphosphate à 10 mM (PE, N808-0260),
- 0,5 μ L de l'amorce (Ent1 ou SR46),
- 0,5 μ L de l'amorce (Ent2 ou NVP110),
- 0,3 μ L de Taq polymérase (PE, N808-0161).

Les amorces utilisées sont :

Pour les <i>entérovirus</i>	Ent2	5'-ATTGTCACCATAAGCAGCCA-3'
	Ent1	5'CGGTACCTTTGTACGCCTGT-3'
Pour les <i>calicivirus</i> GGII	NVP110	5'-ACDATYTCATCATCACCATA-3'
	SR46	5'-TGGAATTCCATCGCCCACTGG-3'

Les amorces Ent1 et Ent2 (10 μ M) sont utilisées en concentration finale de 0,1 μ M ;

Les amorces NVP110 et SR46 (66 μ M) sont utilisées en concentration finale de 1 μ M ;

L'amplification est effectuée dans un thermocycleur GeneAmp 2700 (Applied Biosystem). Après 4 minutes à 95°C, l'échantillon est soumis à 32 cycles comprenant chacun 1 minute à 94°C pour la dénaturation, 30 secondes à 50°C pour l'hybridation et 1 minute à 72°C pour l'élongation. À la fin des 32 cycles, l'échantillon est maintenu à 72°C pendant 10 minutes.

Au cours de certaines expérimentations, la Taq polymérase (PE, N808-0161) a été remplacée par 0,3 µL de Hot Start à 5 unités/µL (Qiagen, 1007837). Dans ce cas, les cycles d'amplification ont été modifiés : après 15 minutes à 95°C, 45 cycles d'amplification sont réalisés à raison de 30 secondes à 94°C pour la dénaturation, 30 secondes à 50°C pour l'hybridation et 30 secondes à 72°C pour l'élongation. Comme précédemment, à la fin des 45 cycles, l'échantillon est maintenu à 72°C pendant 10 minutes.

3.2.1.4 Utilisation d'un étalon interne lors de la recherche de génome viral

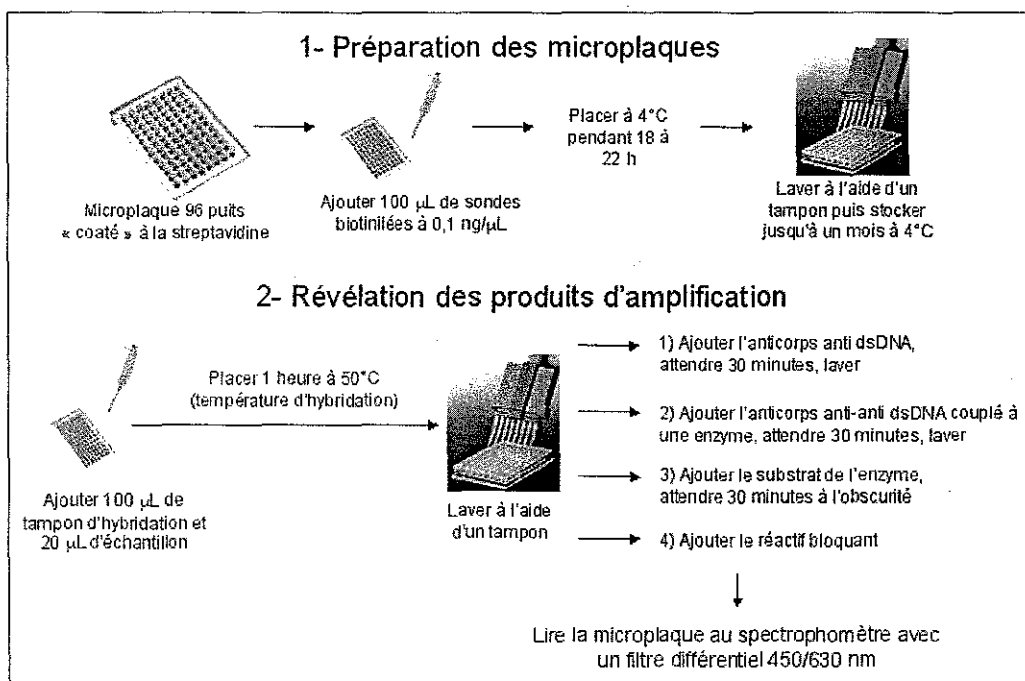
L'ajout d'un étalon interne dans chaque échantillon sert à valider les résultats négatifs de RT-PCR dans la mesure où il constitue un témoin positif de la réaction. Si l'étalon interne est mis en évidence, cela signifie que la RT-PCR s'est correctement déroulée et que les résultats obtenus pour les différents génomes viraux peuvent être validés.

L'étalon est un fragment d'ARN de 281 bases originaire d'un plasmide bactérien auquel ont été greffés des nucléotides complémentaires de l'amorce Ent2 utilisée pour la mise en évidence des *entérovirus*. Cet étalon a été aimablement fourni par Benoît Gassilloud.

3.2.1.5 Révélation des produits d'amplification

La mise en évidence des produits d'amplification est réalisée à l'aide d'un kit DNA Enzyme Immuno Assay ou DEIA (DiaSorin PS0001). Ce test est fondé sur l'hybridation de l'ADN amplifié avec une sonde oligonucléotidique immobilisée sur les parois de puits de microplaques grâce à une liaison streptavidine-biotine. L'hybride est détecté à l'aide d'un anticorps anti-ADN double brin couplé à un traceur enzymatique. L'ajout du substrat de l'enzyme permet d'identifier par colorimétrie les puits où l'hybridation a eu lieu. Les résultats sont exprimés en valeur d'absorbance à l'aide d'un lecteur de microplaques doté de filtres 450/630 nm. Sont considérées comme positives les valeurs d'absorbance supérieures à la valeur moyenne du témoin négatif d'au moins 0,150 unités d'absorbance. Les modalités pratiques de réalisation du test sont résumées dans la Figure 27.

Figure 27 : Protocole du DEIA



Les sondes biotinillées utilisées sont :

Étalon <i>entérovirus</i>	Amp	5'-GACGGCCAGGTCCGGATG(biotine)-3'
<i>Entérovirus</i>	Ent	5'-TCCTCCGGCCCCCTGAATGCG(biotine)-3'
<i>Calicivirus</i> GGI	SR47	5'-ATGTCAGGGGACAGGTTTGT(biotine)-3'
	SR61	5'-ATGTCGGGGCCTAGTCCTGT(biotine)-3'
	SR67	5'-ACATCTGGTGAGAGACCTGA(biotine)-3'

3.2.2 Quantification du génome viral par RT-PCR quantitative

Cette technique a été utilisée pour la recherche quantitative du génome de *poliovirus* 1 lors des expériences de survie décrit dans le §6.1.

3.2.2.1 Extraction du génome viral

L'ARN viral est extrait à l'aide du kit « QIAamp Viral RNA » (QIAGEN ; 52904) comme décrit précédemment.

3.2.2.2 Rétro-transcription (RT)

La rétro-transcription est réalisée comme indiqué au §3.2.1.2. 1 μ L d'amorce reverse ENT-r est utilisé à la concentration de 0,5 μ M (Tableau 24).

3.2.2.3 Amplification par PCR

5 µL d'ADNc prélevés du milieu réactionnel de rétro-transcription sont ajoutés à 45 µL de "Mix PCR" contenant 14,5 µL d'eau traitée au DEPC (Sigma W4502), 25 µL de 2X TaqMan Universal PCR Master Mix (Perkin ELMER, 4304437); 2,5 µL d'amorce sens soit 0,5 µM en concentration finale (eurogentec), 2,5 µL d'amorce antisens soit 0,5 µM en concentration finale (eurogentec) et de 0,5 µL de sonde TaqMan soit 0,5 µM en concentration finale sur laquelle est liée de façon covalente les fluorochromes FAM (6-carboxyfluoresceine) en 5' et TAMRA (6-carboxy-N,N,NN';N'-tetramethylrhodamine) en 3'. L'échantillon est chauffé 2 minutes à 50°C, puis 10 minutes à 95°C, et amplifié durant 50 cycles à raison de 15 secondes à 95°C et 1 minute à 60°C à l'aide du thermocycler 7700 (Perkin Elmer). Le paramètre mesuré au cours de l'amplification est le Ct. Il représente le cycle à partir duquel la fluorescence est considérée comme significativement différente de la ligne de base ou seuil. Le Ct obtenu est directement proportionnel à la quantité d'ADN de départ.

Tableau 24 : Amorces et sonde utilisées pour la recherche quantitative de génome de *poliovirus* 1

Type	Nom	Reaction	Séquence (5' to 3')	Position
Amorce	ENT-r	RT and PCR	5'-CAAGATTGGTTCCTGCTTGATCTT-3'	5648-5625
Amorce	ENT-f	PCR	5'-AGCATTGTGATCGATGGCAA-3'	5573-5592
Sonde	ENT-p	PCR	5'-f-AGATCTTGGATGCCAAAGCGCTCG-t-3' (*)	5601-5624

* f : FAM reporter dye, t : Tamra quencher dye

3.3 Mise en évidence des *entérovirus* infectieux sur culture cellulaire

Les *entérovirus* dont le *poliovirus* de type 1 sont mis en évidence par inoculation sur des cultures in vitro de cellules BGM. Ces cellules de rein de singe en lignées établies dont la subculture est possible pendant un temps *a priori* infini, sont sensibles à l'infection des *entérovirus* à l'exception de certains sérotypes de virus coxsackie A.

Milieux de culture :

Les milieux de culture sont constitués par du "Minimal Essential Medium" (MEM) de EAGLE (Eurobio réf : 010009) contenant 2,2 g.L⁻¹ de NaHCO₃ et de rouge de phénol à titre d'indicateur de pH. Les milieux sont stockés à 4°C.

Avant usage le milieu est additionné de sérum de veau nouveau-né (SVnn) (Eurobio réf : 010062) décomplémenté 30 min. à 56°C à raison de :

- 5 % pour un milieu de croissance (MEM 5 %)
- 1 % pour un milieu de survie (MEM 1 %)

Les milieux sont complétés avec 1 % d'une solution de L-glutamine (Sigma G-7513) et de 1 % d'une solution d'antibiotiques et d'antifongiques dont la composition dépend de l'utilisation du milieu. Ainsi,

pour les milieux de croissance et de survie, est ajoutée une solution de PS (Sigma P-4333) contenant 10,000 unités/ml de pénicilline et 10 mg/ml de streptomycine. Pour la recherche qualitative ou quantitative d'*entérovirus* infectieux, est ajoutée d'une solution d'ATBF (Sigma A-5955) contenant 10.000 unités de pénicilline G, 10mg/mL de streptomycine sulfate et 25µg/mL d'amphotéricine B.

Culture de cellules BGM :

Les cellules BGM sont conservées à -80°C dans des cryotubes, en suspension dans du MEM à 20 % de SVnn et de 10 % de diméthylsulfoxyde (DMSO) en tant que cryoprotecteur.

La suspension cellulaire est décongelée au bain marie à 37°C, ensemencée dans un flacon à fond plat de surface utile 175 cm² en présence de 20 mL de milieu de croissance. Les cellules sont incubées à 37°C sous atmosphère enrichie de 5 % de CO₂.

Les cellules sédimentent et se fixent sur le support. Avec l'épuisement du milieu, il est observé un virage au jaune du rouge de phénol présent dans le MEM, traduisant une acidification du milieu due au rejet de substances acides par le métabolisme cellulaire.

Il convient alors :

- si le tapis n'est pas continu, de remplacer le milieu par du milieu de croissance neuf ;
- si le tapis est continu, soit de remplacer le milieu par un milieu de survie, soit de réaliser une subculture, soit de récupérer les cellules pour les conserver.

Subculture par trypsination

La subculture a pour but de dissocier le tapis cellulaire pour obtenir des cellules individualisées qui, mises en présence d'un milieu de croissance, reformeront un tapis cellulaire uniforme. Pour ce faire, il est procédé à une trypsination à l'aide d'une solution stérile de trypsine-versène à 0,5 g/L de trypsine et 0,2 g/L d'EDTA (Sigma T3924).

Protocole de trypsination des cellules BGM :

- 1 A partir du tapis cellulaire, éliminer le milieu ;
- 2 Laver le tapis avec 10 mL de solution de trypsine-versène (pour les boîtes de 175 cm²) ;
- 3 Laisser agir deux minutes, puis éliminer cette solution ;
- 4 Ajouter 2 mL de solution de trypsine-versène et placer à 37°C ;
- 5 Après décollement du tapis cellulaire, ajouter 8 mL de milieu de culture ;
- 6 Agiter pour dissocier les cellules ;
- 7 Numérer sur cellule de Nageotte après dilution au 1/100^{ème}.

La distribution des cellules individualisées est réalisée :

- dans des flacons à fond plat de surface utile de 175 cm², à raison de 1,2.10⁷ cellules/boîte dans 50 mL de MEM 5 % SVnn, pour une subculture ;
- dans des flacons à fond plat de surface utile de 25 cm², à raison de 1,4.10⁵ cellules/boîte dans 7 mL de MEM 5 % SVnn, pour une recherche qualitative d'*entérovirus* ;

- dans des microplaques comprenant 96 puits, à raison de $1,5 \cdot 10^4$ cellules/puits dans du MEM 2,5% SVnn, pour une quantification.

Recherche qualitative des entérovirus :

Dans le cas de la recherche des *entérovirus* infectieux dans des échantillons de l'environnement, 1 mL de concentrat (cf § 2.2, p79) est décontaminé à l'aide de 10 % d'ATBF (Sigma A5955) pendant deux heures à température ambiante et inoculé sur un tapis cellulaire dans un flacon à fond plat de surface utile 25 cm².

Ces cellules sont incubées à 37°C sous atmosphère enrichie à 5 % de CO₂ et sont soumises quotidiennement à l'observation microscopique pour la recherche d'un effet cytopathogène (ECP). Après 6 jours d'incubation, si des ECP sont visualisés au microscope, la présence d'*entérovirus* infectieux est possible. Elle est confirmée par un deuxième passage sur cellules BGM.

Si aucun ECP n'est observé après 6 jours d'incubation, les cellules sont soumises à trois cycles successifs de « congélation-décongélation » pour les détruire et libérer ainsi d'éventuelles particules virales. À partir du liquide obtenu il est alors procédé à une recherche du génome viral sur 140 µL par RT-PCR suivie d'un DEIA (cf § 3.2.1 p84). Cette technique, plus sensible que la culture cellulaire, permet, si le résultat est négatif, de conclure à l'absence d'*entérovirus* infectieux dans les échantillons. Dans le cas d'un résultat positif par DEIA, il est considéré qu'il y avait présence d'*entérovirus* infectieux dans l'échantillon.

Quantification du poliovirus :

Dans le cas de la recherche du *poliovirus* infectieux lors des expérimentations de survie, l'échantillon est préalablement décontaminé pendant deux heures à température ambiante par ajout d'une solution d'ATBF à raison de 10 % (vol/vol).

Les *poliovirus* sont quantifiés en milieu liquide par la méthode du Nombre le Plus Probable (NPP) en utilisant des microplaques de 96 puits ensemencées successivement par :

- 200 µL de milieu MEM 2,5 % contenant environ $7,5 \cdot 10^4$ cellules BGM par mL ;
- 50 µL de dilution virale (sauf pour les témoins).

La quantification est effectuée sur au moins 3 dilutions successives de chaque échantillon. Chaque dilution est inoculée dans 40 puits. Une plaque regroupe donc 2 dilutions (80 puits) et 16 témoins cellulaires.

Les plaques sont placées à l'étuve à 37°C sous atmosphère enrichie à 5 % de CO₂. Après 6 jours, il est noté, pour chaque dilution, le nombre de cupules présentant un effet cytopathogène (ECP). Un triplet d'ECP pour chaque échantillon est ainsi obtenu.

Le calcul du Nombre le Plus Probable d'Unités Cytopathogènes (NPPUC) de virus contenus dans un inoculum est réalisé en mettant en oeuvre le programme informatique de Maul (1991). Les résultats sont exprimés en NPPUC/mL.

4 Les analyses Physico-chimiques

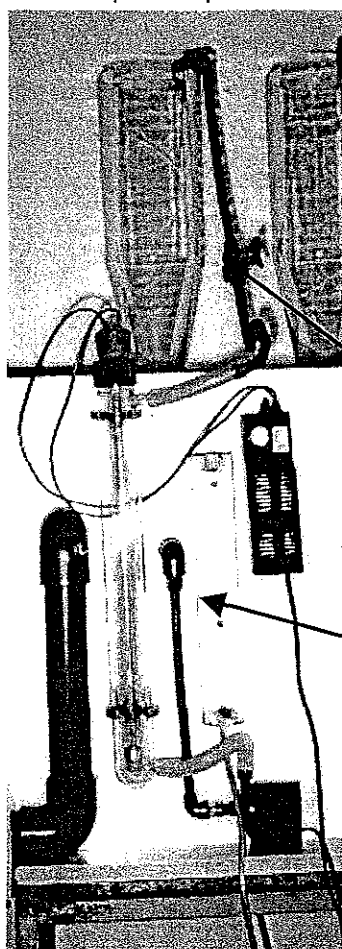
La température (thermomètre électronique CHECKTEMP 1), Le pH (HANNA HI 8424), la conductivité (BIOBLOCK WTW LF 320) et la turbidité (HACH 2100N) ont été mesurés pour chaque eau analysée. Concernant les eaux de rivière, les valeurs de débit nous ont été communiquées par la DIREN (Direction Régionale de l'environnement). Ces valeurs concernent le débit mesuré à Pont St Vincent, situé entre les sites de Méréville (site 1) et Maron (site 2).

S'agissant des eaux de rivière utilisées dans les études de survie, des analyses plus complètes ont été réalisées par le laboratoire d'hygiène et de recherche en santé publique (LHRSP) de Vandoeuvre (54). Les résultats de ces analyses figurent en annexe 6 (bis).

5 Détermination de la sensibilité aux ultra-violets des indicateurs présents dans les eaux usées

L'évaluation de la sensibilité des trois indicateurs bactériens et des trois bactériophages au rayonnement ultra-violet (UV) a été réalisée au laboratoire à l'aide d'un pilote (Figure 28).

Figure 28 : Description du pilote UV



Le pilote UV est constitué :

- d'un réservoir d'une capacité de 10 L ;
- d'une pompe électrique permettant la circulation d'eau à débit constant ;
- d'une chambre d'irradiation contenant une lampe UV devant laquelle circule une lame d'eau.

Réservoir d'eau

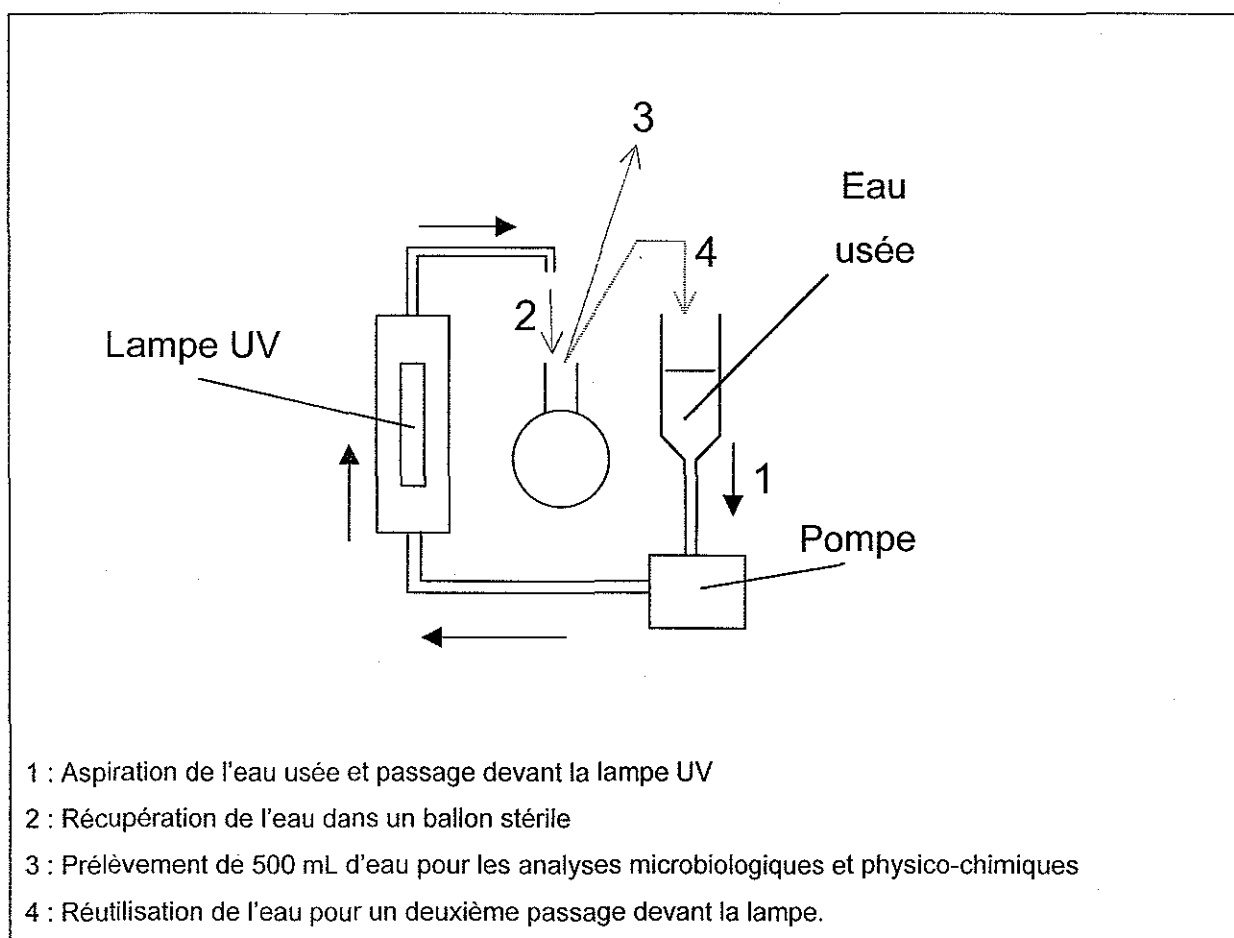
Chambre d'irradiation
contenant la lampe UV

Pompe

5.1 Réalisation du test

La Figure 29 présente le principe de fonctionnement du pilote UV. Cinq litres d'eaux usées passent devant une lampe UV avec un débit constant. La totalité est récoltée dans un ballon stérile afin de permettre le prélèvement des volumes nécessaires aux différentes analyses microbiologiques (500 mL). Cette même eau est réutilisée pour un deuxième, puis un troisième passage devant la lampe UV. À chaque passage un nouveau prélèvement de 500 mL est effectué. Deux lampes ont été utilisées, l'une d'une puissance de 8 W et l'autre d'une puissance de 15 W ce qui a permis de tester un total de 4 doses UV pour chaque microorganisme (Tableau 27). Les lampes de 8 et de 15 W ayant des tailles différentes, elles nécessitent deux chambres d'irradiation de dimension adaptée.

Figure 29 : Schéma du pilote UV



5.2 Les eaux analysées

Pour ces expériences, des eaux usées traitées ont été utilisées. Prélevées en sortie de la station d'épuration de Nancy au niveau du décanteur secondaire, ces eaux présentent une turbidité 20 fois moins importante en moyenne que les eaux usées brutes mais sont suffisamment chargée en

microorganismes pour permettre d'évaluer leur résistance relative au rayonnement ultra violet. Les caractéristiques de ces eaux sont les suivantes :

- pH moyen : 7,49 (+/-0,15) ;
- turbidité moyenne : 2,90 NTU (+/-0,84) ;
- conductivité moyenne 768 $\mu\text{S}/\text{cm}$ (+/-201).

Les concentrations moyennes en microorganismes dans les eaux analysées sont indiquées dans le Tableau 25.

Tableau 25 : Concentrations moyennes en microorganismes (log ufc ou ufp/100mL) dans les eaux usées traitées de la station d'épuration de Nancy avant irradiation UV

n=8	Coliformes thermotolérants	Entérocoques	Spoires	Coliphages somatiques	Phages F-spécifiques	Phages de Bf
Moyenne	4,58	4,21	2,95	5,01	4,11	2,77
Ecart-type	0,56	0,38	0,28	0,31	0,48	0,45

5.3 Calcul de la dose UV

La dose UV germicide a été calculée à l'aide de l'équation suivante (Boher, 1991) :

$$D = [P.t.\exp(-kx)] / S$$

Où **D** représente la dose germicide (W.s.m^{-2}), **P** la puissance de la lampe (W), **t** le temps de radiation (s), **k** le coefficient d'absorption à 254 nm de l'eau analysée, **x** l'épaisseur de la lame d'eau (m) et **S** la surface de la chambre d'irradiation (m^2).

Le Tableau 26 présente les paramètres à partir desquels ont été évaluées les doses UV germicides pour chacune des lampes après un passage. Pour les deuxième et troisième passages, les doses UV ont été calculées en multipliant les doses initiales par le nombre de passage. Ainsi, deux passages devant la lampe de 8 W correspond à deux doses de 29 mW.s.cm^{-2} , soit 58 mW.s.cm^{-2} . Le Tableau 27 présente les différentes doses UV appliquées en fonction de la lampe. Nous utiliserons le mW.s.cm^{-2} comme unité de la dose UV. Celui-ci est équivalent au mJ.cm^{-2} .

Tableau 26 : Calcul de la dose UV pour chacune des deux lampes

	Lampe 1	Lampe 2	Unité
Puissance (P)	8	15	W
Temps moyen pour passer 2L	20,00	20,00	s
Volume d'eau	0,06	0,335	l
Diamètre	0,022	0,042	m
Hauteur	0,24	0,44	m
Epaisseur de la lame d'eau (x)	0,006	0,007	m
Absorbance de l'eau à 254nm	0,2	0,2	%
Débit	0,10	0,10	l/s
Temps de passage (t)	0,60	3,35	s
Surface des lampes (S)	0,017	0,058	m^2
k	0,8	0,8	m^{-1}
D	288	865	W.s.m^{-2}
D	29	86	mW.s.cm^{-2}

Tableau 27 : Doses UV (en mW.s.cm⁻²) calculées en fonction de la lampe utilisée et du nombre de passage

Nombre de passages	Puissance de la lampe	
	8 W	15 W
0	0	0
1	29	86
2	58	172
3	87	(258)

6 Études expérimentales de survie des microorganismes

Pour ces expériences, de l'eau de la rivière Moselle a été prélevée en hiver (le 10 janvier) et en été (le 4 septembre) sur la commune de Maron (cf § 1.2.1, p76).

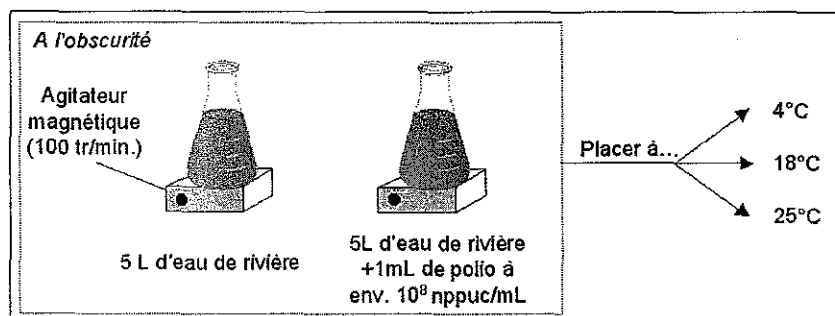
6.1 Survie des coliphages somatiques, des coliformes thermotolérants et du *Poliovirus* de type 1 dans l'eau de rivière en fonction de la température

La suspension de *poliovirus* de type 1 qui a servi à contaminer l'eau de rivière a été réalisée à l'aide d'une culture de cellules BGM qui a permis la multiplication du virus infectieux. Congelée puis décongelée trois fois, la suspension a ensuite été centrifugée (10000 g, 1 heure, 4°C). Le titre de la suspension virale était d'environ 2.10^8 NPPUC/mL. Ce stock viral a été conservé à -80°C.

L'eau de rivière est placée à différentes températures comme le montre la Figure 30. Deux milieux de survie sont ainsi constitués, l'un contenant uniquement de l'eau de rivière et l'autre contenant de l'eau de rivière additionnée de *poliovirus* infectieux. Afin que l'ajout de *poliovirus* n'influence pas la survie des coliformes thermotolérants ou des coliphages somatiques, la recherche de ces deux types de microorganisme n'a été réalisée qu'à partir de l'eau de rivière exempte de *poliovirus*.

Concernant le *poliovirus*, la quantification des particules infectieuses par culture cellulaire et la quantification du génome par RT-PCR quantitative ont été réalisées

Figure 30 : Protocole d'étude de la survie des coliphages, des coliformes et du *Poliovirus* dans l'eau de rivière en fonction de la température



6.2 Survie des coliphages somatiques et des coliformes thermotolérants en fonction de la composition de l'eau (eau de rivière – PBS)

Des coliformes thermotolérants et des coliphages somatiques isolés de l'eau de la Moselle ont été cultivés, puis congelés à -80°C (Figures 31 et 32). Ces suspensions, au titre élevé (10^{10} ufc/mL pour les coliformes et 10^8 ufp/mL pour les coliphages somatiques), ont permis d'inoculer 4 milieux constitués d'eau de rivière et de PBS (BioMérieux, 75511) en proportion variable comme indiqué sur la Figure 33.

Figure 31 : Préparation de la suspension de coliformes thermotolérants

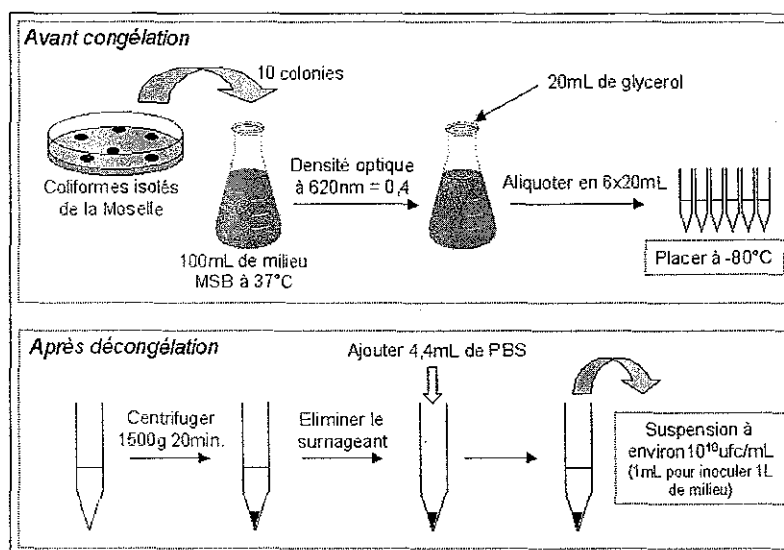


Figure 32 : Préparation de la suspension de coliphages somatiques

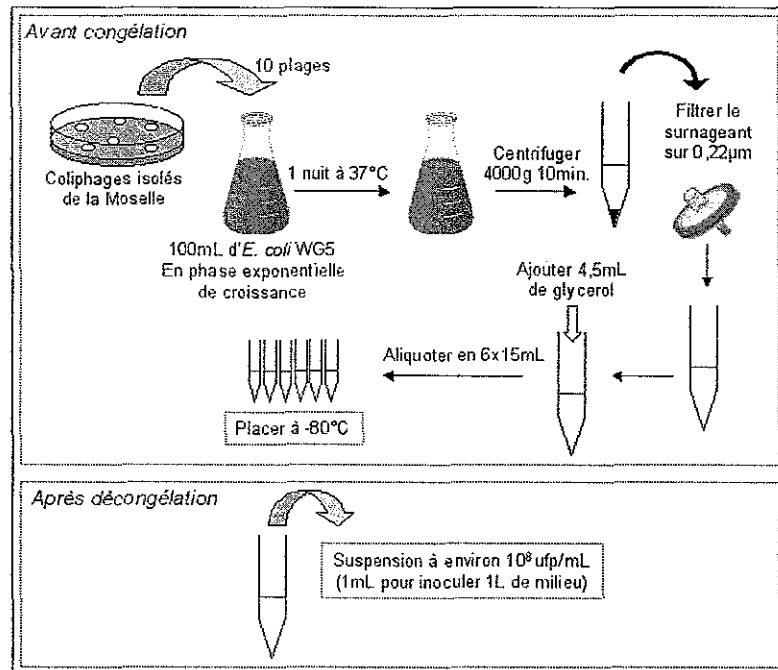
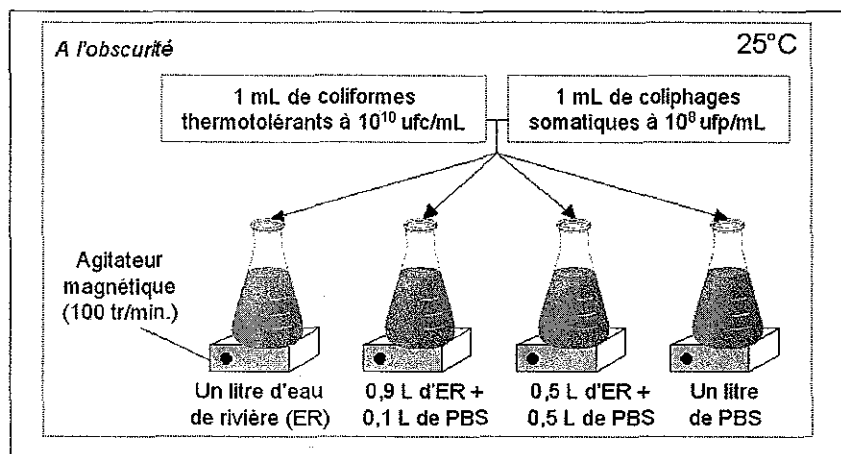


Figure 33 : Protocole de l'étude de survie des coliformes thermotolérants et de coliphages somatiques à 25°C en fonction de la composition de l'eau



Des prélèvements d'abord quotidiens, puis plus espacés, en fonction des résultats, sont réalisés pour quantifier les coliformes thermotolérants (cf § 3.1.1, p81) et les coliphages somatiques (cf § 3.1.4, p82).

7 Observation microscopique des coliformes thermotolérants au DAPI

Un volume de 4,5 mL d'échantillon à analyser est additionné de 0,5 mL d'une solution stérile de DAPI (4',6-Diamidino-2-phenylindole) (Sigma, D9542) à 0,5 µg/mL. Après agitation, le mélange est laissé à reposer pendant 10 minutes. Un millilitre de suspension bactérienne marquée au DAPI est filtré sur

une membrane en polycarbonate noire de porosité 0,22 µm (Nuclepore, 110656). Posée entre lame et lamelle, la membrane est placée sous un microscope (Zeiss, HBO 100 W/2) équipé d'une lampe à vapeur de mercure et munie d'un filtre d'excitation UV (330-385 nm) qui permet l'observation des bactéries marquées au DAPI. Des photos sont prises à l'aide d'une caméra (Photonic Science, D0498001) sur le microscope.

8 Calcul des abattements et analyses statistiques des résultats

Tous les abattements A obtenus après un temps t ou un traitement t ont été calculés à l'aide de la formule suivante :

$$A = \log C_t - \log C_0 \quad \text{où} \quad \begin{array}{l} C_t \text{ est la concentration au temps } t \text{ ou après un traitement } t \\ C_0 \text{ est la concentration initiale} \end{array}$$

Concernant les abattements de la concentration en génome viral à partir des valeurs de C_t , ils ont été obtenus à l'aide de la formule suivante :

$$A = (C_{t_0} - C_t) / 3,33 \quad \text{où} \quad \begin{array}{l} C_{t_0} \text{ est la valeur du } C_t \text{ initiale} \\ C_t \text{ est la valeur du } C_t \text{ au temps } t \end{array}$$

Tous les tests statistiques ont été réalisés à l'aide des logiciels Statistica ou StatView à l'exception du test de comparaison de pentes dont les résultats ont été calculés à partir d'Excel.

L'analyse statistique des résultats a été réalisée, sauf mention contraire, à partir des valeurs de concentration transformées en valeur logarithmique.

Il s'agit des tests suivants :

- Le test de Student ou « t-test » pour la comparaison de moyennes
- Le test de Student adapté à la « comparaison des pentes » de deux droites
- Le test de corrélation de Spearman (r_s) pour la recherche de corrélations (linéaire ou non linéaire)
- Le test des rangs de Wilcoxon qui permet la comparaison d'échantillons appariés
- Le test de Bartlett utilisé pour tester l'homogénéité des variances
- le test ANOVA pour la comparaison de moyennes

RÉSULTATS

CHAPITRE I

Détermination de l'impact des traitements d'épuration des eaux usées sur les indicateurs bactériens et phagiques de contamination fécale

1	Traitement primaire de décantation	100
2	Traitement secondaire par boues activées	100
3	Traitements tertiaires	102
3.1	<i>Le traitement tertiaire de déphosphatation</i>	102
3.2	<i>Le traitement tertiaire par rayonnement ultra-violet (UV)</i>	104
	Discussion	108

CHAPITRE I

Détermination de l'impact des traitements d'épuration des eaux usées sur les indicateurs bactériens et phagiques de contamination fécale

Dans les conditions optimales de fonctionnement, chaque type de traitement des eaux usées présente une capacité d'élimination des microorganismes qui lui est propre. Ainsi, lors de l'utilisation d'un traitement donné, il est indispensable de s'interroger à 2 niveaux :

- Le traitement fonctionne-t-il de manière optimale ?
- Quel est l'abattement minimum qu'il est possible d'envisager pour les microorganismes pathogènes lorsque le traitement fonctionne de manière optimale ?

Pour répondre à ces questions, il s'agit de savoir si les microorganismes indicateurs de contamination fécale des outils analytiques satisfaisants. Dans le premier cas, l'indicateur doit être le plus sensible possible aux traitements de manière à ce que la moindre défaillance se traduise par une variation de la mesure la plus importante possible. Dans le deuxième cas, l'indicateur doit être le plus résistant possible afin d'éviter toute sous-estimation de l'abattement en pathogène.

Les données de la littérature rapportent souvent le comportement de l'un ou l'autre des indicateurs par rapport à certains microorganismes pathogènes. Par contre, des données comparatives réalisées à partir de 6 indicateurs (coliformes thermotolérants, entérocoques, spores de bactéries anaérobies sulfito-réductrices, coliphages somatiques, bactériophages F-spécifiques et phages de *Bacteroides fragilis*) sont plus rares et constituent pourtant la base sur laquelle pourra être effectuée le choix d'un indicateur d'efficacité de traitement. De plus, ce type d'étude paraît indispensable pour chaque traitement car il est aujourd'hui clair que la recherche de l'indicateur universel est utopique.

Dans ce cadre, l'objectif de ce travail est de comparer le comportement de six indicateurs face à différents traitements des eaux usées :

- Le traitement primaire de décantation
- Le traitement secondaire d'épuration biologique par boues activées,
- Le traitement tertiaire de déphosphatation,
- Le traitement tertiaire de désinfection par rayonnement ultra-violet,

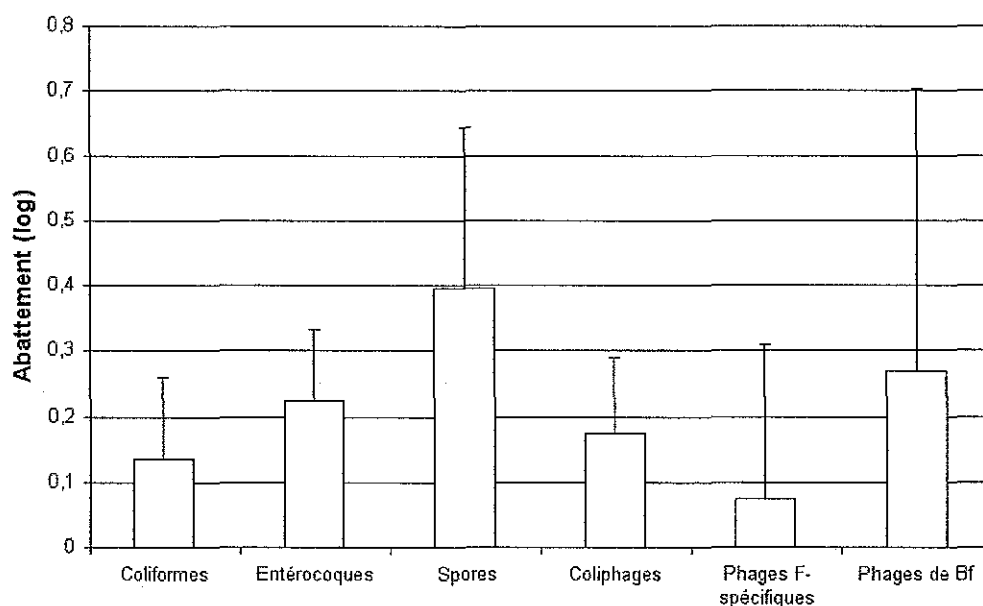
À partir des résultats obtenus, nous avons évalué l'influence des différents traitements sur les six microorganismes indicateurs ce qui nous permet de discuter de l'intérêt que présente chacun d'eux en tant qu'indicateur d'efficacité de traitement.

1 *Traitement primaire de décantation*

Les effets de la décantation primaire sur les microorganismes ont été évalués à partir d'échantillons provenant de la station d'épuration de Nancy. Dix échantillons d'eaux usées brutes ayant été prélevés avant et après le traitement de décantation primaire ont été analysés.

À la lecture des résultats représentés dans la Figure 34, il apparaît que la décantation primaire ne permet pas d'obtenir des abattements importants puisque ceux-ci varient de 0,07 log pour les bactériophages F-spécifiques à 0,40 log pour les spores. En fait, ces abattements ne diffèrent pas significativement d'un microorganisme à l'autre (test-t, $p > 0,05$) sauf pour les spores dont l'abattement est significativement plus important que celui des coliformes thermotolérants, des coliphages somatiques et des bactériophages F-spécifiques (test-t, $p < 0,05$).

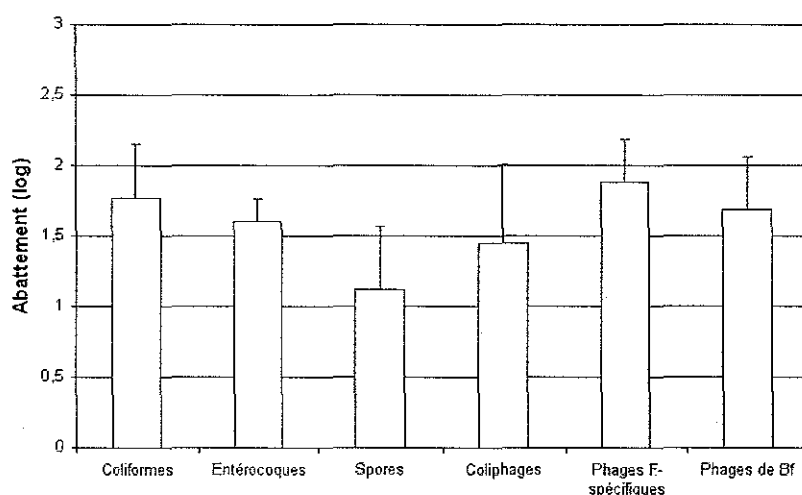
Figure 34 : Influence de la décantation primaire sur les différents microorganismes (n=10)



2 *Traitement secondaire par boues activées*

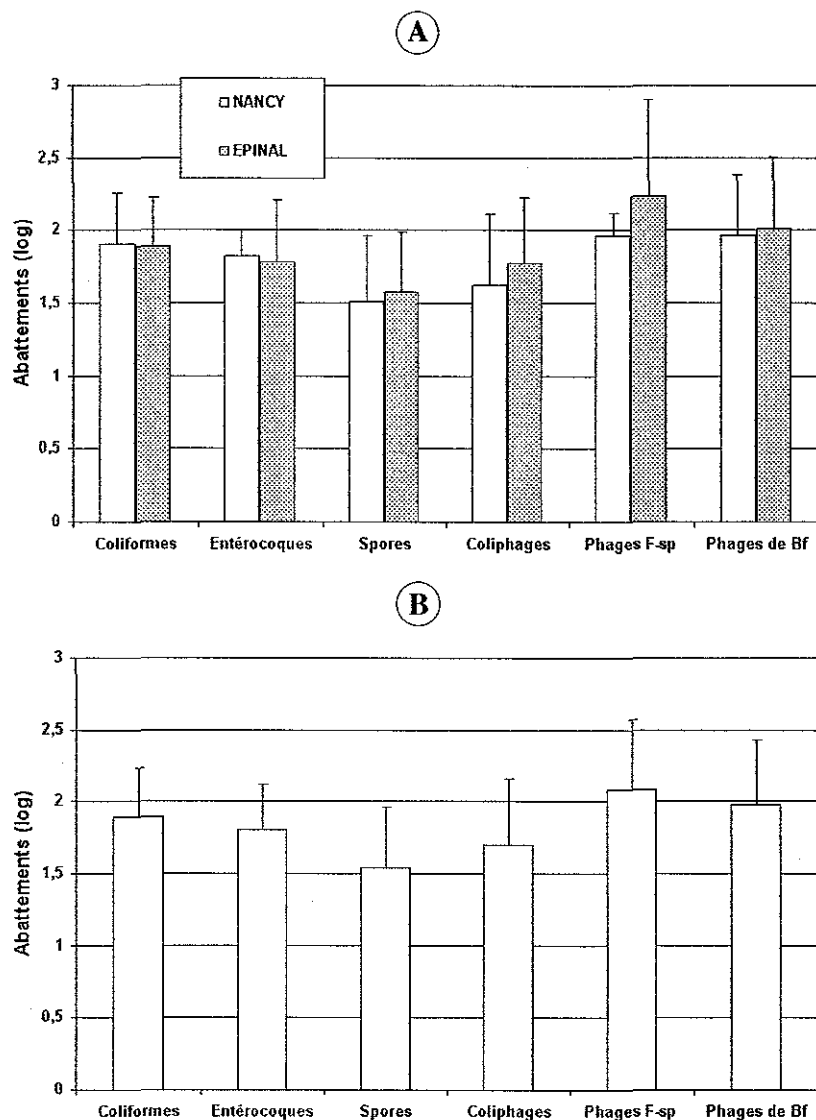
Les effets du traitement secondaire par boues activées ont été évalués à partir de 10 couples d'échantillons prélevés avant et après le traitement secondaire par boues activées sur le site de Nancy. Les résultats sont présentés dans la Figure 35. Il apparaît que le traitement secondaire par boues activées permet d'obtenir des abattements plus importants que le traitement primaire. En effet, ceux-ci varient de 1,1 log pour les spores à 1,9 log pour les bactériophages F-spécifiques. L'analyse statistique des résultats montre que l'abattement des spores est significativement moins important que celui des autres microorganismes (test-t, $p < 0,05$). De la même manière, l'abattement des bactériophages F-spécifiques est significativement plus important que celui des coliphages somatiques ou des entérocoques (test-t, $p < 0,05$).

Figure 35 : Influence du traitement biologique par boues activées sur les six microorganismes à Nancy (n =10)



Un traitement biologique classique comprend les traitements primaire et secondaire. Il est donc intéressant de réaliser le bilan global (primaire + secondaire) pour chacun des indicateurs. Par ailleurs, l'efficacité de ces traitements peut différer du fait du dimensionnement et du temps de séjour de l'eau usée dans les ouvrages. Il est donc important d'évaluer l'effet de ces paramètres sur les résultats. L'abattement en indicateur a donc été défini sur l'ensemble du traitement biologique d'une part à Nancy (temps de séjour entre 8 et 12 heures pour une capacité de 300.000 éq.hab.) et d'autre part à Épinal (temps de séjour supérieur à 24 heures et capacité de 80.000 éq.hab.) (Figure 36 A). Ces résultats montrent que, quelque soit le microorganisme, aucune différence significative entre les sites de Nancy et Épinal n'est constatée (test-t, $p > 0,05$). Il est donc possible de regrouper l'ensemble des résultats afin d'en tirer des conclusions plus générales sur la résistance des différents indicateurs à cette filière de traitement (Figure 36 B). Il apparaît ainsi que les spores, avec un abattement de 1,54 log, sont significativement moins sensibles à ces 2 traitements que les autres microorganismes (test-t, $p < 0,05$) à l'exception des coliphages somatiques (test-t, $p = 0,16$). Au contraire, les bactériophages F-spécifiques, avec un abattement de 2,09 log, sont significativement plus sensibles aux traitements que les coliphages somatiques ou les entérocoques (test-t, $p < 0,05$).

Figure 36 : Influence des traitements primaire et secondaire sur les différents microorganismes à Nancy (n=10) et Épinal (n=9) (A) ainsi que sur l'ensemble des analyses (n_{total}=19) (B)

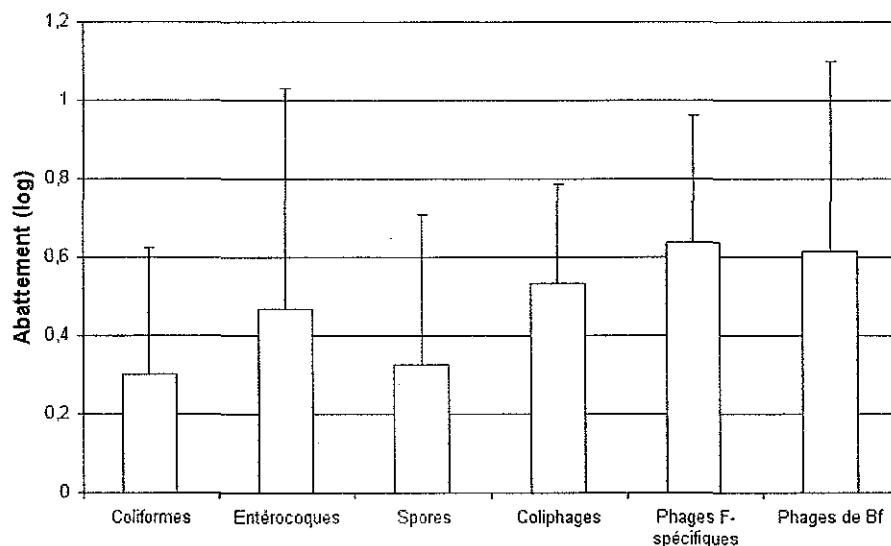


3 Traitements tertiaires

3.1 Le traitement tertiaire de déphosphatation

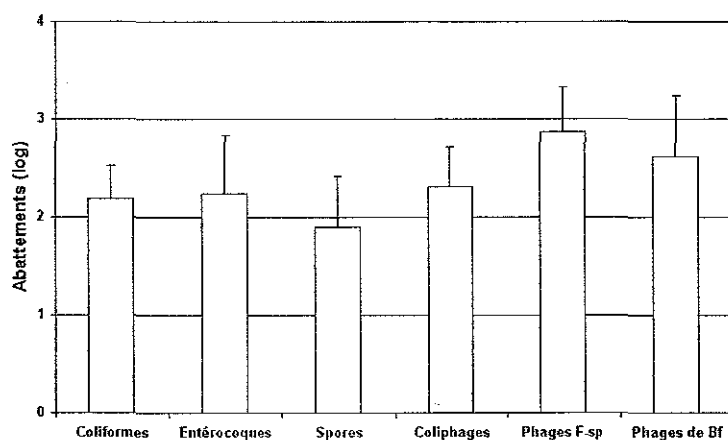
Les effets du traitement tertiaire de déphosphatation ont été étudiés à partir d'échantillons d'eaux usées provenant de la station d'épuration d'Épinal. Neuf échantillons d'eaux usées ayant été prélevés avant et après le traitement tertiaire de déphosphatation ont été analysés. Les abattements moyens calculés (Figure 37) varient de 0,30 log pour les coliformes thermotolérants à 0,64 log pour les bactériophages F-spécifiques. Aucune différence significative entre les différents abattements n'est constatée (test-t, $p > 0,05$) sauf entre les coliformes thermotolérants et les bactériophages F-spécifiques (test-t, $p = 0,04$).

Figure 37 : Influence du traitement tertiaire sur les différents microorganismes (n=9)



Un traitement tertiaire étant généralement appliqué après un traitement biologique, nous avons réalisé le bilan de l'élimination des indicateurs sur l'ensemble d'une telle filière. Ce bilan des traitements primaire, secondaire et tertiaire de déphosphatation de la station d'épuration d'Épinal est présenté dans la Figure 38. Les abattements observés varient de 1,9 log pour les spores à 2,9 log pour les bactériophages F-spécifiques. Ainsi les bactériophages F-spécifiques sont significativement plus sensibles que les autres microorganismes (test-t, $p < 0,05$) à l'exception des phages de *Bacteroides fragilis* dont la sensibilité est significativement non différente (test-t, $p = 0,38$).

Figure 38 : Effets des traitements primaire, secondaire et tertiaire de déphosphatation à Épinal (n=9)



3.2 Le traitement tertiaire par rayonnement ultra-violet (UV)

Huit échantillons d'eaux usées ayant subi un traitement secondaire à la station d'épuration de Nancy ont été soumis en pilote au rayonnement UV. Quatre doses ont été testées : 29, 58, 86 et 173 mW.s/cm². Le pilote utilisé pour ces expériences est décrit dans la partie « Matériels & Méthodes ». La quantification des six microorganismes a été réalisée avant et après irradiation. À partir de ces résultats, les abattements ont été calculés ce qui nous permet d'étudier l'efficacité de la désinfection UV (Tableau 28). Concernant les phages de *Bacteroides fragilis*, du fait de leur faible concentration dans les eaux usées épurées utilisées pour ces expériences, seules les trois doses les plus faibles (29, 58 et 86 mW.s/cm²) ont pu être testées.

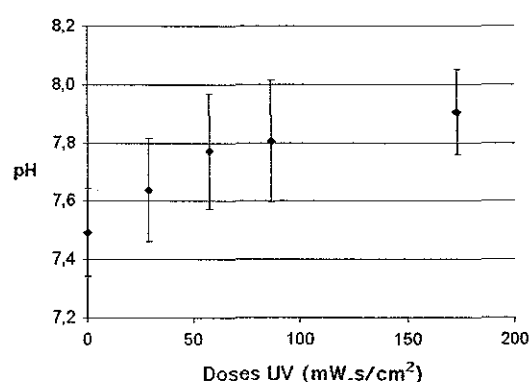
Tableau 28 : Valeurs moyennes d'abattement des différents microorganismes en fonction des doses UV reçues (n_{total}=167)

		Coliformes (n=31)	Entérocoques (n=31)	Spores (n=31)	Coliphages (n=29)	Phages F- sp. (n=30)	Phages de Bf (n=15)
29 mW.s/cm ² (n=7)	Abattement	1,11	0,42	0,16	1,35	0,46	0,35
	Ecart-type	0,30	0,19	0,17	0,37	0,12	0,18
58 mW.s/cm ² (n=6)	Abattement	2,33	1,23	0,42	2,20	0,81	0,87 *
	Ecart-type	0,33	0,14	0,22	0,47	0,15	0,31
86 mW.s/cm ² (n=11)	Abattement	3,01	2,00	0,51	2,61	1,23	1,06 **
	Ecart-type	0,45	0,24	0,25	0,36	0,19	0,24
173 mW.s/cm ² (n=7)	Abattement	3,74	2,87	1,08	3,39 **	2,03***	>1,8
	Ecart-type	0,45	0,32	0,24	0,10	0,47	-

* : n=3 ; ** : n=5 ; *** : n=6.

On notera également une augmentation du pH (n=39) lorsque la dose d'irradiation augmente (test des rangs de Wilcoxon, p<0,05) comme le montre la Figure 39.

Figure 39 : Variation du pH de l'eau en fonction de la dose UV



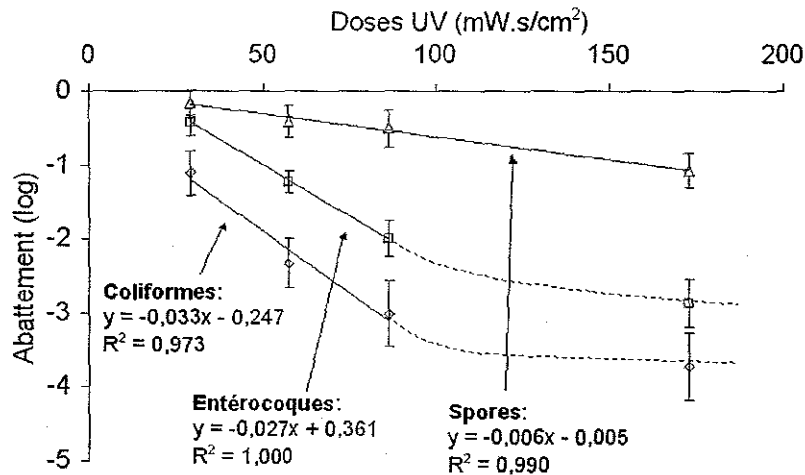
Les abattements en fonction des doses UV sont visualisés dans la Figure 40 pour les indicateurs bactériens et dans la Figure 41 pour les bactériophages.

Il apparaît que, parmi les indicateurs bactériens testés, les spores sont les plus résistantes. Ainsi pour une dose de 58 mW.s/cm², l'abattement des spores est de 0,42 log contre 1,23 log pour les entérocoques et 2,33 log pour les coliformes thermotolérants. De plus, la proportionnalité entre dose

et abattement est respectée pour les spores jusqu'à la valeur maximale d'irradiation (173 mW.s/cm²) ce qui se traduit graphiquement par une représentation linéaire de la relation dose-abattement. Par contre, si cette proportionnalité existe pour les coliformes thermotolérants ou les entérocoques jusqu'à 86 mW.s/cm², elle cesse ensuite.

Il faut souligner que sur l'ensemble des doses UV testées, les entérocoques sont toujours plus résistants que les coliformes thermotolérants (abattement plus faible pour une même dose UV).

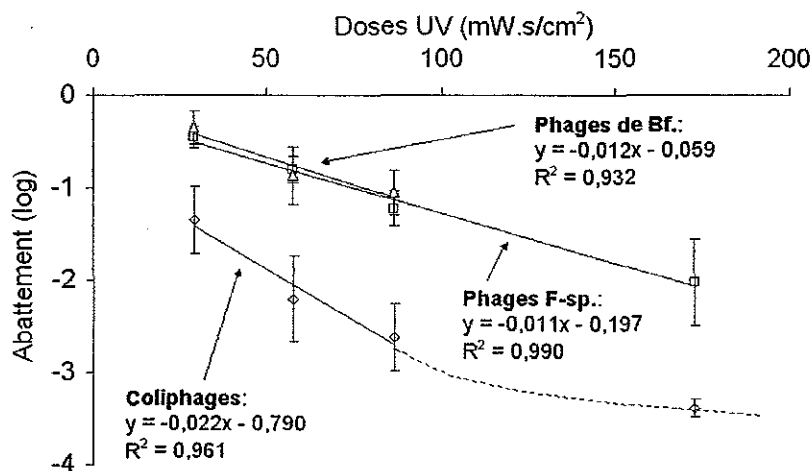
Figure 40 : Abattements calculés en fonction des doses UV pour les différents indicateurs bactériens



Concernant les bactériophages, les plus résistants sont les bactériophages F-spécifiques et les phages de *Bacteroides fragilis* dont les abattements respectifs sont de 0,81 log et 0,87 log pour une dose de 58 mW.s/cm² alors que dans le même temps les coliphages somatiques accusent un abattement de 2,20 log. Les abattements des bactériophages F-spécifiques, comme ceux des spores sont proportionnels à la dose UV jusqu'à 173 mW.s/cm² (relation linéaire). La relation dose-abattement des coliphages somatiques est, quant à elle, comparable à celle des coliformes thermotolérants et des entérocoques avec une partie linéaire seulement jusqu'à 86 mW.s/cm². Concernant les phages de *Bacteroides fragilis*, l'abattement est proportionnel à la dose jusqu'à 86 mW.s/cm². La trop faible concentration dans les eaux usées épurées n'a cependant pas permis de tester la dose maximale d'irradiation de 173 mW.s/cm² ce qui nous interdit de conclure quant à la relation dose-abattement au-delà de 86 mW.s/cm².

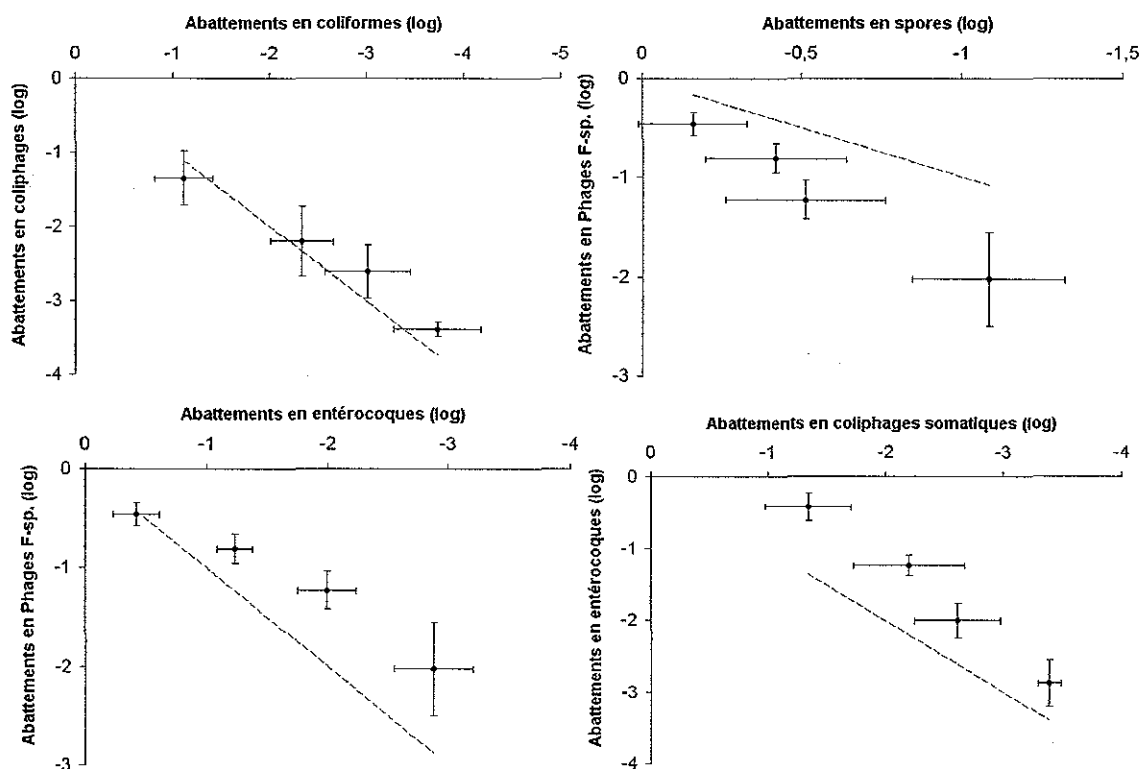
En conclusion et à la lecture des Figures 40 et 41, il apparaît que, parmi les indicateurs bactériens, les coliformes sont les plus sensibles aux rayonnements UV, suivi des entérocoques, puis des spores, alors que parmi les indicateurs phagiques, les coliphages sont les plus sensibles, les phages de *Bacteroides fragilis* et les bactériophages F-spécifiques ne présentant pas de différence.

Figure 41 : Abattements calculés en fonction des doses UV pour les différents bactériophages



Pour compléter ces informations, des comparaisons entre indicateurs bactériens et phagiques ont été réalisées (Figure 42). De cette étude, il ressort que les bactériophages F-spécifiques sont plus sensibles que les spores mais plus résistants que les entérocoques. Quant aux coliphages somatiques, ils présentent une sensibilité peu différente de celles des coliformes thermotolérants et apparaissent tous deux plus sensibles que les entérocoques.

Figure 42 : Comparaison des abattements entre indicateurs bactériens et indicateurs phagiques



En pointillé, la droite d'équation $y = x$ représentant une égalité parfaite de sensibilité aux UV.

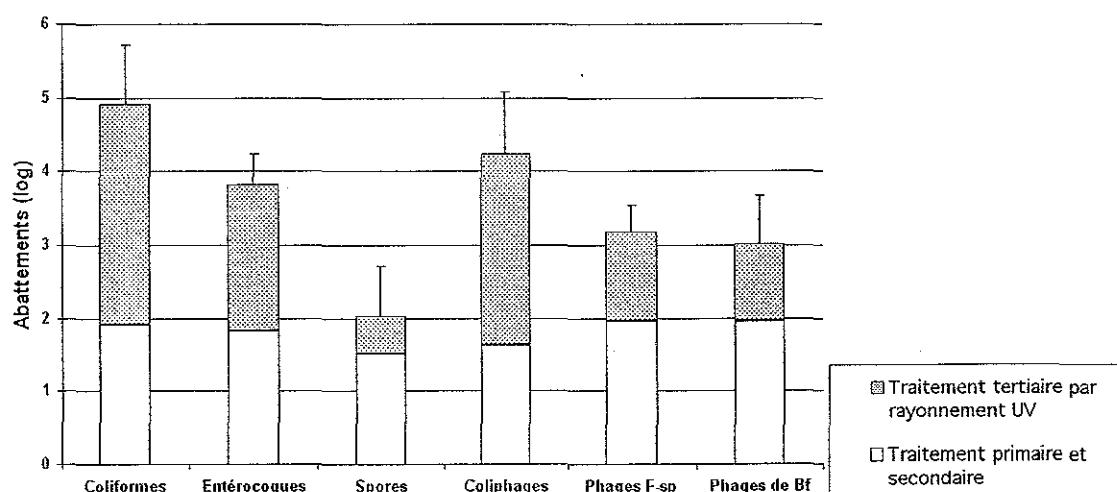
Au vu de ces résultats, il est possible de classer les microorganismes par ordre de résistance croissante aux rayonnements UV :

Coliformes thermotolérants = Coliphages somatiques < Entérocoques
< Bactériophages F-spécifiques = Phages de *Bacteroides fragilis* < Spores

Ce classement est confirmé par une analyse statistique utilisant le test des rangs de Wilcoxon au seuil d'erreur de 5 %.

La station d'épuration de Nancy n'applique pas de traitement tertiaire à ses effluents. Toutefois, nos expériences d'irradiation UV ont été réalisées sur pilote à partir des eaux usées épurées de la station d'épuration de Nancy, il nous a donc paru possible d'évaluer par extrapolation, l'impact des traitements primaire, secondaire et tertiaire (UV) sur les différents microorganismes. Pour faire ce bilan, nous avons choisi d'utiliser les abattements obtenus pour une dose UV de 86 mW.s/cm². Cette dose permet d'obtenir les plus forts abattements tout en conservant une relation linéaire entre dose et abattement pour tous les microorganismes testés. La Figure 43 présente ces résultats en distinguant les abattements dus aux traitements primaire et secondaire (obtenus à partir de la station d'épuration de Nancy) des abattements dus aux radiations UV (obtenus à partir d'un pilote de laboratoire). Les écart-types correspondent à la somme des écart-types des traitements primaire et secondaire d'une part et du traitement tertiaire par radiation UV d'autre part. Si l'on considère l'ensemble de la filière de traitement ainsi défini (primaire + secondaire + tertiaire par radiation UV), les abattements globaux varient de 2,0 log pour les spores à 4,9 log pour les coliformes thermotolérants. En fait, il est possible de distinguer 4 groupes d'indicateur en fonction de leur résistance aux traitements. Les coliformes thermotolérants constituent le groupe le plus sensible, suivi par les entérocoques et les coliphages somatiques. Le troisième groupe est constitué des bactériophages F-spécifiques et des phages de *Bacteroides fragilis*. Enfin, les spores apparaissent comme les plus résistantes à cette filière de traitement.

Figure 43 : Effets des traitements primaire, secondaire de la station d'épuration de Nancy (n=10) ainsi que du traitement tertiaire par rayonnement UV à 86 mW.s/cm² (n=11) sur les différents microorganismes



Discussion

En fonction des objectifs fixés, nous avons évalué l'élimination des indicateurs bactériens et phagiques au cours des différentes étapes de traitement des eaux usées brutes (traitement primaire, traitement secondaire et traitement tertiaire) mais aussi de manière plus globale sur l'ensemble d'une filière de traitement biologique associée ou non avec un traitement tertiaire.

Les résultats obtenus font apparaître clairement que la décantation primaire agit très peu sur l'élimination des indicateurs (inférieur à 0,4 log). En fait, la décantation primaire est chargée d'éliminer des eaux usées la fraction la plus grossière des matières décantables. Lors de cette opération, 40 à 60 % des matières en suspension sont éliminées et avec elles de 25 à 40 % des matières organiques.

De ce fait, l'élimination des indicateurs bactériens et viraux dépend de leur adsorption sur les matières en suspension susceptibles de sédimenter. Dans notre cas, cette adsorption semble faible comme cela a déjà été suggéré (IAWPRC, 1991). Par exemple, Leong (1983) estime à 10 % la réduction virale moyenne consécutive à cette étape soit un abattement de 0,05 log.

Dans le cadre de notre étude, il était toutefois important de définir l'influence du traitement primaire sur les différents indicateurs car les données de la bibliographie sont variables avec des valeurs d'abattement compris entre 0 et 0,77 log pour les coliphages somatiques (Sherman *et al.*, 1975 ; Ignazzito *et al.*, 1980).

Concernant le traitement secondaire ou procédé biologique d'épuration par boues activées celui-ci est basé sur des principes comparables à ceux du milieu épurateur naturel. Il agit sur les microorganismes par adsorption/sédimentation avec des particules solides en suspension telles que les floccs bactériens (Funderburg et Sorber, 1985), voire par ingestion par des protozoaires (IAWPRC, 1991 ; Kim et Unno, 1996). L'efficacité du traitement secondaire est ralentie par des conditions anaérobies ou par l'abaissement de la température (Shimohara *et al.*, 1984). Ce traitement par boues activées est généralement considéré comme le plus efficace pour l'élimination des microorganismes des eaux usées (Zaiss et Hennies, 1988 ; Benyahya *et al.*, 1998). Nos résultats confirment ces données puisque des abattements de 1,1 à 1,9 log sont obtenus avec un tel procédé. Il est ainsi possible d'émettre l'hypothèse que

- soit les indicateurs phagiques et bactériens s'adsorbent mieux aux floccs bactériens qu'aux MES décantables (qui sont éliminées pendant le traitement primaire de décantation),
- soit les boues activées possèdent un pouvoir inactivant sur les microorganismes indicateurs comme le montre par exemple Kim et Unno (1996).

Le traitement tertiaire de déphosphatation fondé sur une floculation et une décantation lamellaire a un faible impact sur chacun des indicateurs. Ainsi, les valeurs d'abattement que nous avons obtenues ne dépassent pas 0,7 log et le niveau d'efficacité de la déphosphatation est quasi-identique pour tous les

microorganismes à l'exception d'une différence de sensibilité constatée entre les coliformes thermotolérants et les bactériophages F-spécifiques. Nieuwstad *et al.* (1988) avaient déjà rapporté de faibles abattements lors de tels traitements pour les bactériophages F-spécifiques et les coliphages somatiques (1 log) mais ils observaient dans le même temps un abattement plus important pour les streptocoques et les spores (1,8 à 1,9 log) ainsi que pour les entérovirus (1,6 log). Ils précisait néanmoins que le traitement tertiaire de déphosphatation appliqué aux effluents secondaires présente une efficacité très variable sur les microorganismes avec des abattements compris entre 0,3 et 2,8 log pour les bactéries et entre 1 et 2,3 log pour les virus.

Concernant l'action des rayons ultra-violet, il est dans un premier temps intéressant de noter que la hiérarchie dans le classement des microorganismes en fonction de leur sensibilité aux UV défini dans cette étude correspond parfaitement à celle de la littérature. Ainsi les coliformes apparaissent comme très sensibles alors que les bactériophages F-spécifiques ou les spores sont toujours les plus résistants. Par contre, concernant les phages de *Bacteroides fragilis*, nos résultats montrent une sensibilité comparable à celle des bactériophages F-spécifiques jusqu'à 86 mW.s/cm² alors que dans la littérature, le phage B40-8 (phage de *Bacteroides fragilis*) apparaît plus sensible que le phage MS2 (bactériophage F-spécifique). Cette différence peut s'expliquer soit par l'application de dose d'irradiation plus élevée, soit par une différence de sensibilité entre la souche de laboratoire (B40-8) et les phages présents dans une eau usée.

Il est important de souligner que les abattements que nous avons obtenus sont difficiles à comparer avec les données de la littérature du fait de l'extrême hétérogénéité des résultats publiés. Ainsi nos valeurs d'abattement pour une dose d'UV donnée apparaissent beaucoup plus faibles que celles présentées par Fries *et al.* (2000) travaillant également avec des effluents secondaires. Ces auteurs observent un abattement de 3 log pour une dose UV d'environ 10 mW.s/cm² alors que dans nos expériences, cet abattement est obtenu pour des doses de 80 mW.s/cm². Dans une autre étude utilisant toujours des effluents secondaires, le même abattement est obtenu pour des valeurs supérieures à 1000 mW.s/cm² (Nieuwstad *et al.*, 1991). Les autres données de la littérature qui sont présentées dans le Tableau 29 ajoutent encore à cette hétérogénéité. Sommer *et al.* (1995) expliquent les différences qui sont constatées principalement par des conditions de cultures différentes (origine et conditionnement des microorganismes) et par des problèmes liés à la mesure de la dose UV.

En fait, l'abattement obtenu par rayonnement UV dans les eaux usées pourrait dépendre de la nature des microorganismes, de leurs concentrations initiales dans le milieu, des caractéristiques de l'eau usée ou de la mesure de la dose d'irradiation UV.

Tableau 29 : Effets des radiations UV en fonction du microorganisme et du type d'eau rapportés dans la littérature

Microorganismes	Dose UV nécessaire pour un abattement de 2 log (mW.s/cm ²)	Type d'eau	Références
E. coli	4	Eaux usées	Tree <i>et al.</i> , 1997
MS2 (phages F-sp)	30		
E. faecalis	8		
E. coli	50	Solution tampon	Sommer <i>et al.</i> , 1998
MS2 (phages F-sp)	380		
B40-8 (phage de Bf)	180		
Spores	400		
Spores	170	?	Sommer <i>et al.</i> , 1995
PhiX174 (coliphages)	50	Eau du robinet	Sommer <i>et al.</i> , 2001
B40-8 (phage de Bf)	180		
MS2 (phages F-sp)	375		
E. coli	45		
E. coli	50	Eaux usées	Nos résultats (pour comparaison)
Entérocoques	90		
Spores	330 (extrapolation)		
Coliphages	50		
Phages F-sp	160		
Phages de Bf	160 (extrapolation)		

En ce qui concerne la nature des microorganismes, il apparaît d'une manière générale, que les bactéries sont plus sensibles aux UV que les virus (Abbaszadegan *et al.*, 1997). Les bactéries sont des cellules procaryotes qui, de par leur nature complexe, présentent un grand nombre de cibles susceptibles d'être endommagées par l'action des rayons ultraviolets. Par ailleurs, les spores, de par leur structure, présentent une résistance très accrue par rapport aux formes végétatives.

En comparaison, les bactériophages ont une constitution plus simple. Ils sont en effet constitués de matériel génétique (de l'ADN pour les coliphages somatiques, les phages de *Bacteroides fragilis* et les bactériophages ADN F-spécifiques et de l'ARN pour les bactériophages ARN F-spécifiques) qui se trouve protégé du milieu extérieur par une coque protéique, la capsid. Par ailleurs, la plus faible sensibilité aux actions des UV des phages à ARN (phage MS2 par exemple) pourrait être expliquée par le fait que l'ARN ne contenant pas de thymine mais de l'uracile serait moins photo-réactif (Sommer *et al.*, 2001).

Soulignons toutefois que, si les virus sont généralement plus résistants aux radiations UV, les coliphages somatiques font exception puisqu'ils apparaissent aussi sensibles que les coliformes thermotolérants et plus sensibles que les entérocoques.

Par ailleurs, la concentration initiale des microorganismes pourrait également jouer un rôle important. Ainsi, en observant les concentrations des différents microorganismes dans les eaux usées épurées et les résistances relatives des différents microorganismes aux UV, on s'aperçoit que les microorganismes les plus abondants sont également les plus sensibles.

Cette observation pose la question suivante : « la sensibilité des microorganismes aux UV telle que nous l'avons mesurée, est-elle dépendante de leur concentration initiale ? ». Pour répondre à cette question, il convient de rappeler le principe de réalisation du test : L'eau usée épurée « naturellement » chargée en microorganismes est placée dans le pilote UV (voir M&M) qui comporte deux lampes, respectivement de 8 et de 15 W. Pour tester l'ensemble des doses, l'eau passe une première, une deuxième, puis une troisième fois devant chacune des lampes. En procédant ainsi, nous faisons l'approximation suivante : deux passages devant l'une des deux lampes correspond à une dose d'irradiation double. Ceci est vrai, mais néglige le fait que lors d'un deuxième passage, les concentrations en microorganismes sont plus faibles puisque ceux-ci ont déjà subi une première irradiation. Il en résulte que, si l'abattement dépend de la concentration initiale, un biais s'introduit dans les calculs d'abattement.

Pour tester cette hypothèse, il faut comparer les abattements obtenus à 86 mW.s/cm^2 . (en admettant que le calcul de la dose d'irradiation soit suffisamment précis). En effet, cette dose est obtenue, soit après trois passages devant la lampe 8 W, soit après un passage devant la lampe 15 W. Or nous constatons que les abattements calculés ne sont pas significativement différents alors que les concentrations en microorganismes sont beaucoup plus faibles lorsqu'il s'agit de faire passer l'eau devant la lampe 8 W pour la troisième fois consécutive. Si l'abattement dépendait de la concentration avant irradiation, une différence aurait été constatée ce qui n'est pas le cas. Nous pouvons donc admettre que la sensibilité des microorganismes aux UV telle que nous l'avons mesurée, ne dépend pas de leur concentration initiale.

La nature et les caractéristiques des eaux traitées pourraient aussi jouer un rôle fondamental dans l'efficacité de traitement par les UV. Dans notre étude par exemple, l'eau usée traitée est chargée de matières en suspension (MES) qui peuvent jouer un rôle protecteur vis-à-vis des microorganismes lors des irradiations UV (Lazarova *et al.*, 1998). Ce rôle protecteur est d'autant plus important que les concentrations en MES sont importantes et que les concentrations en microorganismes sont faibles.

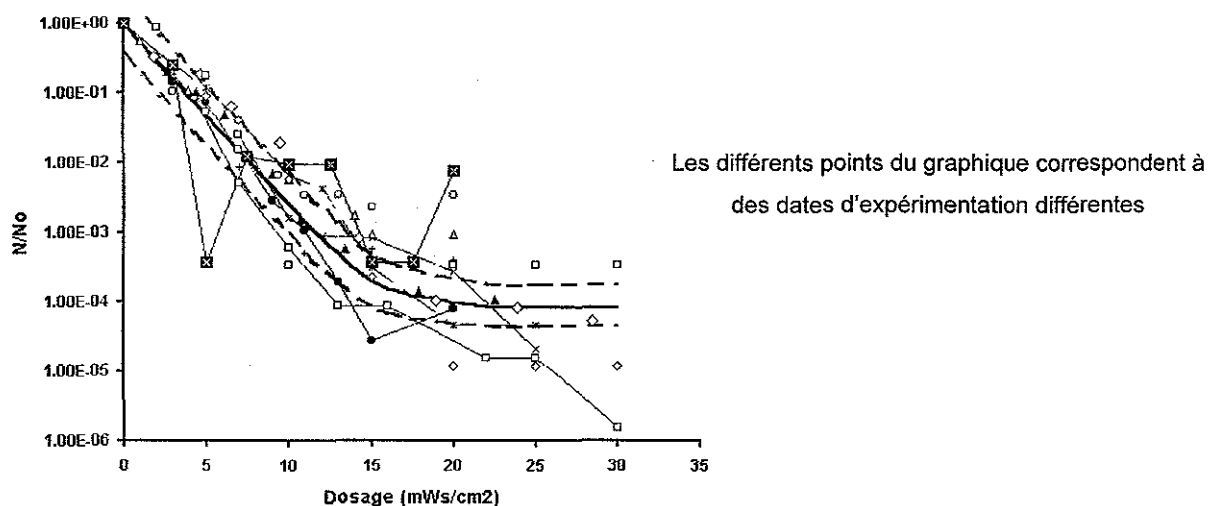
Les MES dont la concentration n'est pas affectée par l'irradiation UV pourraient dans ces conditions jouer pleinement leur rôle de protection expliquant la perte de linéarité de la relation dose-abattement constatée pour les 3 microorganismes les plus sensibles (coliformes thermotolérants, coliphages somatiques et entérocoques) pour des doses supérieures à 86 mW.s/cm^2 .

D'ailleurs dans leur étude, Fries *et al.* (2000) constatent une influence des MES sur les abattements en coliformes thermotolérants dans les eaux usées après traitement secondaire. Ces auteurs tiennent compte de ce paramètre pour calculer l'équation théorique de la courbe d'inactivation (Figure 44) :

$$N = N_0 \times F \times e^{(-0,597 \times D)} + 0,5 \times \text{MES}^{1,5}$$

Avec N : concentration en coliformes thermotolérants (ufc/100mL) ;
 N₀ : concentration initiale en coliformes thermotolérants (ufc/100mL) ;
 F : constante calculée à partir des percentiles ;
 D : dose UV (mW.s/cm²) ;
 MES : matières en suspension totale (mg/L).

Figure 44 : Abattement des coliformes thermotolérants en fonction de la dose UV (d'après Fries *et al.*, 2000)



D'après Fries *et al.* (2000), pour une dose UV donnée, les abattements sont d'autant plus importants que les concentrations en MES sont faibles.

Au cours de nos expériences, l'eau usée traitée a été prélevée à différentes dates, et donc, d'après la théorie de Fries *et al.*, de légères variations de la concentration en MES ont pu induire des variations d'abattements des différents microorganismes. Nous n'avons pas mesuré directement la teneur en MES dans les eaux utilisées, mais nous avons mesuré la turbidité qui prend en compte les concentrations en MES. Les faibles variations observées n'ont pas permis de trouver une relation entre l'abattement des microorganismes et la turbidité qui était en moyenne de 3,3 NTU (+/-1,1) dans l'eau usée traitée.

Enfin, il faut rappeler que certains auteurs ne trouvent pas de corrélation entre les concentrations en MES et le degré de désinfection (Nieuwstad *et al.*, 1991).

En plus de l'influence des MES, il apparaît que dans notre étude, le pH augmente lorsque la dose d'irradiation augmente. Étonnamment, un tel phénomène n'a pas été retrouvé dans la littérature. Une telle observation permet pourtant d'envisager un éventuel effet indirect des UV sur les microorganismes. En effet, une variation de pH due à une photo-oxydation de l'eau, et/ou à d'autres composés, pourrait entraîner des perturbations au niveau de la cultivabilité/infectiosité des microorganismes mais pourrait également modifier leur charge de surface et ainsi provoquer l'agrégation ou l'adhésion des microorganismes. La variation du pH en fonction de la dose UV n'est

plus linéaire au-delà de 86 mW.s/cm². Cet effet indirect n'est pas quantifiable, mais il constitue une autre explication possible quant à la perte de linéarité constatée lors de la représentation graphique de l'abattement en fonction de la dose UV.

Enfin, il faut signaler que la mesure de la dose d'irradiation est un véritable problème car de nombreuses techniques existent telles que :

- utilisation d'un appareil de mesure (radiomètre)
- calcul mathématique basé sur les lois Physiques (Beer-Lambert)
- utilisation d'une molécule chimique dont la photo-réactivité en fonction de la dose est connue (actinométrie)
- utilisation d'un microorganisme dont l'abattement en fonction de la dose est connu (biodosimétrie)

Ainsi, dans les résultats présentés précédemment dans le Tableau 29, Tree *et al.* (1997) utilisent la radiométrie alors que Sommer *et al.* (1995, 1998 et 2001) utilisent la biodosimétrie (spores de *Bacillus subtilis*). Cette différence méthodologique peut expliquer en partie l'hétérogénéité des résultats. Pour Sommer *et al.* (1999) la biodosimétrie est la méthode la plus adaptée pour la mesure de la dose UV dans le cas du traitement des eaux car elle s'affranchit des différences infrastructurales. D'ailleurs il existe plusieurs normes préconisant cette méthode dans le cadre du traitement des eaux (OORMM5873, 1996 ; DVGW, 1997 ; NSF/ANSI 55, 2002). Dans nos expériences, la dose UV a été calculée sur la base de lois physiques (voir M&M). Cette méthode présentait l'avantage d'être facile, rapide et adaptée au pilote utilisé.

L'ensemble des données obtenues permet de discuter de l'intérêt de chaque microorganisme en tant qu'indicateur d'efficacité de traitement pour une filière globale donnée. Le traitement biologique classique d'abord, lorsqu'il est composé d'une décantation primaire et d'un bassin de boues activées, démontre une efficacité quasi identique pour l'élimination de chacun des microorganismes indicateurs. En effet, les abattements sont compris entre 1,5 et 2 log. De plus, il est important de souligner que le dimensionnement (80.000 éq.ha. à Épinal contre 300.000 éq.ha. à Nancy) et le temps de séjour ne semblent pas affecter de manière significative ces résultats. Ces observations semblent être confirmées par d'autres études qui rapportent des abattements du même ordre de grandeur (entre 1,5 et 2 log) pour les coliphages somatiques, les bactériophages F-spécifiques, *E. coli* ou les entérocoques (Jofre, 1991 ; Turner et Lewis, 1995 ; Nieuwstad *et al.*, 1988). On peut cependant noter que sous certaines conditions et de manière ponctuelle, des abattements de seulement 0,6 log pour les spores ont été rapportés (Nieuwstad *et al.*, 1988). Au regard des résultats, il semble inutile, sorti des cas particuliers, de vouloir sélectionner un indicateur unique d'efficacité de traitement dans la mesure où tous donnent la même information. À titre de comparaison, les abattements obtenus pour les virus pathogènes sont eux aussi dans leur majorité compris entre 1,3 et 1,7 log (Leng 1983 ; Lewis et Metcalf, 1988 ; Payment, 1986) même si d'autres abattements proches de 0,5 log ont été observés (Schwartz, 1985b ; Morris, 1984).

Il est ainsi possible de conclure en fonction de nos résultats associés aux données de la littérature que l'ensemble des indicateurs testés apporte une seule et même information en terme d'efficacité de la filière « décantation – boues activées ».

Le traitement biologique suivi d'une déphosphatation n'apporte pas beaucoup de modification à la conclusion précédente si ce n'est que les abattements sont globalement plus importants (entre 1,5 et 2,9 log) et que les bactériophages F-spécifiques semblent être éliminés plus facilement par ce type de traitement. Il apparaît donc que 5 indicateurs sur 6 apportent encore une fois la même information.

Enfin, lorsque le traitement biologique est suivi d'une étape ciblant spécifiquement les microorganismes tel que l'irradiation UV, des différences majeures apparaissent. Il est ainsi possible d'isoler clairement les coliformes thermotolérants comme étant les plus sensibles et les spores comme étant les plus résistantes. Néanmoins, il peut être intéressant de signaler que les phages de *Bacteroides fragilis* et les bactériophages F-spécifiques sont les plus résistants juste après les spores. Or, d'un point de vu méthodologique, les bactériophages F-spécifiques peuvent être mis en évidence plus rapidement que les spores (en 12 heures d'incubation au lieu de 48 heures pour les spores).

En conclusion, sur l'ensemble des données, il semble que les coliformes thermotolérants constituent l'indicateur de choix pour le contrôle du fonctionnement de la filière puisque cet indicateur est soit le plus sensible soit aussi sensible que les autres indicateurs aux différents traitements testés. S'il s'agit d'évaluer l'abattement maximum dont est capable une filière de traitement, les spores, les phages de *Bacteroides fragilis* ou les bactériophages F-spécifiques devraient être privilégiés car ils présentent des résistances soit plus importantes, soit aussi importantes que les autres indicateurs aux différents traitements testés.

RÉSULTATS

CHAPITRE II

Indicateurs de contamination fécale dans les ressources en eaux potables

Partie 1 : Détermination de la charge fécale dans le milieu hydrique environnemental	117
1 Concentrations de référence dans les eaux usées brutes	118
2 Évaluation de l'Abattement de la Contamination Fécale Initiale (ACFI) dans les eaux de rivière	120
3 Évaluation de l'Abattement de la Contamination Fécale Initiale (ACFI) dans les eaux souterraines	122
Discussion	124
 Partie 2 : Étude du comportement des indicateurs dans l'eau de la rivière Moselle	 130
4 Influence des paramètres physico-chimiques	131
5 Détermination des capacité d'auto-épuration de l'eau de rivière	132
6 Évaluation de la relation « coliformes thermotolérants – coliphages somatiques » dans l'eau de rivière	135
Discussion	139
 Partie 3 : Étude in vitro des coliformes thermotolérants et des coliphages somatiques dans l'eau de rivière	 141
7 Influence de la composition de l'eau de rivière sur le devenir des coliformes thermotolérants et des coliphages somatiques	142
8 Influence de la température de l'eau de rivière sur la survie des indicateurs	149
Discussion	151

CHAPITRE II

Indicateurs de contamination fécale dans les ressources en eaux potables

Après avoir étudié comparativement les indicateurs bactériens et phagiques en tant qu'outil de mesure de l'efficacité de traitement, il était intéressant de comparer ces microorganismes en tant qu'indicateur de la contamination fécale.

Un indicateur de contamination fécale doit permettre d'évaluer au mieux le niveau de pollution microbiologique d'origine fécale d'une eau. Or cette information dépend essentiellement de deux paramètres : la concentration initiale de l'indicateur dans les eaux usées brutes et sa sensibilité aux nombreux facteurs environnementaux.

Tous les microorganismes ne présentant pas les mêmes caractéristiques, l'information qu'ils donnent au sujet de la pollution fécale peut varier d'un indicateur à l'autre.

Afin de discuter de l'intérêt de chaque indicateur en tant qu'indicateur de la contamination fécale dans les ressources en eaux potables, nous avons :

- dans une première partie, comparé l'information que présente les 6 indicateurs en terme de contamination fécale dans l'eau de rivière et l'eau souterraine en tenant compte de leur densité dans les eaux usées brutes ;
- dans une deuxième partie, sélectionné les indicateurs présentant une information différente en terme de contamination fécale afin d'approfondir leur étude dans le milieu naturel ;
- dans une troisième partie, étudié comparativement *in vitro*, le comportement de ces indicateurs en fonction de différents paramètres susceptibles d'évoluer dans le milieu hydrique.

L'objectif est d'évaluer l'intérêt des différents indicateurs en tant qu'indicateur de la pollution fécale.

Partie 1

Détermination de la charge fécale dans le milieu hydrique environnemental

Le rôle essentiel d'un indicateur de contamination fécale est de renseigner sur le niveau de pollution fécale d'une eau. Présent en forte concentration à la source (selles, eaux usées), l'indicateur est confronté à la dilution ainsi qu'aux nombreux facteurs environnementaux de la même manière que l'ensemble des microorganismes présents dans les selles. Le facteur de dilution est le même quel que soit le microorganisme issu de la selle, par contre, chaque indicateur présente des caractéristiques de survie qui lui sont propres. Ainsi, l'estimation de la charge fécale dépend de l'indicateur utilisé. Or, en général, elle est estimée à l'aide des bactéries indicatrices de contamination fécale et plus particulièrement des coliformes thermotolérants. Des normes existent qui précisent les concentrations maximales en bactéries indicatrices admises en fonction du type d'eau et de son utilisation. Mais, pour les indicateurs viraux, il n'existe aucune norme ce qui rend difficile d'une part l'interprétation de la charge fécale estimée à partir de ces indicateurs et d'autre part les comparaisons entre indicateurs.

Néanmoins, il apparaît évident qu'une même concentration de 10^3 ufc ou ufp/100mL n'a pas du tout la même signification en terme de charge fécale selon qu'il s'agit des coliformes thermotolérants (concentration dans les eaux usées brutes : 6,51 log ufc/100mL) ou des phages de *Bacteroides fragilis* (concentration dans les eaux usées brutes : 4,44 log ufp/100mL). En effet, si l'on considère les phages de *Bacteroides fragilis*, cela représente une pollution beaucoup plus importante dans la mesure où ils sont en concentration bien plus faible dans les eaux usées brutes.

Afin de contourner cette double difficulté et étudier le devenir des microorganismes dans l'eau et le niveau d'épuration ou d'auto-épuration du milieu hydrique, nous avons décidé d'utiliser un nouvel outil analytique que nous appellerons *l'Abattement de la Contamination Fécale Initiale* (ACFI). L'ACFI correspond à la différence entre la concentration d'un microorganisme donné dans l'eau analysée et sa concentration dans l'eau usée brute prise comme référence de toute contamination du milieu hydrique. En fait, l'ACFI renseigne du niveau d'épuration d'une eau en donnant l'abattement qu'a subi un microorganisme par rapport à la source de la contamination représentée par les eaux usées brutes (contamination *initiale*).

Notre objectif est de comparer les indicateurs en fonction de la valeur de leur ACFI dans différents types d'eaux pouvant servir de ressource d'eau potable : l'eau de rivière et l'eau souterraine.

Néanmoins, selon notre définition, les eaux usées brutes constituent la référence pour déterminer la valeur de l'ACFI. Il est de ce fait essentiel, non seulement de définir la valeur de concentration de chacun des indicateurs dans les eaux usées brutes, mais également de démontrer que ces concentrations restent stables pour chacun des indicateurs. Nous avons donc dans un premier temps déterminé la teneur en 6 indicateurs de différentes eaux usées brutes en fonction de la localisation et de la taille de la population émettrice. Dans un deuxième temps, nous avons estimé l'ACFI pour chaque indicateur dans des eaux de rivière et des eaux souterraines.

1 Concentrations de référence dans les eaux usées brutes

Vingt-neuf échantillons d'eaux usées brutes provenant de trois agglomérations différentes ont été analysés. Il s'agit des eaux usées brutes de Nancy (300.000 habitants, n=16) et d'Épinal (50.000 habitants, n=9). Elles ont été réalisées entre mai 1999 et novembre 2000. Le détail de toutes les analyses est donné en annexe.

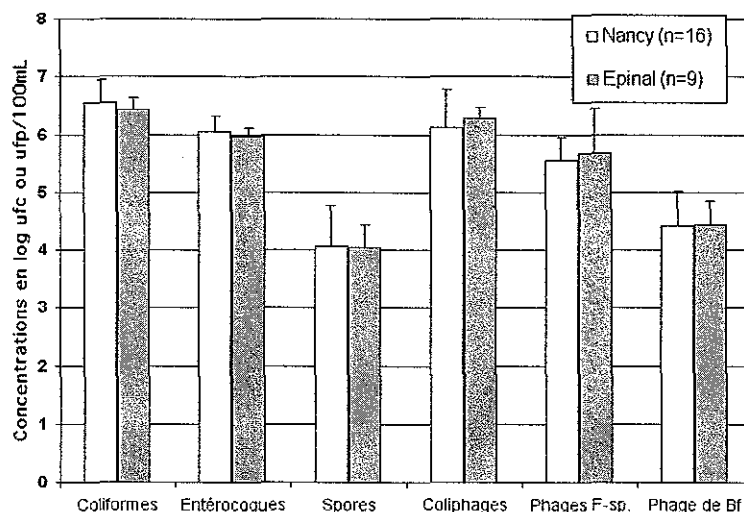
À partir des résultats rassemblés dans le Tableau 30 et représentés sur la Figure 45, il apparaît que les concentrations en coliformes thermotolérants, en entérocoques, en spores, en coliphages somatiques, en bactériophages F-spécifiques et en phages de *Bacteroides fragilis* ne diffèrent pas entre les sites d'Épinal et de Nancy (test-t, $p > 0,05$).

Tableau 30 : Concentrations moyennes (log ufc ou ufp/100mL) des microorganismes en fonction des sites de prélèvement

	Nancy (n=16)		Épinal (n=9)	
	Moyennes (log)	Ecart-type	Moyennes (log)	Ecart-type
Coliformes	6,56	0,39	6,42	0,20
Entérocoques	6,05	0,27	5,97	0,14
Spores	4,07	0,70	4,04	0,39
Coliphages	6,12	0,66	6,27	0,19
Phages F-sp.	5,56	0,39	5,68	0,77
Phage de Bf	4,41 *	0,60	4,44	0,41

* : n=15.

Figure 45 : Densités moyennes en microorganismes en fonction du site de prélèvement



Si l'on considère tous les résultats indépendamment du lieu de prélèvement (Figure 46), il apparaît que les coliformes thermotolérants, les entérocoques et les coliphages somatiques sont les plus abondants avec des densités supérieures à 6 log/100mL. Les phages de *Bacteroides fragilis* et les spores sont les moins abondants avec des densités inférieures à 5 log/100mL. Les bactériophages F-spécifiques sont présents en concentration intermédiaire.

L'analyse statistique des résultats (t-test, $p < 0,05$) permet de classer les microorganismes par ordre croissant d'abondance dans les eaux usées brutes :

Coliformes thermotolérants > coliphages somatiques = Entérocoques
 > bactériophages F-spécifiques > phages de *Bacteroides fragilis* > spores

Cette classification est indépendante de la taille de la population au moins entre 50.000 (Épinal) et 300.000 habitants (Nancy). Ceci nous autorise à calculer des concentrations moyennes qui seront prises comme référence pour calculer l'ACFI d'une eau (Tableau 31).

Figure 46 : Concentrations des différents microorganismes dans l'eau usée brute (n=25 sauf concernant les phages de *Bacteroides fragilis* pour lesquels n=24)

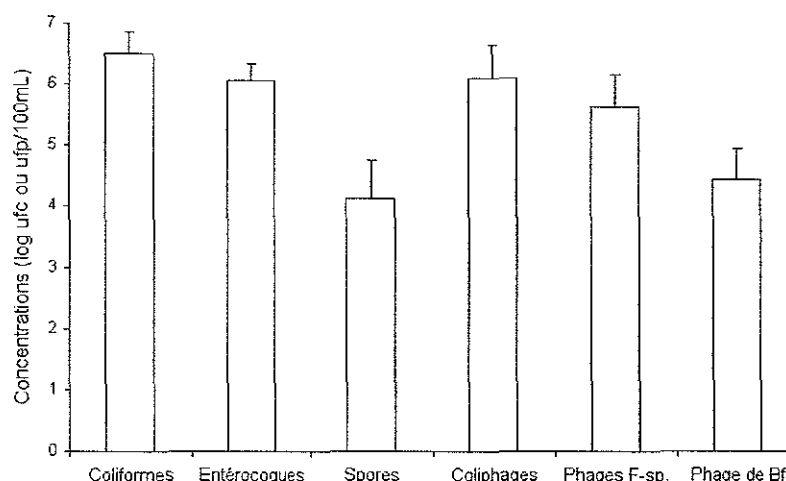


Tableau 31 : Concentrations moyennes (log ufc ou ufp/100 mL) en indicateurs de contamination fécale dans les eaux usées brutes pris comme référence pour le calcul de l'ACFI (n=25 sauf concernant les phages de *Bacteroides fragilis* pour lesquels n=24)

	Moyennes (log)
Coliformes	6,51
Entérocoques	6,03
Spores	4,06
Coliphages	6,18
Phages F-sp.	5,61
Phages de Bf	4,42

2 Évaluation de l'Abattement de la Contamination Fécale Initiale (ACFI) dans les eaux de rivière

L'ACFI est déterminé à deux niveaux dans les eaux de la rivière Moselle : à proximité d'un rejet d'eaux usées et à une dizaine de kilomètres en aval de ce site.

2.1 Une eau de rivière à proximité d'un rejet d'eaux usées

Seize prélèvements d'eau de rivière ont été réalisés entre février et novembre 2000 sur la commune de Maron. Un point de rejet d'eaux usées correspondant à 15.400 habitants est situé à proximité du point de prélèvement. Ainsi l'eau de rivière analysée correspond à une eau récemment contaminée. À ce niveau, la dilution est vraisemblablement le facteur prépondérant dans la diminution des concentrations en microorganismes d'origine fécale.

Les résultats des analyses (Tableau 32) montrent que 100 % des échantillons sont positifs en indicateurs sauf en phages de *Bacteroides fragilis* qui ne sont présents que dans 63 % des cas. Il apparaît donc d'emblée que les phages de *Bacteroides fragilis* sous-estiment la charge fécale

puisque, dans 37 % des cas, l'absence de cet indicateur traduirait l'absence de contamination fécale dans l'eau de rivière alors même que les 5 autres indicateurs sont présents.

Tableau 32 : Concentrations (log ufc ou ufp/100 mL) de six indicateurs de contamination fécale dans une eau de rivière prélevée à proximité d'un rejet d'eaux usées et estimation de l'ACFI correspondant

	n>SD*	Moyenne (log)	Ecart-type	ACFI
Coliformes	16/16	3,05	0,42	3,46
Entérocoques	16/16	2,61	0,32	3,42
Spores	16/16	1,68	0,37	2,38
Coliphages	16/16	3,48	0,31	2,70
Phages F-sp.	16/16	2,59	0,41	3,02
Phages de Bf	10/16	1,64	0,29	2,78

* : Nombre d'échantillons présentant des concentrations supérieures au seuil de détection

À partir de ces résultats, il est possible de calculer l'ACFI relatif à chacun des 5 microorganismes dans une eau de rivière prélevée à proximité d'un rejet d'eaux usées (Tableau 32). Il apparaît que parmi les microorganismes présents dans 100 % des échantillons, les spores et les coliphages somatiques présentent l'ACFI le plus faible et estiment la contamination fécale d'une manière 10 fois plus importante que les coliformes thermotolérants ou les entérocoques (test-t, $p < 0,05$). Les bactériophages F-spécifiques traduisent une pollution fécale intermédiaire.

2.2 Une eau de rivière éloignée d'une source de contamination fécale

Seize prélèvements d'eau de rivière ont été réalisés entre février et novembre 2000 sur la commune de Pierre la Treiche éloignée d'une dizaine de kilomètres du dernier rejet de contamination fécale. À ce niveau, en plus de la dilution naturelle, les facteurs environnementaux sont susceptibles d'agir sur les différents indicateurs.

Les résultats (Tableau 33) montrent que les concentrations en phages de *Bacteroides fragilis*, spores et bactériophages F-spécifiques sont inférieures au seuil de détection dans respectivement 44, 19 et 12 % des cas. Ces trois indicateurs sous-estiment donc la charge fécale puisque coliformes thermotolérants, entérocoques et coliphages somatiques sont présents dans 100 % des cas.

À partir de ces résultats, il est possible d'estimer l'ACFI dans l'eau de rivière en considérant chacun des 3 microorganismes présents en permanence. Les coliphages somatiques (ACFI=2,94) sont les moins sensibles aux facteurs inactivant et donnent ainsi une estimation de la pollution fécale jusqu'à 25 fois plus importante que les coliformes thermotolérants ou les entérocoques (ACFI=4,26 et 4,16 respectivement).

Tableau 33 : Concentrations (log ufc ou ufp/100 mL) de six indicateurs de contamination fécale dans une eau de rivière éloignée d'une source de pollution fécale

	n>SD*	Moyenne (log)	Ecart-type	ACFI
Coliformes	16/16	2,25	0,81	4,26
Entérocoques	16/16	1,87	0,79	4,16
Spores	13/16	1,47	0,34	2,59
Coliphages	16/16	3,24	0,39	2,94
Phages F-sp.	14/16	2,27	0,50	3,34
Phages de Bf	9/16	1,67	0,32	2,75

* : Nombre d'échantillons présentant des concentrations supérieures au seuil de détection

3 Évaluation de l'Abattement de la Contamination Fécale Initiale (ACFI) dans les eaux souterraines

Vingt-quatre analyses d'eaux souterraines provenant de 5 sites différents ont été réalisées entre le 7 mars 2000 et le 6 mars 2001. Au total 10 échantillons sur 25 se sont avérés positifs pour l'un au moins des microorganismes recherchés. Le détail de ces résultats est donné dans le Tableau 34, à la lecture duquel il est constaté que :

- six échantillons présentent une contamination bactérienne mais pas de contamination phagique ;
- quatre échantillons présentent une contamination bactérienne et phagique.

Les eaux prélevées sur l'un des sites (Bouxière-aux-Dames) n'ont jamais révélé la présence des indicateurs recherchés. À l'inverse, les quatre prélèvements d'eaux réalisés sur le site de Neuves-Maisons se sont tous avérés positifs. Il est important de souligner que cette eau a longtemps été utilisée comme eau de boisson, mais que la quantité importante de chlore nécessaire pour satisfaire aux normes de potabilité a contraint les autorités locales à abandonner cette source d'approvisionnement. Cette eau souterraine n'est donc plus utilisée à des fins de consommation.

Tableau 34 : Concentrations en ufc ou ufp/100mL des différents microorganismes dans les eaux souterraines présentant des échantillons positifs

6 échantillons positifs ($n_{total}=20$)	Méréville		Dommartin		Champigneulle	
	9/03/01	13/03/01	9/03/01	28/08/01	5/04/01	28/08/01
Coliformes	0,5	0,5	1	280	0	0
Entérocoques	1	0	0	320	1	4,5
Spores	0	0	0	4,8	0	0
Bactériophages	0	0	0	0	0	0

4 échantillons positifs ($n_{total}=4$)	Neuves-Maisons			
	9/03/00	13/03/00	21/02/01	6/03/01
Coliformes	497	2520	1373	1200
Entérocoques	122	368	1109	633
Spores	0	7	35	0
Coliphages	3,8	43	220	13
Phages F+	1,4	1,6	90	10
Phages de Bf	0	0	0	0

Sur l'ensemble de ces résultats, il apparaît que les coliformes thermotolérants et les entérocoques sont détectés dans 32 % des eaux, les coliphages somatiques et les bactériophages F-spécifiques dans 16 % et les spores dans 12 %. Enfin, les phages de *Bacteroides fragilis* ne sont jamais détectés. Il apparaît donc clairement que ces derniers sous-estiment la contamination fécale dans ces eaux souterraines.

En ce qui concerne les sites de Méréville, Dommartin et Champigneulle, si les indicateurs phagiques sont pris en compte, la charge fécale est considérée comme nulle alors que si les indicateurs bactériens (coliformes thermotolérants et entérocoques) sont pris en compte, la charge fécale peut être considérée comme positive mais occasionnelle. À noter que les spores ne sont mises en évidence que dans le cas de concentrations importantes en coliformes thermotolérants et en entérocoques ($>10^2$ ufc/100 mL).

Les résultats obtenus à partir des eaux de Neuves-Maisons montrent bien qu'il s'agit d'un cas particulier dans la mesure où la contamination est particulièrement élevée (présence d'au moins 4 indicateurs sur 6 dans tous les échantillons prélevés). Les spores ne sont pas détectées dans 2 cas sur 4 au niveau de ces eaux souterraines alors que les autres indicateurs sont présents. Ceci tend à montrer que les spores sont capables de sous-estimer la contamination fécale dans ce type d'eau.

Les valeurs de l'ACFI sont indiquées dans le Tableau 35. Il est intéressant de constater que l'ACFI est très différent selon la nature du microorganisme. Pour les bactéries, l'ACFI est d'environ 3,4 log alors qu'il est d'environ 4,7 log pour les phages. Ces derniers témoignent donc dans ce milieu d'une pollution fécale près de 20 fois plus faible que les indicateurs bactériens.

Tableau 35 : Estimation de l'Abattement de la Contamination Fécale Initiale (ACFI) en fonction des différents indicateurs dans les eaux souterraines de Neuves-Maisons

	n>SD	Moyenne (log)	Ecart-type	ACFI
Coliformes	4/4	3,08	0,29	3,43
Entérocoques	4/4	2,62	0,41	3,41
Spores	2/4	1,19	0,49	2,87
Coliphages	4/4	1,42	0,75	4,76
Phages F-sp.	4/4	0,83	0,85	4,78
Phages de Bf	0/4	-	-	-

* : Nombre d'échantillons présentant des concentrations supérieures au seuil de détection

En conclusion, nos résultats montrent que, quelle que soit l'eau souterraine, les indicateurs bactériens témoignent d'une contamination fécale plus importante que les bactériophages.

Discussion

Dans cette étude, nous avons voulu estimer la charge fécale de différentes ressources d'eaux potables (eaux de rivière, eaux souterraines) à l'aide de 6 indicateurs différents. Cette comparaison a nécessité la définition de l'ACFI pour lequel chaque mesure est rapportée à la concentration du microorganisme dans les eaux usées brutes qui constituent la référence. Cependant, cette référence n'est valable que si les concentrations en indicateurs dans les eaux usées brutes sont relativement stables dans le temps et l'espace. Or, nos résultats ne montrent aucune différence significative de concentration pour les 6 indicateurs entre des eaux usées brutes de 50.000 habitants et des eaux usées brutes de 300.000 habitants provenant de 2 zones géographiques différentes.

Ensuite, à partir des données de la littérature, il est possible d'estimer des concentrations moyennes pour chaque microorganisme dans les eaux usées brutes (Tableau 36). Leur comparaison avec les résultats obtenus dans notre étude (Figure 47) montre clairement que ces concentrations sont parfaitement comparables pour les coliformes thermotolérants, les entérocoques, les coliphages somatiques et les bactériophages F-spécifiques. Il existe par contre une discordance concernant les spores (différence de 1,2 log environ) et les phages de *Bacteroides fragilis* (différence de 0,7 log environ). Concernant les spores, il faut souligner que le nombre de résultats les concernant dans la littérature est beaucoup plus faible que pour les autres microorganismes.

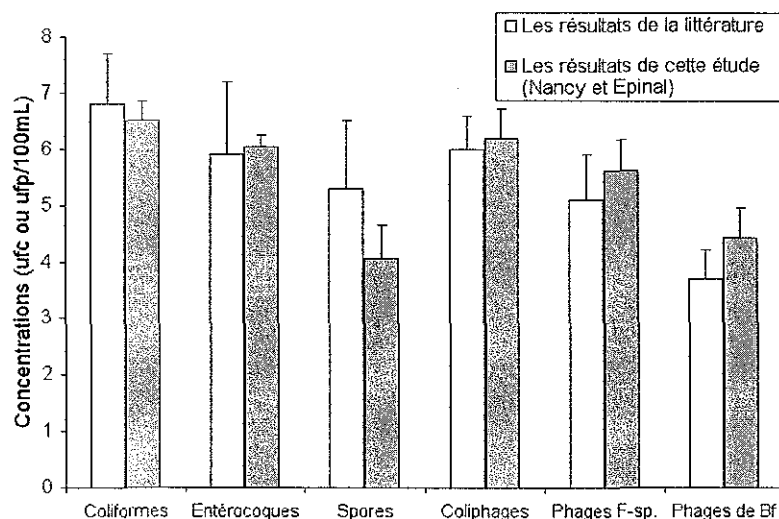
Tableau 36 : concentrations (log ufc ou ufp/100 mL) en indicateurs bactériens et phagiques dans les eaux usées brutes rapportées dans la littérature

Microorganismes	Moyennes (log)	Ecart-type	n	Min.	Max.	Références
Coliformes fécaux	6,8	0,9	20	4,8	8,7	Baggi <i>et al.</i> , 2001 ; Vilaginès <i>et al.</i> 1997 ; Chung <i>et al.</i> , 1998 ; Lucena <i>et al.</i> , 1996 ; Cornax <i>et al.</i> , 1991 ; Grabow <i>et al.</i> , 1989 ; Muniesa <i>et al.</i> , 1999 ; Havelaar, 1993 ; Espigares <i>et al.</i> , 1999 ; Lasobras <i>et al.</i> , 1999
Streptocoques	5,9	1,3	15	3,6	9,0	Baggi <i>et al.</i> , 2001 ; Vilaginès <i>et al.</i> 1997 ; Chung <i>et al.</i> , 1998 ; Lucena <i>et al.</i> , 1996 ; Cornax <i>et al.</i> , 1991 ; Havelaar, 1993 ; Collivignarelli <i>et al.</i> , 2000 ; Espigares <i>et al.</i> , 1999 ; Nieuwstad <i>et al.</i> , 1988 ; Lasobras <i>et al.</i> , 1999
Spores	5,3	1,2	4	4,1	7,0	Chung <i>et al.</i> , 1998 ; Lucena <i>et al.</i> , 1996 ; Espigares <i>et al.</i> , 1999 ; Nieuwstad <i>et al.</i> , 1988
Coliphages somatiques	6,0	0,6	16	4,8	6,9	Baggi <i>et al.</i> , 2001 ; Vilaginès <i>et al.</i> 1997 ; Lucena <i>et al.</i> , 1996 ; Cornax <i>et al.</i> , 1991 ; Grabow <i>et al.</i> , 1989 ; Havelaar, 1993 ; Armon et Kott, 1996 ; Nieuwstad <i>et al.</i> , 1988 ; Lasobras <i>et al.</i> , 1999

Bactériophages F-spécifiques	5,1	0,8	13	3,7	6,4	Baggi <i>et al.</i> , 2001 ; Vilaginès <i>et al.</i> 1997 ; Chung <i>et al.</i> , 1998 ; Cornax <i>et al.</i> , 1991 ; Havelaar, 1993 ; Armon et Kott, 1996 ; Nieuwstad <i>et al.</i> , 1988 ; Lasobras <i>et al.</i> , 1999
Phages de <i>Bacteroides fragilis</i>	3,7	0,5	11	3,1	4,9	Chung <i>et al.</i> , 1998 ; Lucena <i>et al.</i> , 1996 ; Cornax <i>et al.</i> , 1991 ; Havelaar, 1993 ; Armon et Kott, 1996 ; Lasobras <i>et al.</i> , 1999

La moyenne n'a pu être calculée à partir des données brutes car souvent celles-ci ne sont pas précisées dans la littérature. Nous avons donc pris en compte les différentes valeurs moyennes (n) rapportées par les auteurs.

Figure 47 : Concentrations en indicateurs bactériens et phagiques dans les eaux usées brutes - Comparaison de nos résultats et ceux de la littérature



Par ailleurs, il faut indiquer que nous avons comparé avec ceux provenant de pays tels que la Colombie, l'Argentine ou l'Espagne (Lucena *et al.*, 2002). Cette comparaison met en évidence que les concentrations en indicateurs sont parfaitement comparables quel que soit le pays lorsque les analyses sont effectuées avec exactement les mêmes protocoles et après un contrôle de qualité effectué dans chaque laboratoire participant.

Toutes ces observations sont extrêmement importantes car elles démontrent qu'au moins 4 des 6 indicateurs recherchés peuvent jouer le rôle d'indicateur de contamination fécale indépendamment de la situation géographique, du climat... En outre, nos résultats montrent que le niveau de concentration en indicateur est indépendant de la taille de la population. Dans ces conditions, il est possible de calculer l'ACFI par rapport à ces indicateurs dans le milieu hydrique.

Les concentrations de référence que nous avons pris en compte pour le calcul de l'ACFI sont respectivement de 6,51, 6,03 et 4,06 pour les coliformes thermotolérants, les entérocoques et les spores et respectivement 6,18, 5,61 et 4,42 pour les coliphages somatiques, les bactériophages F-spécifiques et les phages de *Bacteroides fragilis*.

Dans le cadre de notre étude, nous avons évalué l'Abattement de la Contamination Fécale Initiale (ACFI) pour des eaux de rivière et des eaux souterraines.

Dans les eaux de rivière, deux cas de figure peuvent être envisagés en fonction de la proximité du rejet des eaux usées. Lorsque le point de rejet est proche, la dilution joue un rôle majeur dans la diminution de la charge fécale. À l'inverse, lorsque l'eau de rivière est prélevée au niveau d'un site éloigné d'un point de contamination fécale, de nombreux facteurs environnementaux autres que la dilution sont susceptibles d'intervenir sur les populations microbiologiques d'origine fécale.

Ainsi, en analysant l'eau en deux points de la rivière, l'un proche d'un point de rejet d'eaux usées et l'autre éloigné d'une dizaine de kilomètres, nous avons constaté que :

- les spores, les bactériophages F-spécifiques et les phages de *Bacteroides fragilis* sont capables de sous-estimer la contamination fécale dont témoignent encore les autres indicateurs ;
- les coliformes thermotolérants et les entérocoques sont toujours présents dans les eaux que nous avons analysées et donnent la même information sur le niveau d'épuration microbiologique fondé sur le calcul de l'ACFI. Cette information dépend de la distance qui sépare le point de prélèvement d'une source de pollution. Ainsi, pour les coliformes thermotolérants et les entérocoques, l'ACFI est de 3,5 log à proximité du point de rejet et évolue jusqu'à une valeur de 4,3 après une dizaine de kilomètres en aval de ce point ;
- les coliphages somatiques sont également toujours présents dans les eaux de rivière analysées mais donnent une information différente de celle que donnent les coliformes thermotolérants ou les entérocoques. Ainsi l'estimation qu'ils donnent de la pollution fécale est d'une part plus importante que celle dont témoignent les coliformes thermotolérants ou les entérocoques et d'autre part varie peu entre les deux sites de prélèvement (ACFI=2,70 à 2,94 selon l'éloignement du point de rejet).

Ces observations soulignent une différence de comportement des coliphages somatiques d'une part et des coliformes thermotolérants ou entérocoques d'autre part, vis-à-vis des facteurs environnementaux.

D'autres études ont également montré une différence de comportement entre indicateurs bactériens et indicateurs phagiques en eau de surface (Rajala et Tanski, 1998 ; Borrego *et al.*, 1987 ; Keswick *et al.*, 1984 ; Bell, 1976). Dans le cadre de notre étude, la différence de comportement entre coliphages somatiques et coliformes thermotolérants/entérocoques est particulièrement intéressante à discuter. En effet, l'information donnée par les coliformes thermotolérants et les entérocoques concernant le niveau d'épuration (basé sur le calcul de l'ACFI) est différente de celle donnée par les coliphages somatiques. Alors que les concentrations en coliformes thermotolérants sont supérieures aux concentrations en coliphages somatiques dans les eaux usées brutes (différence d'environ 0,4 log), une inversion de concentration est constatée dans l'eau de rivière. Une observation similaire avait déjà été faite par Bell en 1976 qui observait une inversion du rapport entre coliformes totaux et coliphages somatiques dans l'eau de rivière (0,15:1) par rapport à l'eau usée (87:1). En 1987, Borrego *et al.* estiment ce même rapport dans l'eau de rivière à 0,19:1. Dans notre étude, le rapport entre

coliformes thermotolérants (et non *coliformes totaux*) et coliphages somatiques est de 2,57:1 dans l'eau usée brute, de 0,37:1 dans l'eau de rivière proche d'un point de rejet d'eaux usées et 0,10:1 dans l'eau de rivière prélevée à d'une dizaine de kilomètres de ce même point de rejet.

Cette différence entre coliphages somatiques et coliformes thermotolérants/entérocoques en terme d'information laisse à penser que les coliphages somatiques *pourraient* être de meilleurs indicateurs de la contamination fécale dans les eaux de rivière. En effet, ils sont éliminés moins rapidement que les coliformes thermotolérants ou les entérocoques par les phénomènes d'auto épuration de la rivière. Ils permettent ainsi de suivre la pollution fécale sur une plus longue distance et leur utilisation permettrait d'éviter de sous-estimer la contamination fécale.

Il est important de souligner que l'apport de pollution fécale dans les eaux de rivière peut se faire par l'intermédiaire soit d'eaux usées brutes, soit d'eaux usées épurées. Ainsi, il peut être intéressant de noter que si les eaux usées sont soumis à des traitements dont les effets sont très inégaux sur les microorganismes indicateurs (ex : le traitement UV, Chapitre 1), la proportion des concentrations en indicateurs de ces eaux usées épurées avant rejet dans le milieu naturel pourrait être modifié de manière importante par rapport à des eaux usées brutes. Aussi, dans la mesure où la source de pollution d'une eau de rivière est connue, il pourrait être intéressant de connaître les traitements qui ont été appliqués à l'eau usée avant leur rejet en rivière et de recalculer l'ACFI sur de nouvelles bases.

Dans les eaux souterraines, les résultats diffèrent complètement de ceux observés dans l'eau de rivière. En effet, ce sont surtout les coliformes thermotolérants et les entérocoques qui sont retrouvés dans les eaux souterraines. En conséquence, ce sont cette fois-ci les indicateurs phagiques qui semblent sous-estimer la charge fécale. Par comparaison avec les données de la littérature, il est impossible de dégager une règle générale car ces données sont une fois de plus très variables comme le montre le Tableau 37 qui rassemble 6 études réalisées à partir d'échantillons d'eaux souterraines provenant de 810 puits différents. Ainsi, pour un même volume analysé, sont retrouvés majoritairement soit les indicateurs bactériens (étude 2) soit les indicateurs phagiques (étude 6), mais dans la plupart des cas (études 1, 3, 4 et 5) la contamination fécale est représentée par les deux types de microorganisme. En fait, le transfert des microorganismes depuis l'eau de surface jusqu'à l'eau souterraine dépend de nombreux paramètres tels que les propriétés de surface du microorganisme, sa taille, sa capacité de survie, mais également la nature du sol, la présence de matière organique, d'eau, d'une flore bactérienne autochtone, la porosité, la température, le pH, la salinité, les propriétés chimiques des terrains traversés par l'eau (Leclerc *et al.*, 2000). Avec autant de variables, il est évidemment très difficile de proposer le meilleur indicateur à utiliser. D'ailleurs pour éviter de sous-estimer la contamination fécale, l'agence américaine de protection de l'environnement (EPA, 2000) suggère la recherche à la fois des indicateurs bactériens et des indicateurs phagiques dans les eaux souterraines dans la mesure où ils sont susceptibles d'apporter une information complémentaire.

Dans le cadre de notre étude néanmoins, il semble que les indicateurs bactériens soient les plus adaptés pour définir la charge fécale.

Tableau 37 : Résultats d'analyse d'eaux souterraines (d'après EPA, 2000)

Etudes	Eaux souterraines (nombre de puits)	Volume analysé	Microorganismes (souche hôte pour la recherche des bactériophages, si indiquée)	Nbre d'échantillons positifs/Nbre total d'échantillons
1	448	200 mL	Coliformes totaux	44/445
			Entérocoques	31/355
			<i>C. perfringens</i>	1/57
		15 L	bactériophages F-spécifiques (WG49)	42/440
			Coliphages somatiques (E. coli C)	18/444
			Coliphages somatiques (E. coli C-3000)	48/444
2	94	1 L	Coliformes totaux	31/94
			<i>E. coli</i>	18/94
			Entérocoques	17/94
			<i>C. perfringens</i>	4/94
			Coliphages somatiques	5/94
3	30	6 L	Coliformes totaux	24/30
			<i>E. coli</i>	15/30
			Entérocoques	21/30
			<i>C. perfringens</i>	10/30
			Coliphages somatiques	16/30
			Bactériophages F-spécifiques	6/30
			Phages de <i>Bacteroides fragilis</i>	6/30
4	109	200-300 L	Coliformes thermotolérants	2/109
			<i>E. coli</i>	0/109
			Streptocoques fécaux	1/109
			Coliphages somatiques	1/109
			Bactériophages F-spécifiques	10/109
5	106	200-300 L	Coliformes thermotolérants	8/106
			<i>E. coli</i>	9/106
			Streptocoques fécaux	8/106
			Coliphages somatiques	3/106
			Bactériophages F-spécifiques	3/106
6	23	4 L	Coliformes totaux	4/23
			<i>E. coli</i>	0/23
			Coliphages somatiques	23/23
			Bactériophages F-spécifiques	18/23

En conclusion, l'évaluation de l'ACFI pour chacun des 6 indicateurs nous a permis de comparer la qualité de différentes eaux en terme de contamination fécale. Nous avons ainsi pu mettre en évidence deux points de discordance entre les indicateurs de nature bactérienne et ceux de nature phagique :

- Le premier a été observé dans les eaux de rivière. En effet, parmi les indicateurs toujours détectés, les coliphages somatiques indiquent une pollution fécale plus importante que les coliformes thermotolérants ou les entérocoques, en particulier lorsque le point de prélèvement est situé en aval d'un rejet d'eaux usées.
- Le second a été observé dans les eaux souterraines où les indicateurs phagiques sous-estiment constamment la contamination fécale par rapport aux indicateurs bactériens.

Compte tenu de ces résultats, il nous a semblé intéressant d'approfondir l'étude du comportement des indicateurs essentiellement dans l'eau de rivière car dans ce type de milieu, les indicateurs phagiques semblent apporter une information différente de celle apportée par les indicateurs bactériens qui sont actuellement les seuls utilisés pour évaluer la qualité microbiologique d'une eau.

Partie 2

Étude du comportement des indicateurs dans l'eau de la rivière Moselle

Nous avons montré dans la partie précédente que les indicateurs phagiques donnaient une information différente du niveau de la contamination fécale par rapport aux indicateurs bactériens, notamment dans les eaux de rivière.

La différence constatée entre indicateurs bactériens et phagiques écarte l'hypothèse de la seule intervention d'un facteur de dilution de la matière fécale entre l'eau usée et l'eau de rivière. En effet, si le facteur de dilution était le seul à intervenir, on devrait constater la même action sur chacun des 6 microorganismes. Il faut donc admettre que chaque microorganisme est éliminé différemment de l'eau de rivière en fonction de ce que l'on pourrait appeler la capacité « auto-épuratrice » de la rivière (sédimentation, adsorption, inactivation...). Cette capacité dépend de paramètres environnementaux (température, UV, salinité...) dont l'impact diffère en fonction du type de microorganisme.

Pour vérifier cette hypothèse et évaluer cette capacité auto-épuratrice, nous avons étudié le comportement de 6 indicateurs dans l'eau de rivière en fonction du site de prélèvement et de différents paramètres physico-chimiques.

4 Influence des paramètres physico-chimiques

Les analyses d'eau de rivière ont été réalisées en 16 campagnes de prélèvement sur 6 sites : Méréville (site 1), Maron (site 2), Villey-le Sec (site 3), Pierre la Treiche (site 4), Chaudenay (site 5) et Gondreville (sites 6). Il est important de noter qu'il n'y a pas d'apport de contamination fécale avéré entre les sites 2 et 5 distants d'une dizaine de kilomètres. Au total 96 échantillons ont été analysés de février à novembre 2000.

Les concentrations moyennes (n=96) des différents microorganismes dans l'eau de rivière sont indiquées dans le Tableau 38. Afin de limiter les sous-estimations de concentrations, les valeurs en dessous du seuil de détection ont été considérées comme égales au seuil de détection. De plus, les résultats concernant les phages de *Bacteroides fragilis* n'ont pas été pris en compte car ces phages ne sont retrouvés que dans 58 % des échantillons.

Les coliphages somatiques sont les plus abondants. Comparativement, les coliformes thermotolérants, les bactériophages F-spécifiques, les entérocoques et les spores sont 6, 9, 15 et 56 fois moins abondants (test des signes de Wilcoxon, $p < 0,05$).

Tableau 38 : Concentration (log ufc ou ufp/100mL) des différents microorganismes dans l'eau de rivière

	Moyenne	Écart-type	<SD (%)
Coliformes thermotolérants	2,47	0,65	0
Enterocoques	2,05	0,64	0
Spores de bactéries anaérobies sulfito-réductrices	1,50	0,36	9
Coliphages somatiques	3,25	0,33	0
Bactériophages F-spécifiques	2,31	0,45	8
Phages de <i>Bacteroides fragilis</i>	58% de valeurs positives		42

<SD : inférieur au seuil de détection.

En même temps que les analyses microbiologiques, des mesures de température, de conductivité, de turbidité, de pH et de débit ont été réalisées. Afin de définir quels sont les paramètres qui influencent la densité des bactéries indicatrices et des bactériophages dans l'eau de rivière, des corrélations ont été recherchées sur l'ensemble des résultats.

Le Tableau 39 présente les coefficients de corrélation et les probabilités critiques qui existent entre les différents paramètres microbiologiques et les facteurs physico-chimiques (test de Spearman). Pour les calculs, seules les valeurs supérieures au seuil de détection ont été prises en compte.

Tableau 39 : Tests de corrélation (rang de Spearman, r_s) entre les différents paramètres mesurés

	Température		Débit		Conductivité		pH		Turbidité	
	r_s	p	r_s	p	r_s	p	r_s	p	r_s	p
Coliformes	-0,33**	0,0012	0,58**	<0,0001	-0,28**	0,0072	-0,27**	0,0183	0,02	0,8671
Entérocoques	-0,52**	<0,0001	0,67**	<0,0001	-0,42**	0,0001	-0,06	0,6109	-0,07	0,4726
Spores	-0,15	0,1670	0,09	0,4049	-0,16	0,1301	0,25*	0,0363	0,15	0,1686
Coliphages somatiques	0,23*	0,0249	0,08	0,4107	0,27**	0,0075	-0,12	0,2784	0,05	0,6051
Phages F-spécifiques	-0,29**	0,0067	0,52**	<0,0001	0,15	0,1742	-0,28*	0,0181	-0,05	0,6193
Phages de <i>B. fragilis</i>	-0,35*	0,0103	0,30*	0,0246	0,27*	0,0484	-0,13	0,3948	0,16	0,2472

p: probabilité critique

* Significatif au seuil de 5%

** Significatif au seuil de 1%

D'après ces résultats, la turbidité n'est corrélée avec aucun des paramètres microbiologiques. Concernant la conductivité, celle-ci a des relations variables avec les microorganismes : une corrélation positive est observée avec les coliphages somatiques et les phages de *Bacteroides fragilis* et négative avec les coliformes thermotolérants et les entérocoques. Aucune corrélation n'a été mise en évidence avec les phages F-spécifiques ou les spores. Le pH présente des corrélations négatives avec les coliformes thermotolérants et les bactériophages F-spécifiques et une corrélation positive avec les spores.

Concernant la température et le débit, il s'agit de variables climatiques car elles dépendent des saisons et/ou des précipitations. Ces variables influent significativement sur le comportement de 4 des 6 microorganismes, mais de manière opposée. Ainsi le débit est corrélé positivement et la température négativement avec les coliformes thermotolérants, les entérocoques, les bactériophages F-spécifiques, et les phages de *Bacteroides fragilis*. Seuls les coliphages somatiques et les spores ne présentent aucune corrélation avec le débit.

Il est important de noter que coliformes thermotolérants et coliphages somatiques sont en complète opposition par rapport aux facteurs physico-chimiques mesurés. Ainsi la température, la conductivité et le pH influencent significativement de manière négative la concentration en coliformes alors que ces paramètres présentent une corrélation positive ou non significative sur les coliphages somatiques. De même, le débit influence le comportement des coliformes thermotolérants alors que ce paramètre est sans effet sur les coliphages somatiques.

5 Détermination des capacités d'auto-épuration de l'eau de rivière

En se fondant sur les observations précédentes, et pour évaluer l'influence du site de prélèvement sur les concentrations en microorganismes, deux cas extrêmes ont été envisagés, l'un potentiellement **favorable** aux microorganismes (débit « fort » et température « faible ») et l'autre **défavorable** (débit « faible » et température « élevée »).

Arbitrairement, les valeurs ont été fixées comme suit:

- Favorable : température < 10°C et débit > 70m³/s ;
- Défavorable : température > 16°C et débit < 40m³/s ;
- Intermédiaire : toutes les autres valeurs.

D'après ces critères, cinq campagnes de prélèvement ont été réalisées durant la situation **favorable** (n=30) et quatre durant la situation **défavorable** (n=24). Les 7 autres campagnes appartiennent à une situation **intermédiaire** (n=42).

Le Tableau 40 présente les valeurs de température et de débit aux différentes dates de prélèvement et indique pour chacune d'elles la situation correspondante (favorable, défavorable ou intermédiaire).

Tableau 40 : Températures et débits en fonction de la date de prélèvement

Dates	Température (°C)	Débit (m ³ /s)	Conditions
22-Février	4,4	133	Favorable
25-Février	5,8	101	Favorable
29-Février	7,2	96	Favorable
16-Mars	7,8	74	Favorable
3-Avril	8,2	43	Intermédiaire
11-Avril	10,3	30	Intermédiaire
27-Avril	14,3	36	Intermédiaire
18-Mai	12,1	26	Intermédiaire
8-Juin	16,5	51	Intermédiaire
17-Juillet	14,0	98	Intermédiaire
3-août	18,6	35	Défavorable
21-août	19,4	12	Défavorable
12-Septembre	18,6	15	Défavorable
27-Septembre	17,7	11	Défavorable
31-Octobre	11,3	63	Intermédiaire
13-Novembre	9,0	96	Favorable

Sont présentées dans le Tableau 41 les concentrations moyennes pour les différents microorganismes, ainsi que le rapport des concentrations entre les échantillons prélevés en condition favorable et ceux prélevés en condition défavorable (Pour le calcul, les résultats négatifs sont considérés comme égaux au seuil de détection sauf en ce qui concerne les phages de *Bacteroides fragilis* pour lesquels un nombre trop important d'analyses n'a pas permis leur mise en évidence). Par ailleurs, le test ANOVA et le test des rangs en fonction des sites de prélèvement sont présentés dans le Tableau 42.

Tableau 41 : Concentrations des différents microorganismes (log ufc ou ufp/100mL) en fonction des conditions favorable, défavorable ou intermédiaire

Microorganismes	Favorable (n=30)			Intermédiaire (n=42)			Défavorable (n=24)			Rapport ^{a)} Fav./Déf.
	Moyenne	s	<SD(%)	Moyenne	s	<SD(%)	Moyenne	s	<SD(%)	
Coliformes	2,98	0,30	0	2,31	0,65	0	2,20	0,74	0	6,02
Entérocoques	2,71	0,16	0	1,83	0,62	0	1,79	0,66	0	8,32
Spores	1,60	0,37	0	1,39	0,29	14	1,56	0,39	12	1,10
Coliphages	3,18	0,21	0	3,28	0,31	0	3,29	0,46	0	0,78
Phages F-sp.	2,57	0,36	0	2,24	0,45	2	2,05	0,37	29	3,31
Phages de <i>B. fragilis</i>	1,81	0,26	13	57% de valeurs positives		43	25% de valeurs positives		75	-

a) Il s'agit du rapport entre les concentrations moyennes (en ufc ou ufp/100mL) obtenues en période favorable et celles obtenues en période défavorable ;
 <SD: pourcentage de valeur inférieur au seuil de détection ;
 s : écart-type.

Tableau 42 : Test ANOVA et test des rangs pour les différents microorganismes en fonction du site de prélèvement

Microorganismes	Favorable		Défavorable	
	ANOVA ^{a)} Pour les sites	Groupes homogènes ^{b)}	ANOVA ^{a)} Pour les sites	Groupes homogènes ^{b)}
Coliformes	P=0,4478	(5;6;1;4;2;3)	P=0,0001**	(4;3)(5)(1;6)(2)
Entérocoques	P=0,3003	(6;5;4;1;2;3)	P=0,0001**	(4;3)(5;1;6;2)
Spores	P=0,8770	(4;6;1;2;3;5)	P=0,2792	(5;3;1;4;6;2)
Coliphages	P=0,0340*	(1)(5;3;2;4;6)	P=0,1757	(5;4;1;3;6;2)
Phages F-spécifiques	P=0,9262	(6;3;5;1;2;4)	P=0,4606	(3;5;4;6;1;2)
Phages de <i>B. fragilis</i>	P=0,5784	(2;4;6;1;3;5)	P=0,5265 ^{c)}	(3;5;2;6;4;1)

a) Avant le test ANOVA, l'homogénéité des variances a été vérifiée par le test de Bartlett (toutes les valeurs de p étaient supérieures à 0,05) ;

b) Les sites sont présentés par ordre croissant de concentration ; Les sites qui ne sont pas différents entre eux au seuil de 5 % sont présentés entre parenthèses ;

c) Le test ANOVA a été réalisé sur les données brutes (non transformées en log) car de trop nombreuses valeurs sont estimées à zéro ;

* Significatif au seuil de 5 %

** Significatif au seuil de 1 %.

En condition **favorable** (n=30 : 5 dates et 6 sites de prélèvement) la température de l'eau a varié de 3,6 à 9,5°C et le débit de 74 à 133 m³/s. Le pH a varié entre 7,6 et 8,0, la conductivité entre 121 et 278 µS/cm et la turbidité entre 1,8 et 9,1 NTU.

Sous ces conditions, il apparaît que :

- Les coliphages somatiques sont les microorganismes les plus abondants avec 3,18 (log)ufp/100mL ;
- Comparativement, les coliformes thermotolérants, les entérocoques, les phages F-spécifiques, les phages de *Bacteroides fragilis* et les spores sont respectivement 2; 3; 4; 23 et 38 fois moins abondants (test de Wilcoxon, p<0,05) ;
- Les concentrations en microorganismes ne varient pas en fonction des sites de prélèvement sauf dans le cas des coliphages somatiques (ANOVA F-test, p=0,03), pour lesquels une augmentation significative est observée entre les sites 1 et 2 (LSD de Fisher, α =0,05).

Durant la période **défavorable** (n=24 : 4 dates et 6 sites de prélèvement) la température de l'eau a varié de 17,0 à 20,2°C et le débit de 11 à 35 m³/s. Le pH a varié entre 7,6 et 8,6, la conductivité entre 226 et 464 µS/cm et la turbidité entre 1,1 et 14,2 NTU.

Concernant les paramètres microbiologiques, il apparaît que :

- Seuls les coliformes thermotolérants, les entérocoques et les coliphages somatiques sont détectés dans 100 % des cas;
- Les coliphages somatiques sont les plus abondants avec 3,29 (log)ufp/100mL ;
- Les concentration en spores, bactériophages F-spécifiques et phages de *Bacteroides fragilis* sont en dessous du seuil de détection dans respectivement 12, 29 et 75 % des cas ;
- Comparativement aux coliphages somatiques, les coliformes thermotolérants, les bactériophages F-spécifiques, les entérocoques et les spores sont respectivement de 12, 17, 32 et 54 fois moins abondants (test de Wilcoxon, p<0,05) ;

- Les coliphages somatiques sont les seuls microorganismes parmi ceux qui sont toujours présents pour lesquels aucune diminution de la densité moyenne n'est observée entre les différents sites de prélèvement ;
- Les phages de *Bacteroides fragilis* n'étant pas détectés dans 75 % des cas, il est impossible d'estimer leur comportement durant cette période.

Pour ce qui est du rapport entre les concentrations en microorganismes obtenues en période favorable et celles obtenues en période défavorable, il est observé que seuls les spores et les coliphages somatiques ont un rapport proche de 1 ce qui signifie que ces microorganismes sont peu affectés par les facteurs environnementaux tels que température et débit de l'eau. Ce même rapport calculé pour les autres microorganismes est compris entre 3 et 9 ce qui montre de fortes variations de concentration entre les deux périodes considérées. L'existence de cette différence nous a conduit à étudier le devenir des microorganismes selon la période considérée.

En période favorable, tous les microorganismes ont des concentrations constantes quelque soit le site de prélèvement. Seuls les coliphages somatiques se distinguent par une augmentation sensible de leur concentration, mais uniquement entre les sites 1 et 2 témoignant ainsi d'un apport de contamination fécale avéré d'environ 15.000 éq.hab. entre ces deux sites (Figure 48).

En période défavorable au contraire, deux profils (Figure 49) peuvent être définis pour l'ensemble des microorganismes à l'exception des phages de *Bacteroides fragilis* :

- Profil 1 : la densité ne varie pas significativement entre les différents sites. Ceci est constaté pour les coliphages somatiques, les bactériophages F-spécifiques et les spores ;
- Profil 2 : la densité en microorganismes décroît significativement au site 3 et augmente au site 5. Ceci est le cas des coliformes thermotolérants et des entérocoques. Or il faut rappeler qu'entre les sites 2 et 4, il n'y a pas d'apport de pollution fécale et que cette portion de rivière semble particulièrement propice pour évaluer les capacités auto-épuratrices du milieu.

Compte tenu de l'existence de ces 2 profils, il nous a semblé intéressant de poursuivre l'étude en étudiant le devenir d'un représentant de chaque profil. Nous avons ainsi choisi de comparer coliphages somatiques (profil 1) et coliformes thermotolérants (profil 2) et d'évaluer la relation coliformes - coliphages dans l'eau de la rivière Moselle.

6 Évaluation de la relation « coliformes thermotolérants – coliphages somatiques » dans l'eau de rivière

Un total de 186 échantillons d'eau de rivière prélevée dans la Moselle ont été analysés en coliformes thermotolérants et en coliphages somatiques. Ils comprennent les 96 échantillons décrits dans cette partie et 90 autres échantillons exploités dans la sixième partie de ce mémoire. La Figure 50 présente l'ensemble des résultats.

Dans 84 % des cas (157/186), les coliphages somatiques sont en concentration plus importante que les coliformes thermotolérants ce qui se traduit graphiquement par une distribution des points majoritairement au-dessus de la droite d'équation $y=x$.

Ces résultats corroborent une différence de comportement des deux types d'indicateur dans l'eau de rivière. Ainsi, lorsque les conditions sont favorables ou lorsque le point de prélèvement est situé à proximité d'un point de rejet d'eaux usées, les concentrations en coliformes thermotolérants et en coliphages somatiques sont importantes. Par contre, plus le site de prélèvement est éloigné du point de contamination fécale, plus la différence de concentration entre coliphages somatiques et coliformes thermotolérants est importante. Ce phénomène étant fortement accentué en condition défavorable.

Figure 48 : Concentrations des différents microorganismes en fonction des périodes et des sites de prélèvement

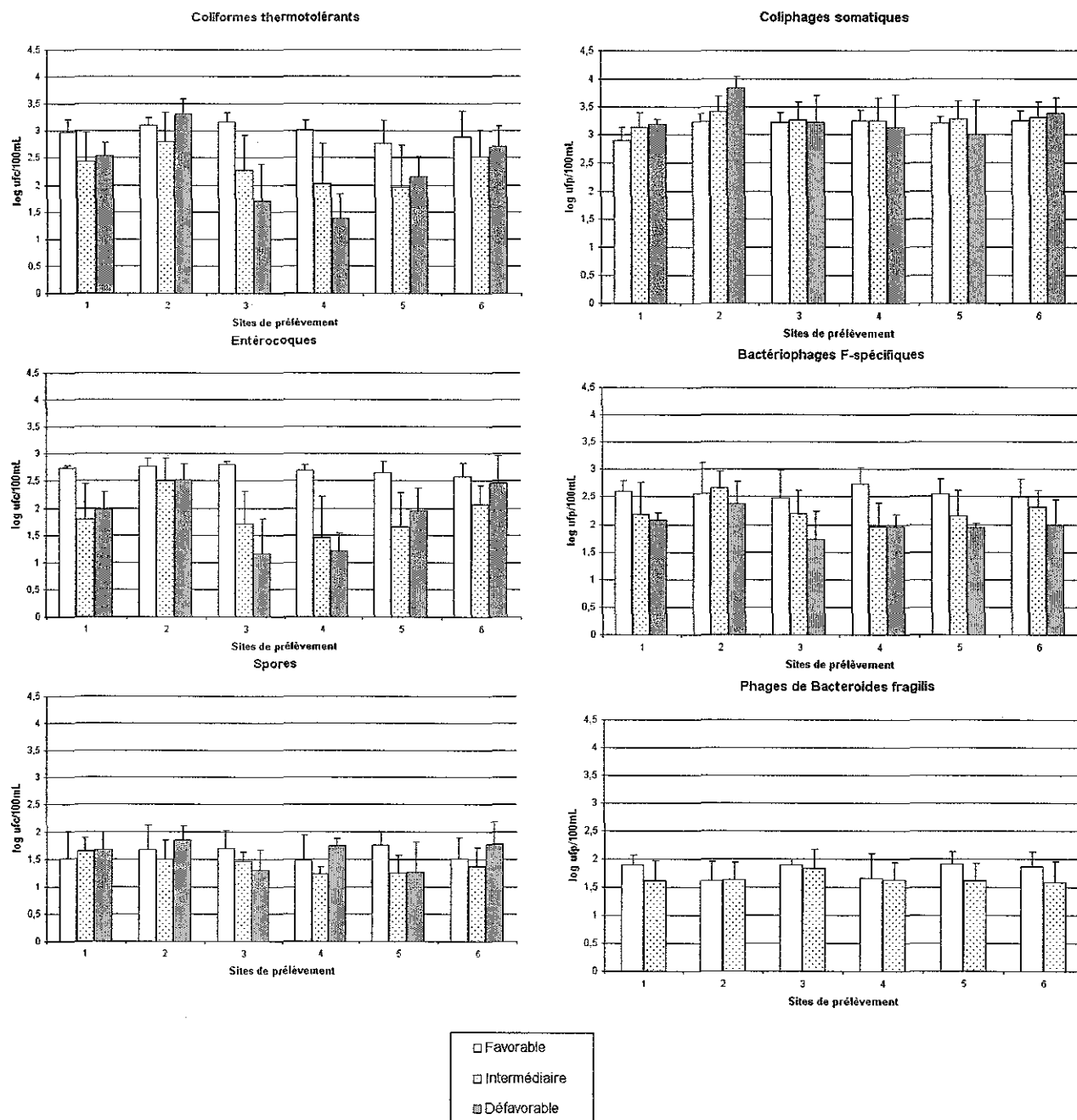


Figure 49 : Concentration en coliformes thermotolérants et coliphages somatiques en fonction du site de prélèvement et des conditions favorable, défavorable ou intermédiaire

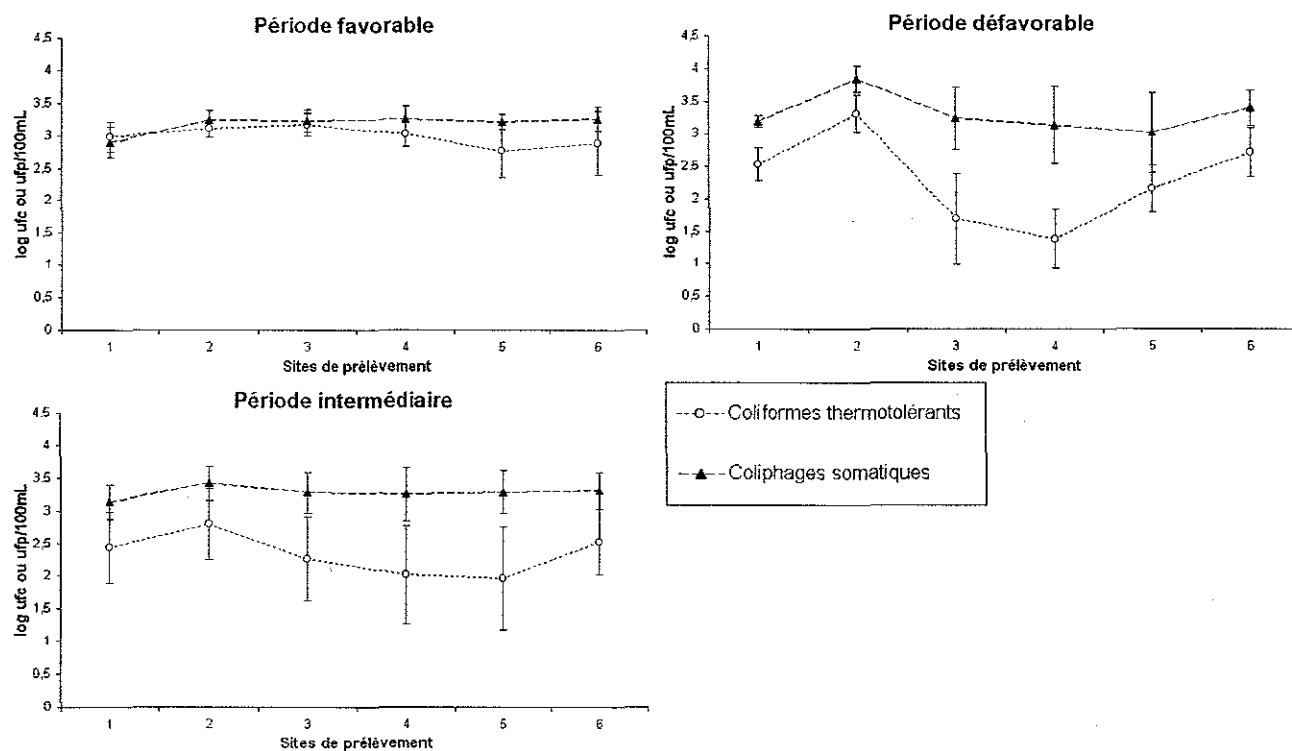
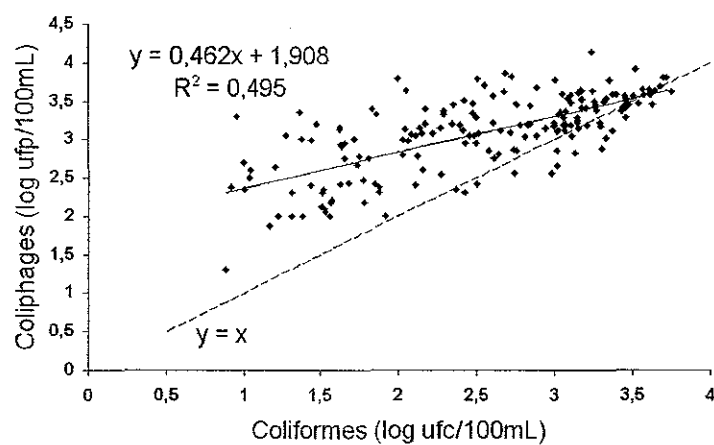


Figure 50 : Concentrations en coliphages somatiques en fonction des concentrations en coliformes thermotolérants dans l'eau de la rivière Moselle (n=186)



Discussion

Afin d'évaluer la capacité auto-épuratrice de la rivière, nous avons étudié plus particulièrement l'évolution des concentrations en fonction des sites de prélèvement. Pour tenir compte des résultats précédents, nous avons défini deux situations extrêmes, l'une favorable à la survie des microorganismes et l'autre défavorable. Dans les conditions favorables, avec un débit élevé et une température faible, la concentration des microorganismes ne varie pas ou peu le long de la rivière. Seules les concentrations en coliphages somatiques augmentent de manière significative entre les sites 1 et 2 révélant la présence d'un rejet d'eaux usées correspondant à 15.400 eq.hab.

Dans les conditions défavorables, le débit devient faible et la température élevée. Les sites 2, 3 et 4 entre lesquels il n'y a aucun apport de contamination fécale permettent d'évaluer la capacité auto-épuratrice de la rivière et les sites 5 et 6 de déterminer l'impact d'une pollution récente. Nos résultats montrent que les facteurs environnementaux agissent de manière significative sur les coliformes thermotolérants et les entérocoques dont les concentrations baissent au-delà du site 2. Les concentrations en bactériophages F-spécifiques, spores ou phages de *Bacteroides fragilis* sont également affectées avec respectivement 12, 29 et 75 % de valeurs en-dessous du seuil de détection. Seules les concentrations en coliphages somatiques ne semblent pas affectées par ces conditions défavorables.

Une diminution de la densité en indicateurs bactériens de contamination fécale (coliformes et entérocoques) et le maintien des concentrations en coliphages somatiques pendant la période estivale a également été rapporté par Keswick *et al.* (1984). Cette diminution peut être expliquée par l'augmentation de la température de l'eau (Mancini, 1978; Flint, 1987), la prédation (Fujioka *et al.*, 1981; McCambridge and McMeekin, 1981; Servais *et al.*, 1985 ; Beaudreau *et al.*, 2001), l'effet des UV (Fujioka *et al.*, 1981; Kapuscinski and Mitchell, 1981) ou l'adsorption-sédimentation (Wilkinson *et al.*, 1995).

Par ailleurs, les corrélations entre débit et coliformes thermotolérants d'une part et entre débit et entérocoques d'autre part sont plus fortes que celles qui relient les concentrations de ces mêmes microorganismes à la température de l'eau. Cette observation est étayée par les résultats du 17 juillet pour lesquels, malgré une température et un débit élevés (respectivement 14°C et 98 m³/s) les variations en coliformes thermotolérants et en entérocoques sont comparables à celles qui sont constatées pendant la période favorable (débit élevé mais faible température). Wilkinson *et al.* (1995) expliquent cette augmentation de la concentration bactérienne en période de fort débit par la capacité de l'eau à remettre en suspension sédiments et bactéries. Dans notre étude, le manque de corrélation entre la turbidité et les concentrations bactériennes peut s'expliquer par le fait que la turbidité dépend aussi bien de la présence de sédiments (débit élevé, hiver) que de la présence de biomasse (débit faible, été).

Concernant le comportement des coliformes thermotolérants par rapport aux coliphages somatiques dans l'eau de la rivière Moselle, il apparaît sur l'ensemble de nos résultats (n=186) que les coliformes thermotolérants présentent des concentrations plus faibles que les coliphages somatiques dans 84 % des cas. Cette observation confirme la différence de sensibilité des deux indicateurs faces aux facteurs environnementaux.

En conclusion, notre étude met en évidence que la température et le débit semblent être des facteurs prépondérants pour le devenir des microorganismes dans l'eau de rivière. Nos résultats montrent également que, dans nos conditions expérimentales, les coliphages somatiques sont moins sensibles aux facteurs environnementaux que les indicateurs bactériens classiquement utilisés pour l'évaluation de la contamination fécale. Cette différence de comportement entre indicateur bactérien et indicateur phagique pose naturellement la question de savoir d'une part quelles sont les raisons de cette différence, et d'autre part, lequel est le plus représentatif de la contamination fécale en général et de la contamination virale en particulier. Cependant, les réponses à ces questions ne peuvent être apportées au seul vu des résultats obtenus en milieu naturel et il nous a paru intéressant d'étudier en laboratoire la survie des indicateurs, plus particulièrement des coliformes thermotolérants et des coliphages somatiques de façon à apporter des éléments de réponse à ces interrogations.

Partie 3

Étude *in vitro* des coliformes thermotolérants et des coliphages somatiques dans l'eau de rivière

Parmi les 6 indicateurs que nous avons étudiés dans le milieu naturel, seuls les coliformes thermotolérants, les entérocoques et les coliphages somatiques sont toujours détectés.

Nos résultats ont montré par ailleurs que le comportement des coliphages somatiques se différencie de celui des coliformes thermotolérants et des entérocoques particulièrement pendant la période que nous avons qualifiée de défavorable et qui correspond à des conditions de faible débit ($<40\text{m}^3/\text{s}$) et de forte température ($>16^\circ\text{C}$).

Cette observation nous a conduit à mener des expériences de survie afin de :

- Vérifier si l'eau de rivière possédait un pouvoir inactivant sur les indicateurs ;
- Déterminer si le paramètre température est prépondérant dans les causes de l'évolution distincte de ces microorganismes ou si la composition de l'eau en été par rapport à celle d'hiver participait à ce phénomène.

Les coliformes thermotolérants et les entérocoques se comportant de la même manière, nous avons choisi pour ces expériences de sélectionner un seul de ces indicateur bactérien : les coliformes thermotolérants.

L'objectif est de mieux comprendre les différences de comportement entre un indicateur bactérien (les coliformes thermotolérants) et un indicateur phagique (les coliphages somatiques) entre la saison hivernale qui constitue des conditions plutôt favorables et la saison estivale où les conditions sont plutôt défavorables (chapitre 2, partie 2). Nous avons ainsi étudié l'influence de la composition de l'eau entre ces deux saisons mais aussi de la température.

7 Influence de la composition de l'eau de rivière sur le devenir des coliformes thermotolérants et des coliphages somatiques

L'influence de la composition de l'eau de rivière sur le comportement des coliphages somatiques et des coliformes thermotolérants est étudiée en deux parties distinctes. La première vise à évaluer si, d'une manière générale, l'eau de rivière contient des facteurs favorisant la diminution des concentrations en indicateurs. La deuxième tente de définir si ces facteurs sont modifiés en fonction de la composition hiver-été de l'eau de rivière, pouvant ainsi expliquer les différences de comportement entre les deux indicateurs (chapitre 2, partie 2) selon la période de l'année.

7.1 Impact global de la composition de l'eau de rivière sur les indicateurs

Pour tenter d'apporter des éléments de réponse, il nous a semblé intéressant de comparer les survies des deux types d'indicateur dans l'eau de rivière ainsi que dans un tampon phosphate isotonique (PBS) qui constitue un milieu stérile et non agressif. Les eaux de rivière diluées par le PBS à 10 et à 50 % (V/V) constituent des milieux intermédiaires.

7.1.1 Étude préliminaire

La mise en œuvre d'une telle expérience nécessite de faire des choix. En effet, contrairement à l'eau de rivière, le PBS ne contient pas naturellement de microorganismes. Il est donc nécessaire de procéder à une contamination artificielle. Pour se placer dans les conditions les plus proches possibles de celles rencontrées dans l'environnement, nous avons effectué la contamination du PBS avec des souches de coliformes thermotolérants et de coliphages somatiques directement isolées à partir de la rivière. Ces souches ont été multipliées en laboratoire et conservées à -80°C (cf. M&M).

Le choix du niveau de contamination s'est fait en considérant la nécessité d'avoir des concentrations suffisamment élevées pour que :

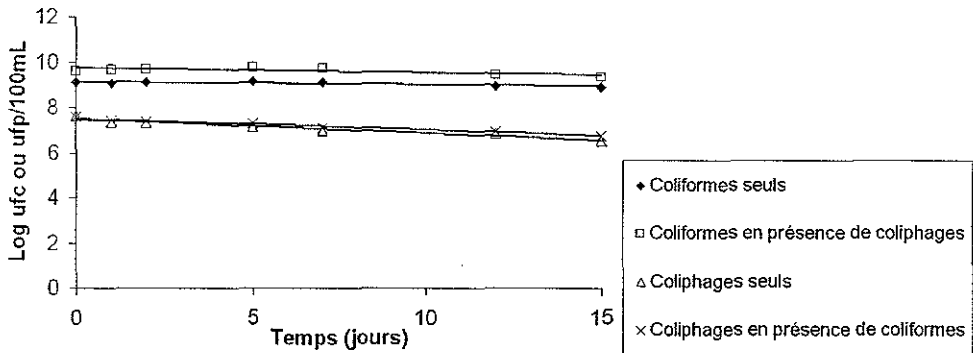
- la concentration des indicateurs naturellement présents dans l'eau de rivière soit négligeable par rapport à la contamination artificielle ;
- l'évaluation de la survie puisse être réalisée sur un temps suffisamment long.

Afin de répondre à ces exigences, nous avons choisi d'utiliser des concentrations d'environ 10^7 coliphages/100mL et de 10^9 coliformes/100mL.

Afin de s'assurer qu'il n'y avait pas d'interférence entre les deux microorganismes, une première expérience a été menée dans du PBS à 25°C . L'évolution des concentrations en coliformes thermotolérants a ainsi été évaluée en présence de coliphages somatiques. De la même manière, l'évolution des concentrations en coliphages a été évaluée avec et sans la présence de coliformes. Les résultats de ces expérimentations sont présentés dans la Figure 51. Aucune différence significative n'a été constatée (test de comparaison des pentes, $p>0,05$) au niveau des survies des

deux microorganismes, qu'ils soient seuls ou associés dans le milieu. Nous pouvons donc conclure que la survie de l'un des indicateurs n'est pas modifiée par la présence de l'autre. L'étude de survie a donc été menée simultanément pour les coliformes thermotolérants et les coliphages somatiques.

Figure 51 : Survie comparée des coliformes thermotolérants et des coliphages somatiques seuls ou associés



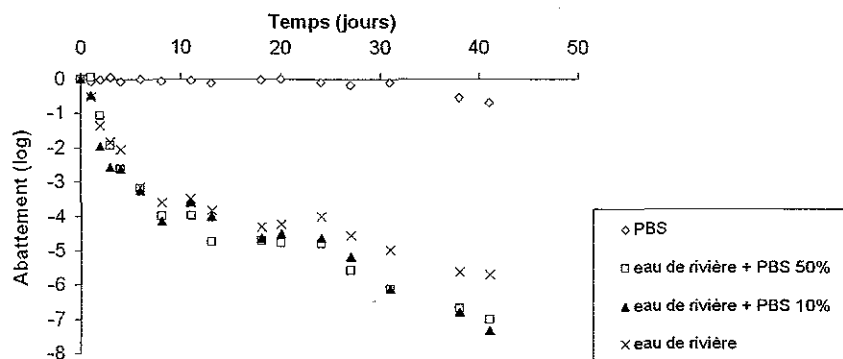
7.1.2 Évaluation de la présence d'un facteur inactivant dans l'eau de rivière

La disparition des coliformes thermotolérants et des coliphages somatiques a été étudiée à 25°C dans quatre milieux de composition différente : de l'eau de la rivière Moselle prélevée le 10 janvier sur le site de Maron (site 2), du PBS stérile ainsi que de l'eau de rivière diluée avec respectivement 10 et 50 % de PBS. Chaque milieu a été contaminé artificiellement avec 10⁸ coliphages/100mL et 10⁹ coliformes/100mL.

Pour les coliformes thermotolérants, les résultats sont présentés dans la Figure 52. Il apparaît clairement que les coliformes thermotolérants sont plus stables dans le PBS avec un abattement inférieur à 1 log en 40 jours, que dans l'eau de rivière où les concentrations en coliformes thermotolérants chutent de plus de 5 log sur la même période. Il est également remarquable que la dilution de l'eau de rivière avec 10 ou 50 % de PBS ne permet pas d'améliorer la survie des coliformes thermotolérants.

Ces résultats montrent clairement qu'il existe dans l'eau de rivière un ou plusieurs facteurs capables d'agir sur les coliformes thermotolérants. De plus, une dilution au demi de l'eau de rivière ne permet pas de réduire les effets du ou des facteurs incriminés.

Figure 52 : Evolution des concentrations en coliformes thermotolérants dans le PBS et l'eau de rivière pure ou diluée

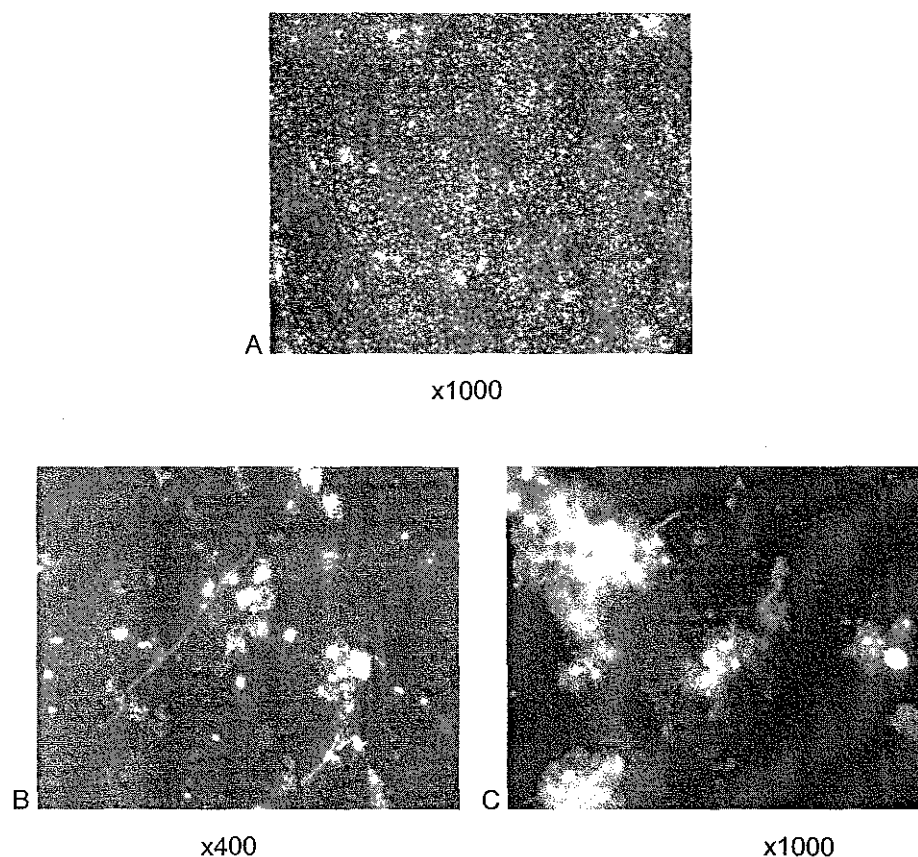


De façon à tenter d'en savoir plus sur les phénomènes pouvant expliquer ces comportements, nous avons réalisé au 43^{ième} jours de survie, une observation au microscope des différents milieux après marquage au DAPI. La Figure 53 montre que dans le PBS, les bactéries totales sont préférentiellement à l'état isolé (Figure 53 A) alors que dans l'eau de rivière, elles sont très majoritairement présentes sous forme agrégée ou adsorbée aux MES (Figures 53 B et C).

Par ailleurs, l'observation microscopique réalisée à partir d'eau de rivière diluée avec 10 ou 50 % de PBS présente exactement les mêmes caractéristiques que celle de l'eau de rivière pure, c'est-à-dire que le nombre de bactéries isolées qui y sont présentes est très faible.

Ainsi il est possible d'émettre l'hypothèse que les coliformes thermotolérants tendent à s'agréger dans l'eau de rivière pure ou diluée. Par contre, dans le PBS, les coliformes thermotolérants restent isolés.

Figure 53 : Observation microscopique au 43^{ème} jours de survie des bactéries dans le PBS (A) et dans l'eau de rivière (B et C) après marquage au DAPI

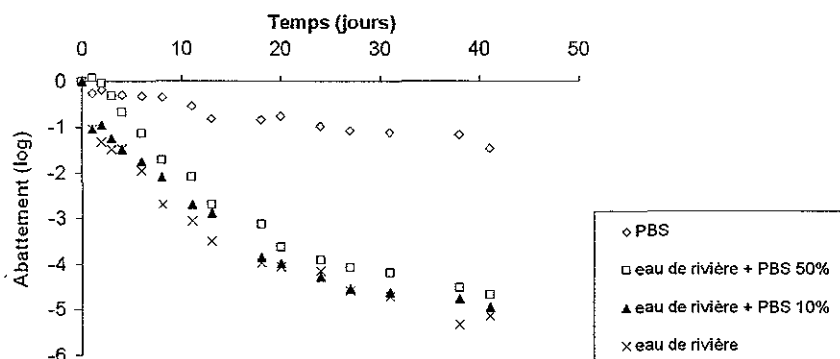


Pour les coliphages somatiques, les résultats sont présentés sur la Figure 54. Comme pour les coliformes thermotolérants, il apparaît que la persistance des coliphages somatiques est très largement améliorée dans le PBS par rapport à l'eau de rivière pure ou diluée. En effet, alors qu'une chute de plus de 4 log est constatée dans l'eau de rivière pure ou diluée après 40 jours d'expérimentation, une diminution inférieure à 2 log est observée dans le PBS.

À l'évidence, il n'y a aucune différence de survie entre l'eau de rivière et l'eau de rivière additionnée de 10 % de PBS. Par contre, la survie des coliphages somatiques semble légèrement améliorée dans l'eau de rivière additionnée de 50 % de PBS dans la mesure où la diminution de concentration des coliphages somatiques y est moins rapide et moins importante.

Ces résultats montrent clairement qu'il existe dans l'eau de rivière un facteur capable d'agir sur les concentrations des coliphages somatiques, et que la dilution à 50 % par le PBS permet une légère amélioration.

Figure 54 : Evolution des concentrations en coliphages somatiques dans le PBS et l'eau de rivière pure ou diluée



En conclusion, il existe bien un facteur inactivant dans l'eau de rivière capable d'agir sur les concentrations des coliformes thermotolérants et des coliphages somatiques et qui pourrait être en partie responsable du pouvoir « auto-épurateur » de la rivière.

7.2 Influence de la composition de l'eau de rivière entre hiver et été sur les indicateurs

Comme il a été démontré que l'eau de rivière possède un pouvoir inactivant sur les deux indicateurs, coliformes thermotolérants et coliphages somatiques, il semblait intéressant de déterminer si ce pouvoir inactivant varie en fonction des saisons. En d'autres termes, les différences de composition de l'eau entre hiver et été permettent-elles d'expliquer la disparition plus rapide des coliformes thermotolérants en été ?

Pour tenter de répondre à cette question, il nous a semblé important, dans la mesure où cela n'était pas indispensable, de ne pas avoir recours à une contamination artificielle du milieu. Ainsi, l'étude de la survie des coliformes thermotolérants et des coliphages somatiques a été réalisée à partir des populations « naturellement » présentes dans la rivière ce qui présente l'avantage de ne pas induire de biais méthodologique supplémentaire et donc de permettre une meilleure comparaison avec les phénomènes observés dans le milieu naturel.

Les survies des coliformes thermotolérants et des coliphages somatiques sont étudiées sous agitation constante (100 tr/min.) dans de l'eau de la rivière Moselle prélevée en hiver (le 10 janvier) et en été (le 4 septembre) sur la commune de Maron. Ces expériences de survie ont été menées en laboratoire sur des volumes de 5 litres sans contamination artificielle. Pour tenir compte de la température, nous avons placé chacun de ces volumes d'eau de rivière à respectivement à 4, 18 et 25°C. L'ensemble des analyses a permis d'évaluer des cinétiques de survie pour chacun des microorganismes en fonction du temps et de la composition de l'eau à une température donnée.

Pour les coliformes thermotolérants, l'évolution des concentrations à 4, 18 et 25°C en fonction de la composition de l'eau est représentée sur la Figure 55. Il apparaît que :

- à 4°C, la composition de l'eau (été/hiver) n'a aucune influence sur le devenir des coliformes thermotolérants (test de comparaison des pentes, $p>0,05$) ;
- à 18 et 25°C par contre, les coliformes thermotolérants persistent plus longtemps dans l'eau d'été que dans l'eau d'hiver (test de comparaison des pentes, $p<0,05$).

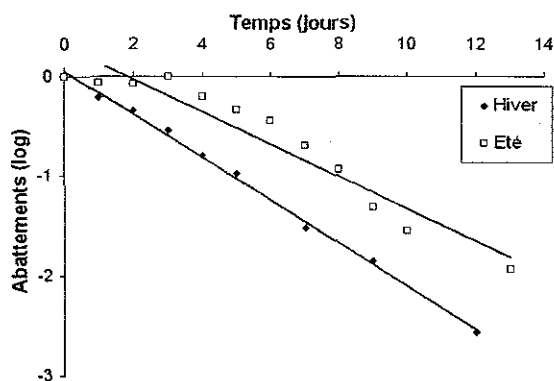
Il faut noter qu'à 4°C, dans l'eau d'été, une très faible variation de concentration est observée sur une période de 3 jours en tout début d'expérimentation. La prise en compte de ce plateau pour le calcul de la droite de régression ne modifie pas les conclusions, à savoir qu'il n'y a pas de différence significative entre les survies réalisées en hiver et en été à 4°C (T90 d'environ 5 jours).

Un tel ralentissement de la décroissance bactérienne n'est pas observé en eau d'hiver à 4°C. Il est possible que des phénomènes différents interviennent ou que ces phénomènes soient ralentis dans l'eau de rivière d'été. Par contre, ces différences apparaissent significativement à 18 et 25°C où le T90 varie d'environ 1 jour entre l'hiver et l'été.

Ainsi, l'eau d'hiver accélère la disparition des coliformes thermotolérants par rapport à l'eau d'été à 18 et 25°C mais pas à 4°C.

En fonction de ces résultats, nous pouvons conclure qu'il y a une différence de capacité « auto-épuratrice » entre l'eau de rivière d'hiver et d'été sur les coliformes thermotolérants. Néanmoins, il faut souligner que cette différence est faible et qu'elle n'est significative que pour des température de 18 et 25°C.

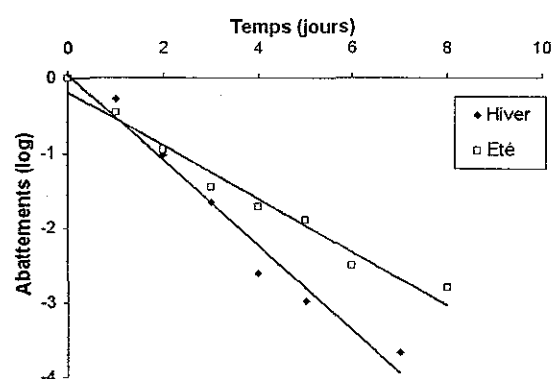
Figure 55 : Evolution des concentrations en coliformes thermotolérants à 4, 18 et 25°C en fonction de la composition de l'eau (hiver-été)



4°C

	Équations	n	r ²	T90 (j)
Hiver	$y = -0,216x + 0,054$	9	0,997	4,6
Eté	$y = -0,162x + 0,294$	12	0,919	6,2

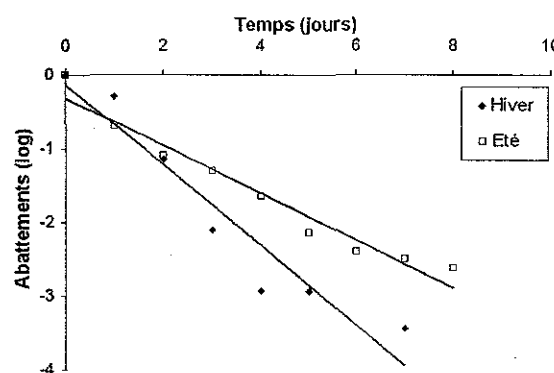
Comparaison hiver/été : significativement non différents (test de comparaison des pentes, $p < 0,05$)



18°C

	Équations	n	r ²	T90 (j)
Hiver	$y = -0,571x + 0,049$	7	0,973	1,7
Eté	$y = -0,356x - 0,183$	8	0,971	2,8

Comparaison hiver/été : significativement différents (test de comparaison des pentes, $p < 0,05$)



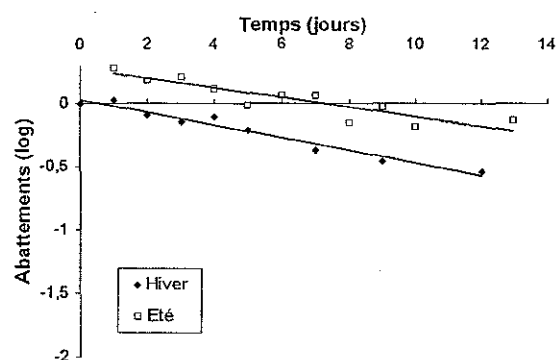
25°C

	Équations	n	r ²	T90 (j)
Hiver	$y = -0,545x - 0,123$	7	0,918	1,8
Eté	$y = -0,323x - 0,313$	9	0,958	3,1

Comparaison hiver/été : significativement différents (test de comparaison des pentes, $p < 0,05$)

Pour les coliphages somatiques, l'évolution des concentrations à 4, 18 et 25°C en fonction de la composition de l'eau est représentées sur la Figure 56. Il apparaît que la composition de l'eau (hiver/été) ne modifie pas significativement la survie des coliphages somatiques quelle que soit la température (test de comparaison des pentes, $p > 0,05$).

Figure 56 : Évolution des concentrations en coliphages somatiques à 4, 18 et 25°C en fonction de la composition de l'eau (hiver-été)

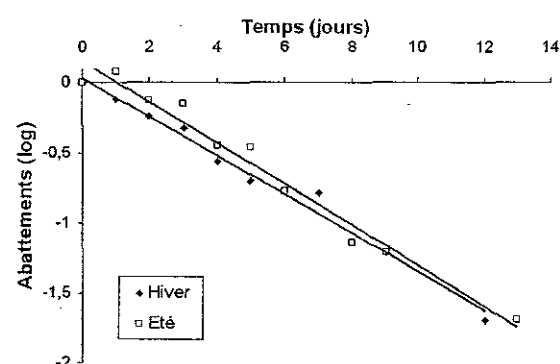


4°C

	Équations	n	r ²	T90 (j)
Hiver	$y = -0,050x + 0,029$	9	0,957	20*
Été	$y = -0,029x + 0,195$	11	0,583	26*

* : La pente étant très faible, il existe une grande incertitude dans l'estimation du T90. Il faut donc garder une grande prudence concernant ces valeurs.

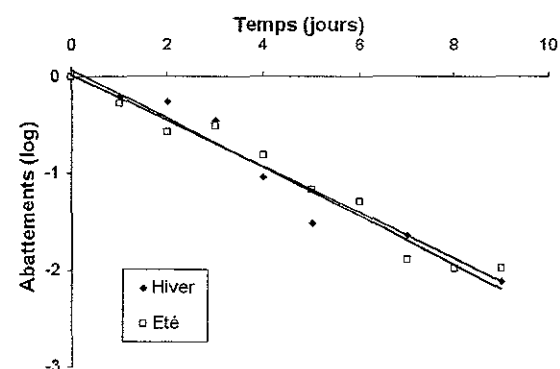
Comparaison hiver/été : significativement non différents (test de comparaison des pentes, $p < 0,05$)



18°C

	Équations	n	r ²	T90 (j)
Hiver	$y = -0,139x + 0,034$	9	0,986	7,2
Été	$y = -0,146x + 0,152$	10	0,973	6,8

Comparaison hiver/été : significativement non différents (test de comparaison des pentes, $p < 0,05$)



25°C

	Équations	n	r ²	T90 (j)
Hiver	$y = -0,252x + 0,071$	8	0,951	4,0
Été	$y = -0,237x + 0,018$	10	0,965	4,2

Comparaison hiver/été : significativement non différents (test de comparaison des pentes, $p < 0,05$)

8 Influence de la température de l'eau de rivière sur la survie des indicateurs

Pour l'ensemble des données obtenus en eau de rivière, les survies pour chaque microorganisme en terme de T90 en fonction de la température et de la composition de l'eau entre hiver et été sont représentées dans la Figure 57. Cette figure rappelle que même si les T90 sont significativement différents entre hiver et été à 18 et 25°C pour les coliformes thermotolérants, cette différence reste faible (environ 1 jour). Par contre, pour les coliphages somatiques qui ne présentent aucune différence significative entre les survies en hiver et été, la température influence de façon considérable les T90 entre 4, 18 et 25°C pour les deux paramètres. Cette figure montre également que plus la température est basse, plus la différence de comportement entre les coliphages somatiques et les

coliformes thermotolérants est importante. Il faut aussi garder en mémoire que, quelles que soient les conditions, les coliphages somatiques ont toujours un T90 significativement supérieur à celui des coliformes thermotolérants. Ceci est confirmé par la Figure 58 qui présente l'abattement des coliphages somatiques en fonction de l'abattement des coliformes thermotolérants indépendamment de la température ou de la composition de l'eau. En effet, l'abattement des coliformes thermotolérants est toujours supérieur à celui des coliphages somatiques quelles que soient les conditions testées.

Figure 57 : Évolution du T90 pour les coliformes thermotolérants et les coliphages somatiques dans l'eau de rivière en fonction de la température et de la composition de l'eau (hiver - été)

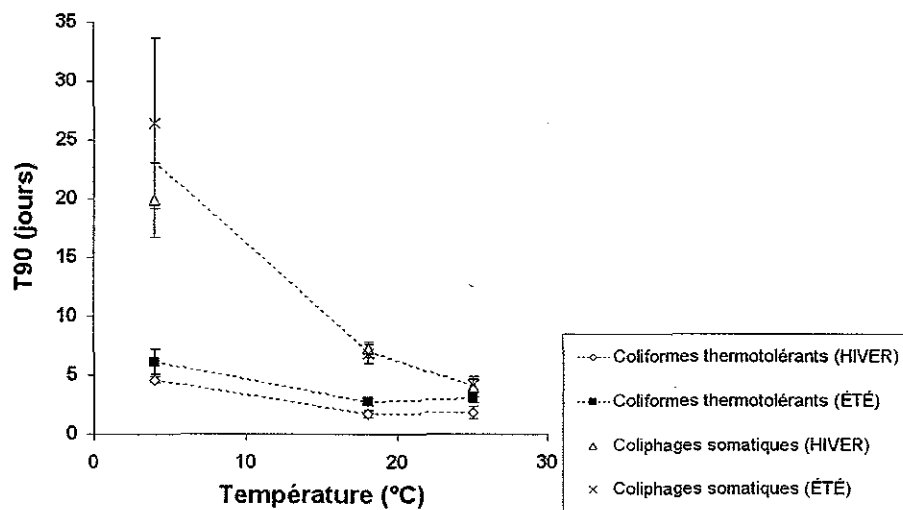
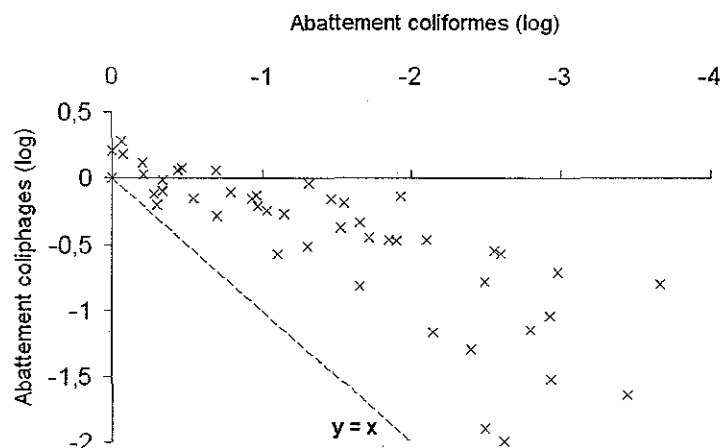


Figure 58 : Abattement des coliphages somatiques en fonction de l'abattement des coliformes thermotolérants indépendamment de la température ou de la composition de l'eau (n=52)



La droite $y=x$ représente une égalité parfaite entre les abattements des coliphages somatiques et des coliformes thermotolérants.

Discussion

Suite aux observations du comportement des différents indicateurs bactériens et phagiques dans les eaux de la rivière Moselle, nous avons décidé d'étudier plus particulièrement les coliformes thermotolérants et les coliphages somatiques. Cette étude expérimentale comparative a permis d'évaluer le comportement relatif de ces deux indicateurs en fonction de la composition de l'eau. Ainsi, nos résultats montrent clairement que dans l'eau de rivière, un certain nombre de paramètres provoque une disparition des coliformes thermotolérants et des coliphages somatiques. Une diminution de plus de 3 log est observée après 20 jours dans l'eau de rivière à 25°C alors que dans le même temps, une très faible variation est mesurée dans un tampon phosphate isotonique (PBS).

Deux raisons principales peuvent expliquer une telle disparition : l'adsorption des microorganismes et/ou l'inactivation.

Dans nos conditions expérimentales, l'adsorption semble être un facteur agissant sur les coliformes thermotolérants. En effet, une observation microscopique après marquage au DAPI montre une répartition homogène des bactéries dans le PBS alors que des amas bactériens adsorbés sur des MES constituent l'essentiel des populations bactériennes dans l'eau de rivière.

Or, l'adhésion peut être confondue avec une inactivation dans la mesure où :

- elle provoque une diminution apparente de la concentration du microorganisme adsorbé dans le milieu ;
- elle permet éventuellement une sédimentation plus rapide de ces microorganismes et donc une disparition de la phase eau.

Or, il a été démontré que de nombreux paramètres tels que la salinité, le pH, la valence des ions, la présence de matière organique, ... influencent les phénomènes d'adsorption/agrégation aussi bien chez les bactéries (Bos *et al.*, 1984 ; Jewett *et al.*, 1995 ; Johnson et Logan, 1996 ; Bos *et al.*, 1999 ; Hermansson, 1999 ; Rijnaarts *et al.*, 1999 ; Poortinga *et al.*, 2002 ; Dan, 2003) que chez les virus (Payment *et al.*, 1976 ; Gerba, 1984 ; Quignon, 1995 ; Quignon *et al.*, 1995 ; Lukasik *et al.*, 2000 ; Schijven et Hassanizadeh, 2000). L'élévation de la température, en augmentant l'agitation moléculaire du milieu peut également accélérer les phénomènes d'agrégation/adsorption (Grémy et Leterrier, 1966).

Dans un milieu aussi complexe que l'eau de rivière, il est évidemment difficile de déterminer quels paramètres sont impliqués et leur rôle exact.

L'inactivation peut également être responsable de la disparition des microorganismes dans l'eau de rivière. Dans ce cas, la température, la présence de bactéries autochtones, les chocs osmotiques, la prédation... sont autant de paramètres décrits dans la littérature comme ayant un impact sur la survie des bactéries (Flint, 1987 ; Mc Cambridge et Mc Meekin, 1981 ; Kapuscinski et Mitchell, 1981 ;

Servais *et al.*, 1985 ; Dupray et Derien, 1995 ; Medema *et al.*, 1997b) ou des virus (O'Brien et Newman, 1977 ; Gantzer *et al.*, 1998 ; Schijven et Hassanizadeh, 2000).

Il est une nouvelle fois impossible en fonction des résultats obtenus de privilégier un seul de ces paramètres. Par contre, quel que soit le phénomène en cause, nos résultats démontrent que la composition de l'eau de rivière qui est différente entre l'été et l'hiver en terme de paramètres physico-chimiques (annexe) et vraisemblablement microbiologique (flore autochtone) influence très peu le comportement des indicateurs. En effet, la seule différence significative est observée avec les coliformes thermotolérants pour lesquels une diminution plus rapide est constatée dans l'eau d'hiver par rapport à l'eau d'été à 18 et 25°C avec cependant une faible variation du T90 qui est d'environ 1 jour.

De plus, dans les conditions environnementales, la température de l'eau de rivière qui circule en hiver est plus proche de 4°C. Or, à cette température, les cinétiques de survie des coliformes thermotolérants ne diffèrent pas.

À l'inverse, la température est un paramètre important qui agit aussi bien sur les coliformes thermotolérants que sur les coliphages somatiques dans l'eau de rivière. La température peut ainsi jouer un rôle direct en inactivant les coliformes thermotolérants et les coliphages somatiques, mais aussi indirect en favorisant par exemple le développement d'une flore autochtone, celle-ci pouvant être responsable soit d'une inactivation des coliformes thermotolérants par compétition (Flint, 1987 ; Rozen et Belkin, 2001), soit d'une disparition par co-agrégation/co-adhésion (Bos *et al.*, 1994 ; Bos *et al.*, 1999 ; Hermansson, 1999).

En conclusion, l'ensemble de nos résultats apporte des précisions importantes par rapport aux observations réalisées à partir des échantillons de l'environnement (chapitre 2, partie 2). Ces résultats suggéraient en effet que les coliphages somatiques persistent plus longtemps que les coliformes thermotolérants dans l'eau de rivière principalement en été. Nos résultats expérimentaux confirment cette observation, mais soulignent surtout que cette différence est à priori encore plus grande en hiver (T90=4,6 jours pour les coliformes thermotolérants contre 20 jours pour les coliphages somatiques).

Ainsi, si nous extrapolons nos résultats *in vitro* à l'environnement, il apparaît que les coliformes thermotolérants qui disparaissent plus rapidement que les coliphages somatiques dans l'eau de la rivière, sont capables de sous-estimer la charge fécale même en hiver si la distance à parcourir est suffisamment importante. Or, lorsque l'eau de rivière est utilisée comme ressource en eau potable, le point de captage est en général le plus éloigné possible d'une zone de contamination fécale.

RÉSULTATS

CHAPITRE III

Indicateurs de contamination fécale et pollution virale d'une eau de rivière

Partie 1 : Indicateurs de contamination fécale et pollution virale d'une eau de rivière ; Étude in vitro	154
1 Influence de la température (4, 18 et 25°C) sur le <i>poliovirus</i> dans l'eau de rivière prélevée en hiver	155
2 Influence de la composition de l'eau (hiver-été) sur le <i>poliovirus</i> dans l'eau de rivière	156
3 Comparaison des cinétiques de survies du <i>poliovirus</i> infectieux et du génome de <i>poliovirus</i>	159
4 Comparaison de l'évolution des indicateurs par rapport au <i>poliovirus</i>	160
Discussion	165
 Partie 2 : Virus pathogènes et indicateurs de contamination virale dans l'eau de rivière	 167
5 Étude méthodologique préliminaire	168
6 Analyse <i>in situ</i>	172
7 Étude de la relation entre concentration en indicateur et présence de génome viral	175
Discussion	177

CHAPITRE III

Indicateurs de contamination fécale et pollution virale d'une eau de rivière

Après avoir étudié comparativement les indicateurs bactériens et phagiques en tant qu'outil de mesure de l'efficacité de traitement et de la charge fécale des ressources en eau, il était important d'aborder l'intérêt de ces microorganismes en tant qu'indicateur de la contamination virale.

Pour qu'un indicateur de contamination fécale soit validé en tant qu'indicateur de contamination virale, il doit toujours être présent lorsque le virus pathogène est présent et donc il est impératif qu'il présente une persistance dans le milieu qui soit au moins équivalente à celle des virus pathogènes. Enfin, il serait souhaitable que la densité en indicateur soit corrélée à la densité en pathogène.

Nous avons abordé cette problématique uniquement pour l'eau de rivière. Celle-ci se divise en deux parties distinctes :

- la première *in vitro* a consisté à étudier comparativement la persistance des indicateurs à celle de virus pathogènes
- la deuxième, réalisée sur le terrain, a pour but de définir si la densité en indicateurs est corrélée avec le niveau de pollution virale.

L'objectif est d'évaluer l'intérêt des indicateurs en tant qu'outils de mesure de la pollution virale dans l'eau de rivière.

Partie 1

Indicateurs de contamination fécale et pollution virale d'une eau de rivière - Étude *in vitro* -

En fonction des résultats précédents, nous avons choisi de travailler uniquement avec un indicateur bactérien, les coliformes thermotolérants et un indicateur phagique, les coliphages somatiques. En effet, ces deux indicateurs donnent des informations différentes en terme de charge fécale dans l'eau de rivière. Leur persistance a été comparée à celle d'un virus entérique choisi comme modèle : le poliovirus de type 1. C'est la persistance du poliovirus infectieux détecté par culture cellulaire qui constituera la référence.

Néanmoins, depuis l'application des techniques de biologie moléculaire à l'environnement, certains auteurs considèrent que la détection du génome viral pourrait être suffisante pour témoigner de la présence de virus infectieux. Mais cette affirmation n'est justifiée que si le comportement du pouvoir infectieux et du génome sont identiques dans le milieu hydrique. C'est pourquoi la persistance du génome du poliovirus est suivie en même temps que celle du poliovirus infectieux.

L'étude a été réalisée *in vitro* dans l'eau de la rivière Moselle prélevée d'une part en hiver et d'autre part en été et placée à trois températures (4, 18 et 25°C). Chaque eau de rivière a été contaminée artificiellement avec environ 2.10^8 nppuc/mL de poliovirus infectieux. L'évolution des concentrations en poliovirus infectieux et en génome viral sont suivies en fonction du temps respectivement par culture cellulaire et RT-PCR quantitative. Pour les comparaisons avec les indicateurs représentés par les coliformes thermotolérants et les coliphages somatiques, c'est la contamination naturelle de l'eau de rivière qui est suivie (Chapitre 2, partie 3).

Ceci a permis d'étudier successivement l'influence de la température et de la composition de l'eau entre été et hiver sur la persistance du poliovirus infectieux et de son génome. Enfin, les résultats sont comparés aux survies des indicateurs placés dans les mêmes conditions.

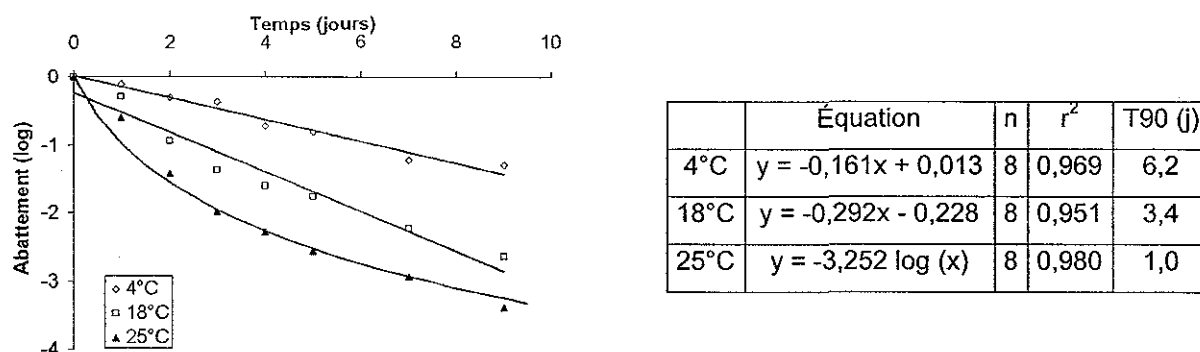
La quantification du poliovirus infectieux a été réalisée par culture cellulaire selon la technique du nombre le plus probable d'unités cytopathogènes (NPPUC). La quantification du nombre de copie du génome de poliovirus a été réalisée par RT-PCR quantitative.

1 Influence de la température (4, 18 et 25°C) sur le poliovirus dans l'eau de rivière prélevée en hiver

Nous envisagerons successivement le devenir du poliovirus infectieux puis de son génome.

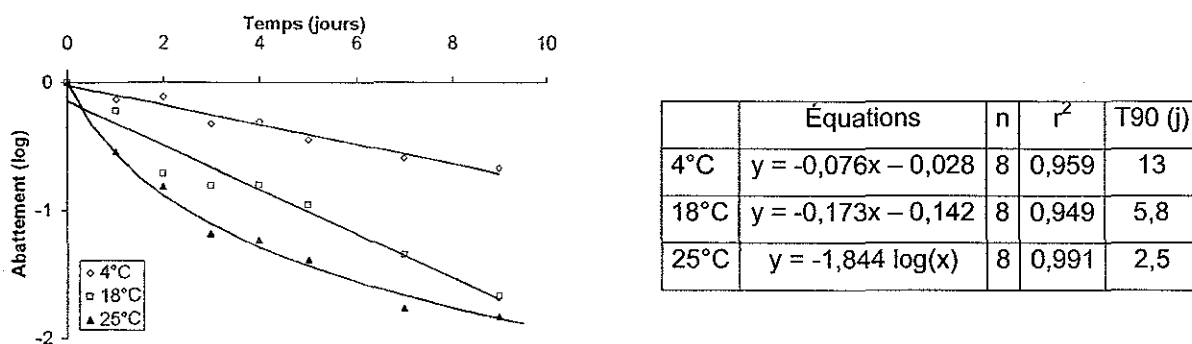
La Figure 59 présente l'évolution des concentrations en poliovirus infectieux dans l'eau de rivière prélevée en hiver en fonction de la température et donne les équations des droites de régression ainsi que les coefficients de corrélation correspondants. À 25°C, la survie du poliovirus infectieux est mieux décrite par une équation logarithmique en fonction du temps que par une régression linéaire. Si l'on compare les survies du poliovirus infectieux à 4 et 18°C, il apparaît que la survie diminue au cours du temps au fur et à mesure que la température augmente (test de comparaison des pentes, $p > 0,05$). Ainsi le T90 varie de 6,2 jours à 4°C à 3,4 jours à 18°C. Lorsque la température atteint 25°C, la disparition du poliovirus infectieux décroît en fonction du logarithme du temps et le T90 correspondant peut être évalué à 1 jour. Les résultats confirment que la vitesse de disparition du poliovirus infectieux dans l'eau de rivière au cours du temps augmente lorsque la température augmente.

Figure 59 : Survie du poliovirus infectieux dans l'eau de rivière à 4, 18 et 25°C



La Figure 60 présente l'évolution des concentrations en génome de poliovirus dans l'eau de rivière aux trois températures et donne les équations des droites de régression correspondantes. Il faut noter qu'à 25°C, comme pour le poliovirus infectieux, la meilleure représentation du devenir du génome est donnée par une équation logarithmique du temps. Concernant l'effet de la température, il apparaît qu'à 18°C la diminution des concentrations en génome viral est plus rapide que celle observée à 4°C (comparaison des pentes, $p > 0,05$). Ainsi, le T90 varie de 13 jours à 5,8 jours lorsque la température passe de 4 à 18°C. À 25°C, le T90 n'est plus que de 2,5 jours. Ceci montre que la vitesse de disparition du nombre de copies du génome de poliovirus dans l'eau de rivière au cours du temps augmente lorsque la température augmente.

Figure 60 : Evolution des concentrations en génome de poliovirus dans l'eau de rivière à 4, 18 et 25°C



En fait, l'évolution des concentrations en poliovirus infectieux en fonction du temps semble être la même que celle du génome pour une même température avec simplement un décalage (différence au niveau de l'échelle de l'axe des ordonnées) traduisant une persistance plus importante du génome viral.

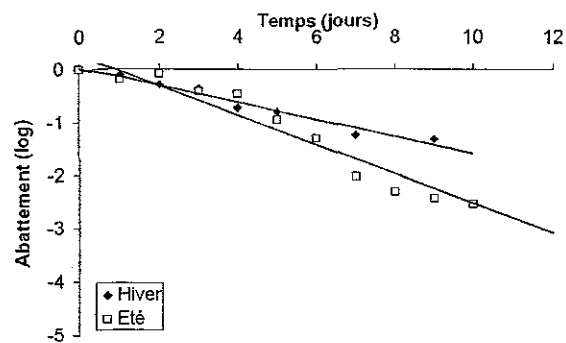
2 Influence de la composition de l'eau (hiver-été) sur le poliovirus dans l'eau de rivière

Comme précédemment, nous envisagerons successivement le devenir du poliovirus infectieux puis de son génome.

La Figure 61 présente l'évolution des concentrations en poliovirus infectieux dans l'eau de rivière en fonction de la composition de l'eau (hiver-été) et donne les équations des régressions correspondantes. Il est clair que certaines de ces régressions présentent un meilleur coefficient de corrélation lorsqu'elles sont représentées par une fonction logarithmique du temps. C'est le cas pour toutes les survies à 25°C et celle à 18°C dans l'eau d'été.

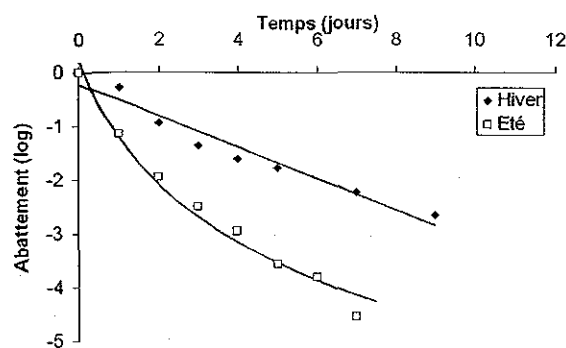
Concernant l'influence de la composition de l'eau, il apparaît que la survie du poliovirus infectieux est toujours plus importante dans l'eau de rivière prélevée en hiver que dans celle prélevée en été quelle que soit la température (test de comparaison des pentes, $p < 0,05$).

Figure 61 : Évolution des concentrations en poliovirus infectieux dans l'eau de rivière à 4, 18 et 25°C en fonction de la composition de l'eau (hiver-été)



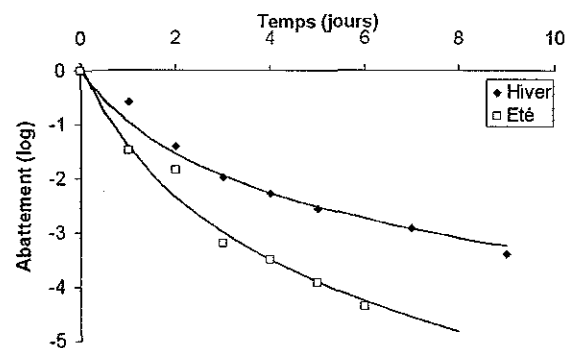
4°C

	Équations		r^2	T90 (j)
Hiver	$y = -0,161x + 0,013$	8	0,97	6,2
Été	$y = -0,277x + 0,242$	12	0,950	3,6



18°C

	Équations	n	r^2	T90 (j)
Hiver	$y = -0,292x - 0,228$	8	0,951	3,4
Été	$y = -4,833 \log(x) + 0,219$	8	0,980	0,6



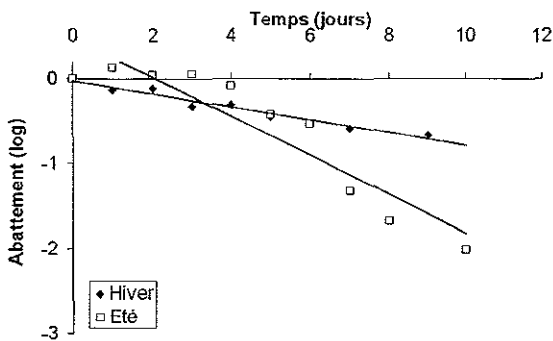
25°C

	Équations		r^2	T90 (j)
Hiver	$y = -3,252 \log(x)$	8	0,980	1,0
Été	$y = -5,193 \log(x) + 0,128$	7	0,978	0,5

La Figure 62 présente l'évolution des concentrations du génome de poliovirus dans l'eau de rivière en fonction de la composition de l'eau (hiver-été) et donne les équations des régressions correspondantes. Comme pour le poliovirus infectieux, certaines de ces régressions présentent un meilleur coefficient de corrélation lorsqu'elles sont représentées par une fonction logarithmique du temps. C'est le cas pour toutes les survies à 25°C et celle à 18°C dans l'eau d'été.

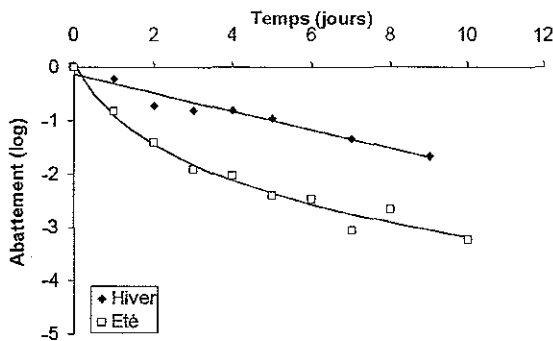
Concernant l'influence de la composition de l'eau, il apparaît que comme pour le virus infectieux, la survie du génome de poliovirus est toujours plus importante dans l'eau de rivière prélevée en hiver que dans celle prélevée en été quelle que soit la température (test de comparaison des pentes, $p < 0,05$).

Figure 62 : Evolution des concentrations en génome de poliovirus dans l'eau de rivière à 4, 18 et 25°C en fonction de la composition de l'eau (hiver-été)



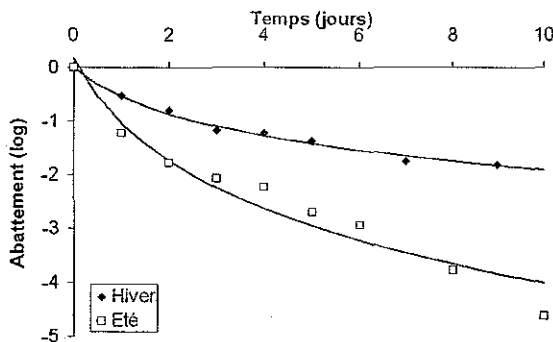
4°C

	Équations	n	r ²	T90 (j)
Hiver	$y = -0,076x - 0,028$	8	0,959	13,1
Eté	$y = -0,231 + 0,481$	10	0,858	4,3



18°C

	Équations	n	r ²	T90 (j)
Hiver	$y = -0,173x - 0,142$	8	0,949	5,8
Eté	$y = -3,094\log(x) + 0,040$	10	0,980	3,6



25°C

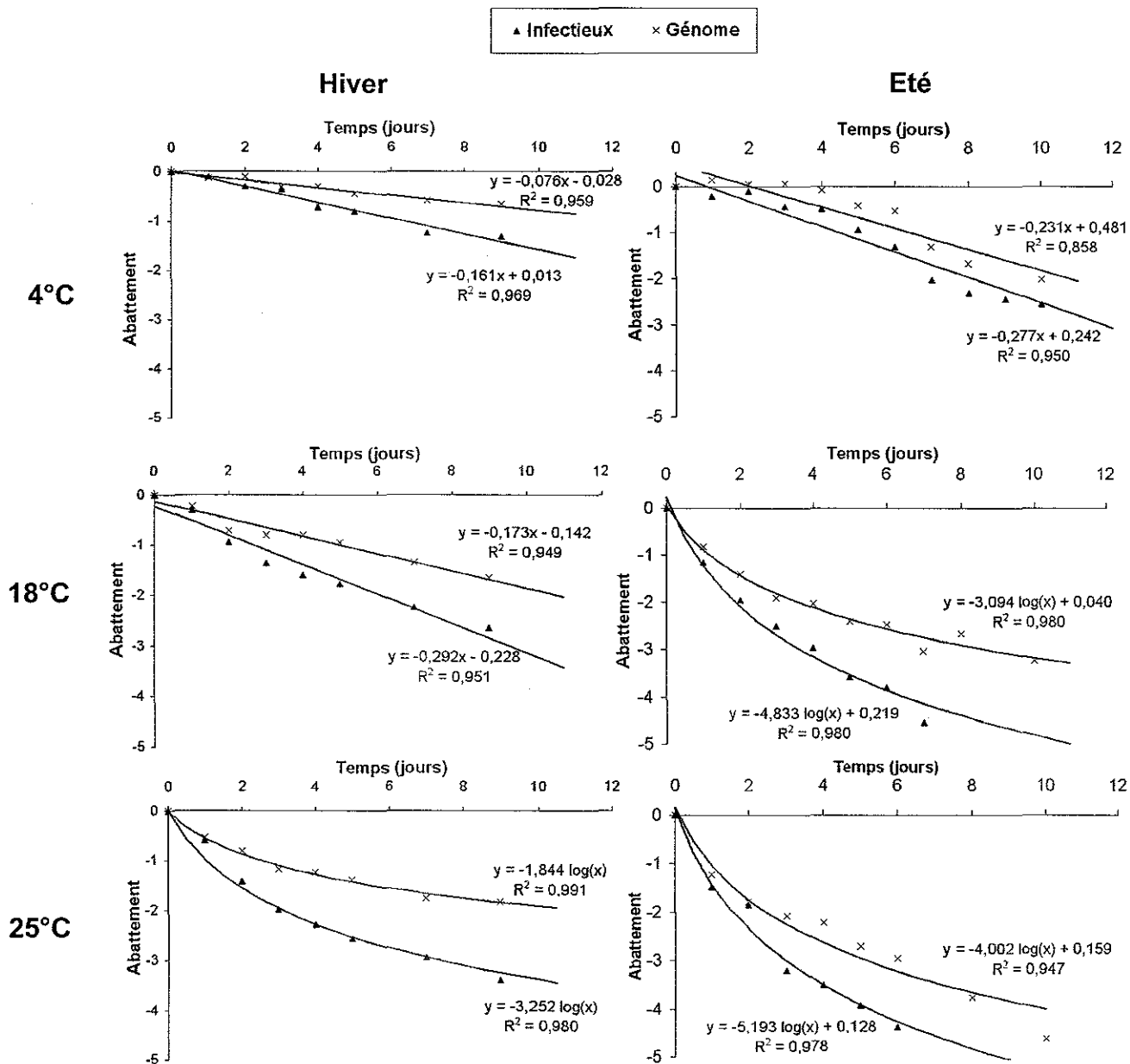
	Équations	n	r ²	T90 (j)
Hiver	$y = -1,844 \log(x)$	8	0,991	2,5
Eté	$y = -4,002 \log(x) + 0,159$	8	0,947	0,8

Comme pour la température, l'évolution des concentrations en poliovirus infectieux en fonction du temps semble être la même que celle du génome pour une même composition (hiver-été) avec un décalage (différence au niveau de l'échelle de l'axe des ordonnées) traduisant une fois encore une persistance plus importante du génome viral.

3 Comparaison des cinétiques de survies du poliovirus infectieux et du génome de poliovirus

La Figure 63 permet de comparer la survie du poliovirus infectieux à la persistance de son génome. Il apparaît ainsi clair que, quelles que soient les conditions de température et de composition de l'eau, le poliovirus infectieux disparaît plus rapidement que le génome.

Figure 63 : Comparaison de la survie du poliovirus infectieux à la persistance de son génome à 4, 18 et 25°C dans l'eau de rivière prélevée en hiver et en été



4 Comparaison de l'évolution des Indicateurs par rapport au poliovirus

La survie des indicateurs ayant été réalisée dans les mêmes conditions que celle du poliovirus (chapitre 2, partie 3), il est parfaitement possible de comparer les résultats. L'ensemble des paramètres de survies sont rappelés dans le Tableau 43 et les T90 sont rapportés dans la Figure 64. Par ailleurs, le génome du poliovirus suit une cinétique similaire à celle du poliovirus infectieux, mais nos résultats montrent également qu'il est plus résistant que ce dernier. C'est pourquoi le génome du poliovirus sera considéré d'une part comme un indicateur potentiel de contamination viral au même titre que les coliformes thermotolérants ou les coliphages somatiques et d'autre part, comme un représentant du risque viral qui sera alors comparé avec les indicateurs.

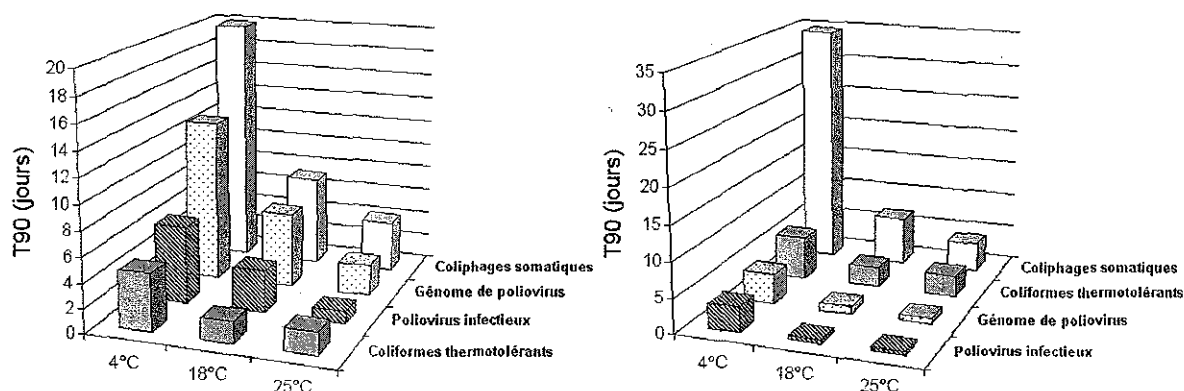
Tableau 43 : Valeur des T90 pour chaque condition testée

		Coliformes thermotolérants			Coliphages somatiques			Poliovirus infectieux			Génome de poliovirus		
		T90	r^2	n	T90	r^2	n	T90	r^2	n	T90	r^2	n
Hiver	4°C	4,6	0,99	9	(20)	0,96	9	6,2	0,97	8	13	0,96	8
	18°C	1,7	0,97	7	7,2	0,99	9	3,4	0,95	8	5,8	0,95	8
	25°C	1,8	0,92	7	4,0	0,95	8	1,0 *	0,98	8	2,5 *	0,99	8
Été	4°C	6,2	0,92	12	(26)	0,58	12	3,6	0,95	12	4,3	0,86	10
	18°C	2,8	0,97	8	6,8	0,97	10	0,6 *	0,98	8	1,1 *	0,98	10
	25°C	3,1	0,96	9	4,2	0,96	10	0,5 *	0,98	7	0,8 *	0,95	8

Tous les T90 ont été calculés à l'aide d'une régression linéaire sauf les valeurs suivies du signe * pour lesquelles une régression logarithmique a été utilisée.

Les valeurs entre parenthèses sont données à titre indicatif car il existe une grande imprécision sur ces mesures (chapitre 2, partie 3).

Figure 64 : Présentation des T90 calculés pour chaque paramètre microbiologique dans l'eau de rivière d'hiver (à gauche) et d'été (à droite) en fonction de la température

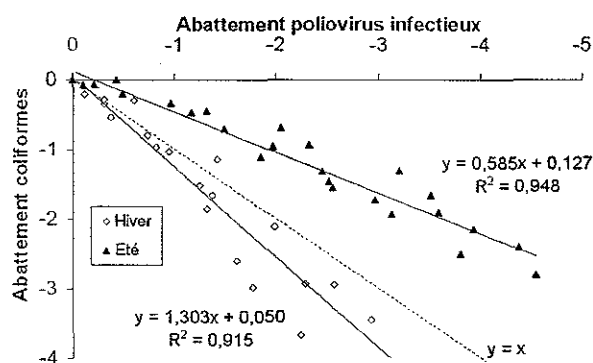


Les valeurs d'abattement pour le poliovirus infectieux d'une part et pour chacun des trois indicateurs d'autre part sont appariées dans le temps. Il est ainsi possible de comparer le devenir de chaque indicateur en fonction de celui du poliovirus infectieux pour chaque température (4, 18 et 25°C) et chaque composition d'eau (hiver et été). Des régressions linéaires sont utilisées pour modéliser chacune de ces évolutions.

4.1 Comparaison entre coliformes thermotolérants et poliovirus infectieux

Aucune différence entre l'abattement des coliformes thermotolérants en fonction de l'abattement en poliovirus infectieux n'a été constatée entre 4, 18 et 25°C pour une composition d'eau donnée (hiver ou été) (test de comparaison des pentes, $p > 0,05$). Cette constatation nous a permis de regrouper toutes les données en ne tenant compte que de la composition de l'eau (Figure 65). L'analyse de ces résultats montre une différence significative entre hiver et été (test de comparaison des pentes, $p < 0,05$) ce qui signifie que la composition de l'eau (hiver-été) agit différemment sur les coliformes thermotolérants et sur les poliovirus infectieux. Il est par ailleurs possible d'affirmer que la persistance des coliformes thermotolérants en eau d'hiver est inférieure à celle du poliovirus infectieux (pente > 1) sur une gamme de température comprise entre 4 et 25°C.

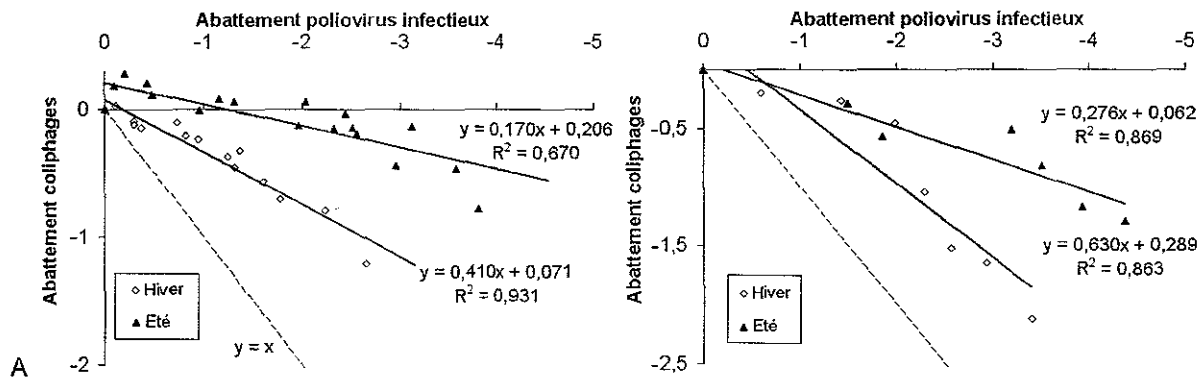
Figure 65 : Corrélations entre les abattements en coliformes thermotolérants et les abattements en poliovirus infectieux en fonction de la composition hiver – été de l'eau de rivière ($n_{\text{Hiver}}=22$ et $n_{\text{Eté}}=27$)



4.2 Comparaison entre coliphages somatiques et poliovirus infectieux

En ce qui concerne les coliphages somatiques, l'analyse des régressions linéaires aux trois températures fait apparaître une différence significative dans l'eau d'hiver entre 18 et 25°C (test de comparaison des pentes, $p < 0,05$). L'augmentation de la température accélère la disparition des coliphages somatiques par rapport à celle du poliovirus infectieux. Dans ces conditions, nous avons étudié l'impact de la composition de l'eau doit être étudié entre 4 et 18°C d'une part et à 25°C d'autre part (Figure 66). Les conclusions sont identiques dans les deux cas à savoir qu'il existe une différence significative selon la composition de l'eau (hiver-été) (test de comparaison des pentes, $p < 0,05$). Par ailleurs, quelles que soient les conditions expérimentales, la persistance des coliphages somatiques est toujours 2 à 5 fois supérieure à celle du poliovirus infectieux (pente < 1).

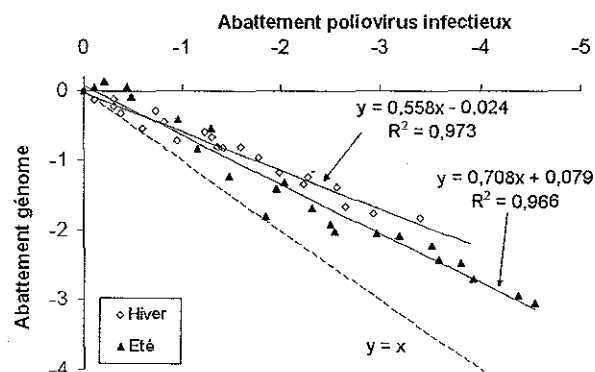
Figure 66 : Corrélations entre les abattements en coliphages somatiques et les abattements en poliovirus infectieux en fonction de la composition hiver – été de l'eau de rivière à 4 et 18°C (à gauche, n=35) et à 25°C (à droite, n=15)



4.3 Comparaison entre génome viral et poliovirus infectieux

En ce qui concerne la relation génome – virus infectieux, de la même manière que pour les coliformes thermotolérants, la température n'a pas d'effets significatifs sur les pentes des régressions linéaires (test de comparaison des pentes, $p > 0,05$). Par contre, une différence significative apparaît en fonction de la nature de l'eau (hiver – été) (test de comparaison des pentes, $p < 0,05$) (Figure 67) mais cette différence reste relativement faible (la pente est de 0,56 en hiver contre 0,71 en été). Par ailleurs, il apparaît que la persistance du génome est toujours supérieure à celle du poliovirus infectieux (pentes < 1).

Figure 67 : Corrélations entre les abattements en génome de poliovirus et les abattements en poliovirus infectieux en fonction de la composition hiver – été de l'eau de rivière ($n_{\text{Hiver}}=24$ et $n_{\text{été}}=25$)

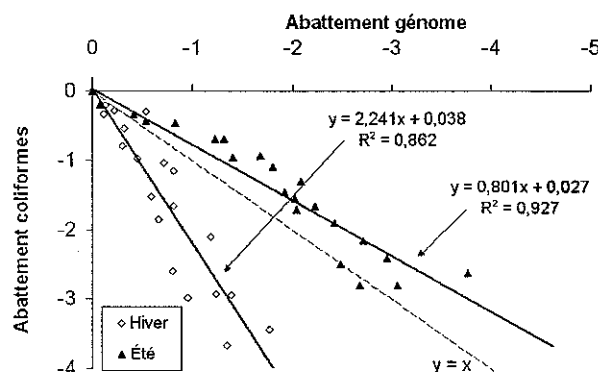


4.4 Comparaison entre coliformes thermotolérants et génome viral

Si l'on considère le génome viral non plus en tant qu'indicateur, mais en tant que matériel viral, il est intéressant de comparer son évolution en fonction de l'évolution des indicateurs représentés par les coliformes thermotolérants et les coliphages somatiques.

Ainsi, la relation entre les abattements en coliformes thermotolérants et les abattements en génome viral ne présente pas de différence significative en fonction de la température (comparaison des pentes, $p > 0,05$). Par contre, une différence significative est observée au niveau de la composition de l'eau entre hiver et été (comparaison des pentes, $p < 0,05$) (Figure 68). Il apparaît par ailleurs que la disparition des coliformes thermotolérants est environ deux fois plus rapide que la disparition du génome dans l'eau de rivière d'hiver.

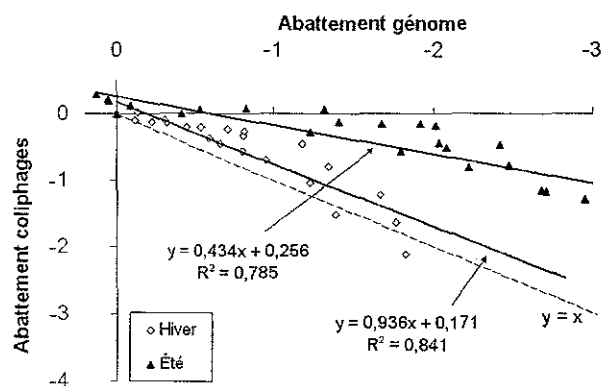
Figure 68 : Corrélations entre les abattements en génome de poliovirus et les abattements en coliformes thermotolérants en fonction de la composition hiver – été de l'eau de rivière ($n_{\text{Hiver}}=22$ et $n_{\text{été}}=27$)



4.5 Comparaison entre coliphages somatiques et génome viral

Comme précédemment, la relation entre les abattements en coliphages somatiques et les abattements en génome viral ne présente pas de différence significative en fonction de la température (comparaison des pentes, $p > 0,05$). Par contre, une différence significative est observée entre hiver et été (comparaison des pentes, $p < 0,05$) (Figure 69). Il apparaît que, contrairement aux coliformes thermotolérants, la disparition des coliphages somatiques est soit identique, soit moins rapide que celle du génome viral quelles que soient les conditions testées.

Figure 69 : Corrélations entre les abattements en génome de poliovirus et les abattements en coliphages somatiques en fonction de la composition hiver – été de l'eau de rivière ($n_{\text{Hiver}}=24$ et $n_{\text{été}}=26$)



Discussion

L'objectif était de comparer la valeur potentielle des coliformes thermotolérants et des coliphages somatiques en tant qu'indicateur de contamination virale dans l'eau de rivière en fonction essentiellement de deux paramètres : la température de l'eau et la composition de l'eau entre hiver et été. Ceci a nécessité l'utilisation d'un virus entérique comme modèle de virus pathogène, le poliovirus 1 qui n'est pas naturellement présent dans l'eau de la rivière Moselle. Il a donc été nécessaire d'ajouter une suspension de poliovirus infectieux dans les eaux de rivière.

Par contre, les coliformes thermotolérants et les coliphages somatiques étant naturellement présents dans l'eau de rivière, il n'a donc pas été nécessaire de procéder à une contamination artificielle concernant ces indicateurs. Ceci permet de tenir compte de l'hétérogénéité des populations bactériennes et phagiques dans l'eau de la rivière.

Les résultats montrent clairement que la température a un effet non seulement sur les particules infectieuses de poliovirus, mais également sur le génome ce qui a déjà été souligné par d'autres études (Gantzer et al., 1998b ; Enriquez et al., 1993). Par contre, grâce à la mesure quantitative du génome viral, il est pour la première fois possible d'apporter des arguments intéressants quant à la signification de la présence du génome viral dans notre eau de rivière. Nos résultats démontrent en effet que le génome viral se comporte toujours comme le virus infectieux (évolution des concentrations en fonction du temps soit linéaire, soit logarithmique) mais avec une cinétique de disparition toujours moins rapide que celle du virus infectieux.

Il est possible de déduire de ces résultats que :

- la disparition du virus infectieux pourrait être principalement due à des dommages au niveau de la capside et le génome ne serait dégradé que dans un deuxième temps ;
- la disparition du virus dans le milieu n'est pas due à des phénomènes d'agrégation dans la mesure où génome et virus infectieux suivent le même type d'évolution.

D'autres études avaient également montré que le génome viral pouvait persister beaucoup plus longtemps que le virus infectieux que ce soit dans une solution tampon (Gantzer et al., 1998d), après chloration (Sobsey et al., 1998) ou dans une eau de rivière (Enriquez et al., 1993).

Pour discuter du potentiel du génome en tant qu'indicateur de la contamination virale, il est nécessaire d'évaluer sa persistance par rapport à celle du virus infectieux. Nos résultats montrent que la persistance du génome est significativement plus importante dans l'eau de rivière que celle du poliovirus infectieux quelles que soient les conditions testées. De ce fait, le génome viral pourrait être considéré comme un indicateur potentiel de la présence de virus pathogènes dans l'eau de rivière.

Même si les mécanismes qui agissent respectivement sur le génome et sur la capside sont différents, nos résultats montrent que la diminution de concentration en génome viral dans l'eau de rivière est directement corrélée à la disparition du virus infectieux quelle que soit la température. En outre, cette corrélation est très peu affectée par la composition de l'eau entre hiver et été. Ceci est confirmé par le

fait que les modèles de régression (linéaire ou logarithmique) utilisés pour décrire le comportement respectif du génome et du virus infectieux sont toujours identiques pour une condition donnée. Ainsi, même si les causes de la disparition de ces deux entités ne sont pas identiques, il ne peut pas être exclu au regard de nos résultats expérimentaux, que le génome viral puisse jouer un rôle « d'index » (d'après la définition d'Armon et Kott, 1996) de la pollution virale dans l'eau de rivière.

D'un point de vue méthodologique, il est intéressant de noter que la RT-PCR quantitative utilisant la région conservée 5'-non codant des virus à ARN est déjà disponible pour les principaux virus entériques (Monpoeho *et al.*, 2000; Donaldson *et al.*, 2002). Par ailleurs, il devrait être possible d'adapter la PCR quantitative pour la recherche du génome de virus tels que *rotavirus*, HAV, *astrovirus* ou *adénovirus* en utilisant également des régions conservées. Concernant les Norwalk-like virus, il sera probablement plus difficile d'adapter une telle méthode dans la mesure où le génome de ces virus est très variable (Lopman *et al.*, 2002). Enfin, il serait intéressant de développer des protocoles de RT-PCR quantitative en « multiplex » capables de mettre en évidence dans l'environnement simultanément la plupart des virus pathogènes pour l'homme.

Toutefois, même si la quantification du génome viral pouvait apporter une contribution dans l'évaluation sanitaire de la qualité d'une eau, il se pose le problème du coût de l'analyse qui restera beaucoup plus important que celui nécessaire à la recherche des coliformes thermotolérants ou des coliphages somatiques.

Concernant les autres indicateurs, les coliformes thermotolérants apparaissent comme de très médiocres indicateurs du comportement du poliovirus infectieux. En effet, ils survivent moins bien que le poliovirus infectieux ou que son génome dans l'eau de rivière prélevée en hiver quelle que soit la température. Ceci est en accord avec des études antérieures qui avaient également constaté que les coliformes ne pouvaient pas être considérés comme de bons indicateurs de la présence de virus pathogènes (Keswick *et al.* 1984; Payment *et al.* 1985; Schwartzbrod *et al.* 1985; Havelaar 1993). Concernant les coliphages somatiques, leur disparition est moins rapide que celle du poliovirus infectieux ou de son génome dans toutes les conditions que nous avons étudiées. En fait, la survie des coliphages somatiques est jusqu'à 5 fois plus importante que celle du poliovirus infectieux dans l'eau de rivière. Une telle différence est particulièrement intéressante dans la mesure où d'autres virus entériques (virus de l'hépatite A, Norwalk-like virus, *rotavirus* ou *adénovirus* 40 et 41) sont capables de survivre davantage que le poliovirus (Gantzer *et al.* 1998b; Biziagos *et al.*, 1988; Keswick *et al.*, 1985; Sommer *et al.* 1989; Qin *et al.* 1996; Enriquez *et al.* 1995).

En conclusion, notre étude montre que les coliformes thermotolérants sous-estiment la contamination virale dans l'eau de rivière mais que par contre, la quantification des coliphages somatiques ou celle du génome viral pourrait être utilisée en tant qu'indicateur de la présence de virus infectieux. Nos résultats montrent également que dans l'eau de rivière, le génome viral peut être considéré soit comme un indicateur de contamination fécale spécifiquement viral qui présente la même écologie que le virus pathogène infectieux, soit comme une mesure de la pollution virale qui sur-estime légèrement le risque en terme de virus infectieux.

Partie 2

Virus pathogènes et indicateurs de contamination virale dans l'eau de rivière

Un indicateur de contamination virale doit par sa présence et sa concentration traduire un risque de présence de virus pathogène pour l'homme. Or plus de 140 sérotypes viraux sont susceptibles d'être présents dans le milieu hydrique. La présence de ces virus dans le milieu naturel dépend directement de leur écologie qui est propre à chaque type de virus. En fonction de ces données et parce que l'indicateur de contamination virale doit traduire un risque infectieux en tenant compte de l'ensemble des virus présents en permanence dans l'eau, il nous a semblé judicieux de choisir dans le cadre de notre étude, un ensemble de virus pathogènes susceptibles de circuler toute l'année au sein de la population. Notre choix s'est porté sur les entérovirus (détectable toute l'année dans les eaux usées brutes) et les Norwalk-like Virus du génogroupe 2 (GGII) (responsables d'épidémies hivernales). Le cas de l'eau de rivière servant de ressource d'eau potable nous a semblé particulièrement intéressant à étudier.

L'objectif est de déterminer entre coliformes thermotolérants et coliphages somatiques lesquels sont le plus à même de traduire le risque de présence de virus pathogène dans une eau de rivière. Pour cela nous avons recherché simultanément dans l'eau de la rivière Moselle d'une part ces deux indicateurs, et d'autre part, des virus entériques pathogènes (entérovirus infectieux et génome de NLV GGII).

L'estimation de la contamination virale est réalisée à partir d'un litre d'eau de la rivière Moselle :

- par la mise en évidence des entérovirus sur culture cellulaire (virus infectieux) et RT-PCR (génome viral) ;
- par la détection des NLV (GGII) par RT-PCR (génome viral).

Cependant, concernant la recherche du génome viral dans les eaux de rivière par RT-PCR-DEIA, nous avons été obligé de réaliser un travail méthodologique pour mettre au point et évaluer certaines étapes du protocole de détection. Aussi, avant de présenter les résultats, nous avons souhaité exposer la mise au point de notre protocole.

5 Étude méthodologique préliminaire

Les techniques de RT-PCR qualitative présentent deux inconvénients majeurs qui sont le risque de faux négatifs dus à la présence d'inhibiteurs dans l'échantillon et le risque de faux positifs dus à la contamination inter-échantillons.

Pour minimiser ces risques, il a été décidé d'utiliser :

- un système de RT-PCR plutôt qu'une double amplification de type RT nested-PCR ou RT semi nested-PCR qui présentent des risques de contamination élevés ;
- un étalon interne qui est systématiquement incorporé aux échantillons afin d'évaluer les éventuelles inhibitions

La révélation des produits amplifiés est réalisée par hybridation suivie d'une immuno-détection (DEIA), cette technique étant plus sensible que l'électrophorèse sur gel d'agarose.

Ainsi, le protocole global de mise en évidence du génome viral dans l'environnement que nous avons choisi est le suivant (cf. M&M) :

- 1- Concentration des échantillons d'eau de rivière sur membranes électropositives ;
- 2- Éluat de la membrane avec une solution tampon (extrait de viande-glycine, pH=9,5)
- 3- Ultrafiltration de l'éluat qui permet d'obtenir ce que nous appellerons le « concentrat » ;
- 4- Extraction de l'ARN viral (QIAamp Viral RNA) ;
- 5- Amplification du génome viral par RT-PCR ;
- 6- Mise en évidence du génome amplifié après hybridation avec des sondes spécifiques par immunodétection (DEIA).

En fonction de ce protocole, notre travail méthodologique a consisté dans un premier temps, à définir la concentration d'étalon interne à utiliser puis, dans un deuxième temps, à évaluer la présence d'inhibiteurs de la réaction d'amplification génique dans des échantillons d'eau de rivière traitées selon le protocole décrit ci-dessus, enfin, dans un troisième temps, à optimiser la réaction de façon à minimiser les inconvénients liés à la présence d'éventuels inhibiteurs.

5.1 Détermination de la concentration en étalon interne

Un étalon interne est ajouté aux échantillons afin de témoigner du bon déroulement de la RT-PCR. Cet étalon est constitué d'ARN codant pour l'ampicilline et possédant la partie complémentaire des amorces utilisés pour la recherche des entérovirus. Ainsi, l'étalon est transcrit puis amplifié dans les mêmes conditions que l'ARN viral. Sa mise en évidence est réalisée grâce à une sonde spécifique complémentaire d'une partie du gène de l'ampicilline.

La première étape a consisté à déterminer la concentration minimale en étalon qui permet d'obtenir 100 % de résultats positifs dans un milieu non inhibiteur (PBS). Pour ce faire, la solution stock d'étalon

est diluée dans de l'eau RNase free jusqu'à 10^{-8} . 20 μ L des dilutions 10^{-4} à 10^{-8} sont extraits avec le kit Qiamp viral RNA en présence de 150 μ L de PBS (représentant l'échantillon à analyser). L'étalon est ensuite amplifié et détecté par RT-PCR DEIA.

D'après les résultats donnés dans le Tableau 44, il apparaît que la dilution à 10^{-7} est optimale. En effet, elle permet d'évaluer l'efficacité de la RT-PCR avec une quantité minimale de génome.

Tableau 44 : Résultats de la recherche de la concentration optimale en étalon dans le PBS (n=3)

Dilutions	Étalon				
	-4	-5	-6	-7	-8
Résultats positifs	3/3	3/3	3/3	3/3	1/3

La même expérience est réalisée d'une part avec du PBS et d'autre part avec du tampon d'élution pour évaluer les éventuelles interférences dues à cette solution. Les résultats rassemblés dans le Tableau 45 représentent la valeur de D.O. obtenu après révélation par DEIA. La comparaison entre ces valeurs montre qu'il n'y a aucune interférence spécifiquement due au tampon d'élution. En conséquence, 20 μ L d'étalon à la dilution 10^{-7} seront incorporés systématiquement à chaque échantillon.

Tableau 45 : Résultats de la mise en évidence du génome étalon dans le PBS et le tampon d'élution par DEIA

Dilution de l'étalon	-6	-7
PBS	2,497	0,785
Tampon d'élution	3,140	0,873

5.2 Recherche d'inhibiteurs dans l'eau de rivière

La concentration en étalon étant déterminée, des essais à partir de concentrats d'eau de rivière ont été réalisés. L'étalon (dilution 10^{-7}) est ajouté à 150 μ L de concentrat d'eau de rivière avant l'étape d'extraction de l'ARN. Cette expérimentation a été réalisée 5 fois et l'étalon n'a jamais été détecté. Au vu de ces résultats il était clair que des inhibiteurs étaient présents dans les concentrats d'eau de rivière et que de ce fait, il était indispensable de les éliminer, ou de masquer leurs effets en optimisant le protocole.

5.3 Optimisation du protocole

Le protocole d'extraction-amplification a été optimisé à deux niveaux :

- l'extraction
- l'amplification

5.3.1 Modification de l'étape d'extraction

Nous avons essayé un deuxième kit d'extraction (RNeasy Plant Mini Kit) utilisant du β -mercaptoéthanol afin d'éliminer la présence éventuelle d'inhibiteurs de nature protéique. Les résultats présentés dans le Tableau 46 montrent qu'il n'y a aucune amélioration pour la mise en évidence de l'étalon interne avec ce nouveau protocole. Celui-ci a donc été abandonné.

Tableau 46 : Comparaison de l'efficacité de deux kits d'extraction

Kits d'extraction	Étalon (-7)	
	PBS	Eau de rivière
Sans β -mercaptoéthanol (QIAamp Viral RNA) (n=5)	(5/5)	(0/5)
Avec β -mercaptoéthanol (RNeasy Plant Mini Kit) (n=2)	(2/2)	(0/2)

5.3.2 Modification de l'étape d'amplification

- 1- Par ajout d'un produit masquant partiellement ou totalement les effets des inhibiteurs :

Afin de masquer la présence des inhibiteurs, 4 produits ont été ajoutés dans les mix de RT et de PCR. Le choix de ces produits ainsi que le choix des concentrations à utiliser a été réalisé à partir de données de la littérature (Tableau 47). Les résultats sont présentés dans le Tableau 48. Ils montrent que lorsque le T4gene32 est ajouté au mix de RT, il permet d'obtenir un signal à partir du concentrat d'eau de rivière et augmente le signal à partir du PBS. Concernant le mix de PCR, le glycérol semble donner les meilleurs résultats.

Tableau 47 : Produits masquant la présence d'inhibiteurs lors des réactions de RT-PCR

	Concentrations utilisées dans la littérature	Concentrations choisies (en fonction des données de la littérature)
Glycérol	5-10 % (Al-Soud et Rådström, 2000) 4-8 % (Jaykus <i>et al.</i> , 1996)	5 %
DMSO	3-5 % (Jaykus <i>et al.</i> , 1996)	5 %
T4gene32	0,14 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ (Chandler <i>et al.</i> , 1998) 0,1-0,15 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ (Kreader, 1996)	0,1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$
BSA	0,2-0,4 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ (Kreader, 1996) 0,002 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ (Beurret, 2001)	0,1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$

Tableau 48 : Résultats de la mise en évidence du génome étalon après RT-PCR et DEIA

	Valeur d'absorbance (densité optique)	
	PBS	Eau de rivière
RT + PCR	<i>0,150</i>	0,028
RT + (PCR avec glycérol)	1,150	0,036
RT + (PCR avec DMSO)	0,341	0,023
RT + (PCR avec T4gene32)	0,028	0,021
RT + (PCR avec BSA)	0,399	0,023
(RT avec glycérol) + PCR	0,035	0,024
(RT avec DMSO) + PCR	<i>0,108</i>	0,025
(RT avec T4gene32) + PCR	0,281	<i>0,161</i>
(RT avec BSA) + PCR	<i>0,150</i>	0,024

Limite de positivité de la méthode : 0,179

En **gras** : les échantillons positifs

En *italique* : les échantillons présentant un signal par rapport au non codant.

Suites à ces résultats, huit essais sur l'eau de rivière ont été réalisés avec le T4gene32 ajouté lors de la RT et du glycérol ajouté lors de la PCR. Ces ajouts ont permis la mise en évidence systématique du génome étalon à partir du PBS ainsi que des concentrats d'eau de rivière.

2- Utilisation de la Hotstart Taq polymérase

Une dernière étape d'optimisation a été réalisée en comparant la sensibilité de la Taq polymérase (Perkin Elmer) à celle de la Hot Start (Quiagen). D'un point de vue méthodologique, la Hot Start utilise des cycles d'amplification plus courts ce qui permet d'augmenter le nombre de cycles d'amplification sans augmenter la durée totale de la réaction.

La détection de l'étalon interne à différentes concentrations a été réalisée dans les concentrats d'eau de rivière. Le T4gene32 et le glycérol sont ajoutés respectivement lors de la RT et lors de la PCR. Les conditions expérimentales sont détaillées dans le Tableau 49. Les résultats (Tableau 50) montrent clairement une amélioration de la sensibilité avec l'utilisation de la Hot Start (Quiagen) puisque avec la Hotstart, nous détectons l'étalon interne.

Tableau 49 : Conditions expérimentales pour la comparaison de l'efficacité de deux enzymes

N°	Enzyme	Cycle d'amplification	Nombre de cycles	Durée
A	Taq polymérase (Perkin Elmer)	Long (60s/90s/60s)	32	1h52
B	Taq polymérase (Perkin Elmer)	Long (30s/45s/30s)	36	1h03
C	Hot Start (Quiagen)	Court (30s/30s/30s)	45	1h07

Tableau 50 : Résultats de la recherche de l'étalon interne en fonction de l'enzyme et du protocole utilisé – Les valeurs présentées correspondent à des densités optiques

		Concentration en étalon			Témoin négatif
		-6	-7	-8	
A	Taq polymérase (Perkin Elmer)	2,263	0,986	0,116	0,025
B	Taq polymérase (Perkin Elmer)	3,431	1,403	0,479	0,031
C	Hot Start (Quiagen)	3,452	3,455	3,303	0,024

En **gras** : les échantillons positifs

En conclusion, cette étude méthodologique nous a permis de définir un protocole adapté à la nature de l'échantillon. Il consiste à :

- Ajouter du T4gene32 (0,1 µg/µl) lors de la RT
- Ajouter du glycérol (5 %) lors de la PCR
- Utiliser de la polymérase Hot Start (Qiagen) avec 45 cycles d'amplification (30s/30s/30s)

6 Analyse *in situ*

Dix-huit campagnes de prélèvement d'eau de la rivière Moselle ont été réalisées entre décembre 2001 et mai 2002 au niveau de 5 sites de prélèvement : Méréville (site 1), Maron (site 2), Villey-le Sec (site 3), Pierre la Treiche (site 4) et Chaudenay (site 5). À partir de chacun des échantillons ($n_{\text{total}}=90$), les virus pathogènes (entérovirus et NLV GGII) et les indicateurs de contamination fécale (coliformes thermotolérants et coliphages somatiques) ont été recherchés.

6.1 Les virus pathogènes

Les entérovirus sont détectés d'une part par RT-PCR, et d'autre part par culture cellulaire dans tous les échantillons ($n=90$). Aucun effet cytopathogène n'a été constaté après 6 jours d'incubation. Les cultures ont ensuite été soumises à trois congélation-décongélation successives et 140 µL de chaque surnageant ont été utilisés pour la recherche de génome selon le même protocole que celui utilisé pour la recherche directe du génome dans les concentrats d'eau de rivière. Aucun résultat positif n'a été obtenu ce qui confirme l'absence d'entérovirus infectieux dans les échantillons.

Il est cependant nécessaire de rappeler que ces analyses ont été réalisées à partir d'échantillons de 1 litre ce qui représente un volume très faible en comparaison d'autres études pour lesquelles l'analyse a été réalisée à partir d'échantillons de 20 litres ou plus.

Par contre, la recherche de génome viral par RT-PCR direct sur les échantillons a permis la mise en évidence du génome d'entérovirus et de NLV (GGII). Ainsi 12 échantillons sont positifs pour les entérovirus et 25 pour les NLV (GGII) (Tableau 51). Notons que la détection des produits

d'amplification est réalisée avec une seule sonde pour les entérovirus (Ent) et 3 sondes pour les NLV GGII (SR47, SR61 et SR67). Parmi les sondes de NLV (GGII), SR47 s'est révélé la plus efficace en donnant l'ensemble des résultats positifs (n=24) alors que SR61 ne permet de confirmer la présence de génome de NLV (GGII) que dans 1 seul échantillon et SR67 n'a donné aucun résultat positif.

Tableau 51 : Nombre d'échantillons d'eau de rivière positifs en génome d'entérovirus et de NLV (GGII) en fonction des sondes utilisées pour leur mise en évidence par DEIA ($n_{\text{total}}=90$)

Génome viral	Entérovirus	NLV (GGII)			Entérovirus et NLV (GGII)
Sondes	Ent	SR47	SR61	SR67	
Nombre d'échantillons positifs (%)	12 (13 %)	24 (27 %)	1 (1 %)	0	34
Total	12	24			

6.2 Influence des paramètres physico-chimiques sur la présence de génome viral

Comme nous l'avons vu dans le chapitre 2 (partie 2), la température de l'eau et le débit sont des paramètres pouvant influencer le devenir des microorganismes dans l'eau de rivière. Aussi, nous avons évalué la présence de génome viral dans l'eau de rivière en fonction des conditions telles que nous les avons défini précédemment, à savoir :

- Favorables : température $< 10^{\circ}\text{C}$ et débit $> 70\text{m}^3/\text{s}$;
- Défavorables : température $> 16^{\circ}\text{C}$ et débit $< 40\text{m}^3/\text{s}$
- Intermédiaires : toutes les autres valeurs.

Le Tableau 52 présente pour chaque date de prélèvement les valeurs de température et de débit de la rivière Moselle ainsi que les conditions auxquelles elles correspondent.

Tableau 52 : Dates et conditions d'échantillonnage

Dates	Température ($^{\circ}\text{C}$)	Débit (m^3/s)	Conditions
5 décembre	8,3	65	Intermédiaire
11 décembre	8,4	98	Favorable
14 décembre	8,8	71	Favorable
4 janvier	6,1	97	Favorable
9 janvier	5,7	130	Favorable
17 janvier	1,7	48	Intermédiaire
12 juin	15,3	26	Intermédiaire
26 juin	21,7	22	Défavorable
26 juillet	22,6	26	Défavorable
1 août	23,5	18	Défavorable
3 août	23,1	15	Défavorable
28 août	23,5	8	Défavorable
11 septembre	14,3	33	Intermédiaire
16 mai	16,1	34	Défavorable
17 mai	17,7	32	Défavorable
23 mai	17,1	29	Défavorable
28 mai	15,5	30	Intermédiaire
30 mai	16,3	26	Défavorable

L'analyse des résultats obtenus à partir des 90 échantillons (Tableau 53) montrent que les virus entériques représentés dans cette étude par les entérovirus et les NLV (GGII) sont essentiellement présents pendant la période dite « favorable » puisque au cours de cette période, 80 % des échantillons contiennent au moins 1 type de virus entérique. A l'inverse, 22 % seulement des échantillons sont positifs pendant la période « défavorable ». Il faut noter que le fort pourcentage de positif obtenu en période favorable est principalement dû au NLV (GGII) dont l'épidémie survient en hiver, c'est-à-dire essentiellement pendant cette période.

Tableau 53 : Présence de génome viral dans l'eau de rivière en fonction des conditions favorable, intermédiaire et défavorable

Conditions	n	Nombre d'échantillons positifs (%)		
		Entérovirus	NLV (GGII)	Virus entériques (global)
Favorable	20	4 (20 %)	14 (70 %)	16* (80 %)
Intermédiaire	25	1 (4 %)	7 (28 %)	8 (32 %)
Défavorable	45	7 (15 %)	3 (7 %)	10 (22 %)
Total	90	12 (13 %)	24 (26 %)	34* (38 %)

* : deux échantillons sont positifs simultanément en entérovirus et NLV.

6.3 Influence des saisons sur la présence de génome viral dans l'eau de rivière

Si nous observons les résultats en fonction de la saison (Tableau 54) il apparaît que le génome viral est présent dans l'eau de rivière quel que soit la saison avec une prépondérance en hiver (77 % des cas) par rapport à l'été (27 %) ou au printemps (10 %). Ce nombre important d'échantillon positif en hiver peut s'expliquer par la prévalence saisonnière des NLV dont les pics épidémiques apparaissent principalement de novembre à mars. On peut noter que l'on obtient sensiblement le même pourcentage d'échantillons positifs en entérovirus en été et en hiver.

Tableau 54 : Nombre d'échantillons positifs en génome viral dans l'eau de rivière en fonction des saisons

Saisons	n	Nombre d'échantillons positifs (%)		
		Entérovirus	NLV (GGII)	Virus entériques (global)
Hiver	30	5 (17 %)	20 (67 %)	23* (77 %)
Printemps	30	0 (0 %)	3 (10 %)	3 (10 %)
Été	30	7 (23 %)	1 (3 %)	8 (27 %)

* : deux échantillons sont positifs simultanément en entérovirus et NLV.

6.4 Influence du site de prélèvement sur la présence de génome viral dans l'eau de rivière

Comme l'indiquent les résultats rassemblés dans le Tableau 55, la probabilité de rencontrer du génome viral d'entérovirus ou de NLV (GGII) varie de 28 à 44 % selon le site de prélèvement. Par contre, il peut être intéressant de noter que si les NLV (GGII) sont effectivement bien représentés au niveau de tous les sites de prélèvement, le nombre d'échantillons positifs en entérovirus semble diminuer au niveau des sites 4 et 5 (éloignés de la source de contamination fécale). S'il ne s'agit pas d'un artefact, cette observation peut s'expliquer soit par une persistance plus importante des NLV (GGII) dans l'environnement par rapport aux entérovirus, soit par des concentrations plus importantes permettant de les détecter plus longtemps.

Tableau 55 : Présence de génome viral dans l'eau de rivière en fonction du site de prélèvement

Sites	n	Entérovirus	NLV (GGII)	Echantillons positifs
1	18	4	4	8 (44 %)
2	18	4	5	7* (39 %)
3	18	2	5	7 (39 %)
4	18	1	6	7 (39 %)
5	18	1	4	5 (28 %)

* : deux échantillons sont positifs simultanément en entérovirus et NLV.

7 Étude de la relation entre concentration en indicateur et présence de génome viral

Si nous considérons la présence de génome viral en fonction de la concentration en indicateur (Tableau 56), il apparaît que la probabilité la plus importante de retrouver du génome viral (68 %) correspond aux valeurs de concentration en coliformes thermotolérants ou en coliphages somatiques les plus élevées (>1000 ufc/100mL). Cette probabilité a tendance à diminuer lorsque la concentration en coliphages somatiques diminue. Par contre, elle ne semble pas liée aux concentrations en coliformes thermotolérants pour lesquels 23 % d'échantillons sont positifs en génome viral lorsque les concentrations en coliformes sont inférieures à 100 ufc/100mL (n=32). En fait, il apparaît qu'un seul échantillon est positif en génome viral lorsque les concentrations en coliphages somatiques sont compris entre 0 et 100 ufp/100mL. Ainsi, il semblerait que la valeur de 100 coliphages dans un volume de 100 mL constitue un seuil en dessous duquel la probabilité de détecter du génome est faible, voire nulle pour les NLV (GGII).

Tableau 56 : Résultats positifs en génome viral en fonction des concentrations en coliformes thermotolérants et en coliphages somatiques

	Concentrations (ufc ou ufp/100mL)	n	Entérovirus	NLV GII	Nombre d'échantillons positifs (% total de +)
Coliformes	0 – 100	32	6	2	8 (23 %)
	> 100 – 1000	19	1	2	3 (9 %)
	> 1000	39	5	20	23* (68 %)
Coliphages	0 – 100	7	1	0	1 (3 %)
	> 100 – 1000	40	6	4	10 (29 %)
	> 1000	43	5	20	23* (68 %)

* Deux échantillons sont positifs simultanément en entérovirus et en NLV

En conclusion, nous avons détecté la présence de génome viral au niveau de tous les sites de prélèvement. Les entérovirus sont retrouvés en été et en hiver, mais plutôt à proximité des points de rejet de pollution fécale. Les NLV sont détectés majoritairement en hiver mais indépendamment du site de prélèvement. Par ailleurs, la probabilité de détecter du génome viral augmente lorsque les concentrations en coliphages somatiques augmentent. En comparaison, les coliformes thermotolérants ne donnent pas cette même information.

Ainsi, les coliphages somatiques semblent être des indicateurs plus pertinents que les coliformes thermotolérants pour évaluer la présence du génome viral (entérovirus et NLV GGII). Toutefois, le caractère infectieux des virus n'ayant pu être mis en évidence, il est impossible de conclure quant au risque sanitaire réel.

Discussion

Nous avons choisi de rechercher les coliformes thermotolérants, les coliphages somatiques, les entérovirus infectieux, le génome des entérovirus ainsi que le génome des NLV (GGII) dans l'eau de la rivière Moselle afin de tenter de déterminer si les coliformes thermotolérants ou les coliphages somatiques pouvaient servir d'indicateurs de contamination virale. Cette étude a été réalisée durant trois saisons : hiver, printemps et été. Le choix des pathogènes (entérovirus et NLV GGII) s'est fait en fonction de leur distribution saisonnière. Ainsi les entérovirus sont retrouvés toute l'année (Tani *et al.*, 1995 ; Hejkal *et al.*, 1984) alors que les NLV (GGII) ne sont présents qu'en période épidémique, généralement en hiver (Mount *et al.*, 2000).

Concernant la présence d'entérovirus pathogènes infectieux, cultivables sur cellules BGM, aucun échantillon n'a permis leur mise en évidence. Cette absence d'isolement des entérovirus infectieux est vraisemblablement due, d'une part à la faible concentration de particules virales infectieuses dans l'eau de rivière et d'autre part, au faible volume d'eau analysé (1 litre).

Si l'on se réfère aux données disponibles dans la bibliographiques concernant les concentrations en entérovirus infectieux dans les eaux de surface (Tableau 57), il apparaît qu'effectivement les concentrations sont faibles, mais qu'en plus, elles semblent diminuer depuis une dizaine d'années ce qui pourrait être expliqué par le développement des mesures d'hygiène, l'abandon du vaccin anti-poliomyélitique sous forme buvable ainsi que par l'amélioration et la généralisation des procédés d'épuration des eaux usées.

Tableau 57 : Concentrations en entérovirus infectieux dans différentes eaux de rivière

Nombre d'entérovirus infectieux par litre	Références
0,4	Block <i>et al.</i> (1979)
15,5	Bosch <i>et al.</i> (1986)
14	Schwartzbrod <i>et al.</i> (1987)
2 à 56	Walter <i>et al.</i> (1989)
0,5 à 59	Hugues <i>et al.</i> (1992)
19,8	Fewtrell <i>et al.</i> (1992)
0 à 190	Tani <i>et al.</i> (1995)
0 à 2,5	Lee <i>et al.</i> (1997)
0 à 0,5	Vilaginès <i>et al.</i> (1997)

Notons toutefois que Block *et al.* en 1979, date à laquelle le vaccin anti-poliomyélitique était encore utilisés, trouvaient dans cette même rivière Moselle des densités en entérovirus de 0 à 3,2 NPPUC/L.

Au vu de l'ensemble de ces données, il apparaît évident que la probabilité de détecter des entérovirus infectieux à partir d'un volume de seulement 1 litre d'eau de rivière était faible. La raison essentielle qui nous a amené à faire ce choix est directement liée au nombre important d'échantillons à analyser ($n_{\text{total}}=90$). Il faut tenir compte par ailleurs, qu'après chaque campagne de prélèvement, 5 échantillons devaient être concentrés simultanément (correspondants aux 5 sites de prélèvement). Pour des raisons pratiques, il nous était impossible de prélever puis de concentrer simultanément de grands volumes d'eau sans négliger certains échantillons (variation de température, temps d'attente...).

L'absence d'entérovirus infectieux dans nos échantillons nous interdit donc de discuter nos résultats en fonction du risque sanitaire viral lié à la présence de virus pathogènes infectieux. Toutefois, à la lumière des résultats présentés dans la première partie de ce chapitre qui montrent que dans l'eau de rivière le génome de poliovirus 1 se comporte de la même manière que le poliovirus infectieux, il peut être envisagé d'extrapoler et de considérer qu'il existe un risque sanitaire potentiel à partir de la seule mise en évidence du génome de virus pathogènes pour l'homme.

Ainsi, en considérant le génome viral, il faut noter que nos résultats confirment clairement la prévalence hivernale des NLV (GGII) dans l'eau de rivière ainsi que la présence hivernale et estivale des entérovirus. Étonnamment, aucun génome d'entérovirus n'a été détecté au printemps. Ceci pouvant être expliqué par le rapprochement des dates de prélèvement au printemps qui, pour des raisons pratiques, s'étalent du 16 au 30 mai, soit une période de 14 jours. Cette période restreinte ne pouvant être considérée comme représentative de l'ensemble de la saison.

Nos résultats ont par ailleurs révélé la présence de génome viral au niveau de tous les sites de prélèvement. Une différence apparaît néanmoins entre les entérovirus et les NLV (GGII). Les premiers sont détectés principalement au niveau de sites fortement contaminés (1 et 2) alors que les NLV (GGII) sont détectés de manière homogène au niveau de tous les sites (1 à 5). Cette différence peut être interprétée soit par une persistance plus importante des NLV (GGII) dans l'eau de rivière, soit par l'apport de quantité de NLV (GGII) beaucoup plus importante dans l'eau de la rivière.

Enfin, même si le génome viral est majoritairement détecté en conditions favorables (fort débit et faible température) principalement à cause des pics hivernaux de gastro-entérites à calicivirus qui sévissent pendant cette période, il est également mis en évidence durant les conditions défavorables et intermédiaires avec respectivement 22 et 32 % des échantillons positifs prélevés pendant ces périodes.

En conclusion, nos résultats montrent que les coliphages somatiques sont de meilleurs indicateurs de la présence de génome viral dans l'eau de rivière par rapport aux coliformes thermotolérants. Ainsi, lorsque les concentrations en coliphages somatiques augmentent, la probabilité de détecter du génome viral augmente ce qui n'est pas le cas avec les coliformes thermotolérants. Cette observation confirme les résultats expérimentaux (chapitre 3, partie 1) mettant en évidence que les coliformes thermotolérants sont capables de sous-estimer la contamination virale que ce soit en terme d'infectieux ou en terme de génome.

CONCLUSION

CONCLUSION

En conclusion, notre travail a d'abord montré que dans le cadre des traitements des eaux usées que la décantation primaire est très peu efficace pour éliminer la charge fécale microbienne avec des abattements compris entre 0,1 et 0,4 log. Le traitement secondaire par boues activées par contre diminue la charge fécale d'environ 1,5 log en moyenne. En ce qui concerne le traitement tertiaire, la déphosphatation a très peu d'intérêt puisqu'elle n'abat la charge fécale que de 0,3 à 0,6 log. Par contre, l'application sur les eaux usées épurées d'un traitement par radiation ultra-violet (UV) permet d'obtenir en fonction de la dose appliquée, des abattements très inégaux entre les différents microorganismes allant de 0,3 log pour les spores jusqu'à plus de 2 log pour les coliformes thermotolérants et les coliphages somatiques.

En terme d'efficacité de traitement, les indicateurs phagiques n'apportent pas d'informations supplémentaires par rapport aux indicateurs bactériens lorsqu'un traitement biologique classique est analysé qu'il soit ou non suivi d'un traitement tertiaire de déphosphatation. Par contre, lorsqu'un traitement de désinfection par UV est appliqué après le traitement biologique, des différences importantes au niveau de l'abattement apparaissent. Ainsi les spores sont les plus résistantes suivies des phages de *Bacteroides fragilis* et des bactériophages F-spécifiques. Les entérocoques présentent une résistance intermédiaire alors que les coliformes thermotolérants et les coliphages somatiques apparaissent comme les plus sensibles au traitement.

En ce qui concerne l'estimation du devenir de la charge fécale dans les eaux de rivière et les eaux souterraines, nous avons introduit la notion d'abattement de la contamination fécale initiale (ACFI). Ceci nous a permis d'évaluer la qualité d'une eau pour chaque indicateur et de constater que dans l'eau de rivière les coliformes thermotolérants sous-estiment le niveau de la charge fécale alors que les coliphages somatiques donnent une estimation plus importante de la pollution fécale dans l'espace et le temps. L'explication de ce phénomène a été en partie donnée par les résultats de l'étude de survie réalisée *in vitro* à partir d'échantillons d'eau de la rivière Moselle. Ces résultats démontrent en effet que les coliphages somatiques survivent significativement plus longtemps que les coliformes thermotolérants quelles que soient les conditions expérimentales (température et composition de l'eau).

Au cours de la dernière partie de notre travail consacrée à la contamination virale proprement dite, seuls les coliphages somatiques et les coliformes thermotolérants ont été pris en compte en tant qu'indicateur. Concernant les virus pathogènes, nous avons recherché les *entérovirus* par culture cellulaire et RT-PCR qualitative (*in situ*) ou quantitative (*in vitro*) ainsi que les *Norwalk-like virus* par RT-PCR qualitative (*in situ*). Nos résultats *in vitro* montrent que, dans l'eau de rivière, le génome viral peut être considéré soit comme un indicateur de contamination fécale spécifiquement virale qui présente la même écologie que les virus pathogènes infectieux, soit comme un indicateur de la pollution virale qui sur-estime légèrement le risque par rapport aux virus infectieux. L'étude *in situ* dans les eaux de la rivière Moselle, si elle n'a pas permis la mise en évidence d'entérovirus infectieux, a montré que lorsque les concentrations en coliphages somatiques augmentent, la probabilité de détecter du génome viral augmente également ce qui n'est pas le cas avec les coliformes thermotolérants. De plus, nous avons observé que la quasi-totalité des échantillons positifs en génome viral (33/34) est obtenue lorsque la concentration en coliphages somatiques est supérieure à 100 ufp/100mL. Nous proposons donc cette valeur en tant que seuil dans l'évaluation du risque viral dans les eaux de rivière.

Enfin, à l'issue de ce travail, des travaux nous paraissent nécessaires pour confirmer deux avancées qui nous semblent particulièrement intéressantes :

- La proposition d'une valeur seuil de 100 coliphages somatiques dans 100mL, valeur au-delà de laquelle un risque de présence de virus pathogènes existerait dans les eaux de rivière ;
- La corrélation apparente entre génome viral et particules infectieuses dans l'eau de rivière.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Références bibliographiques

- Abad F.X., Pintó R.M., Díez J.M. et A. Bosch (1994) Disinfection of human enteric viruses in water by copper and silver in combination with low levels of chlorine, *Appl Environ Microb*, 60 : 2377-2383.
- Abad F.X., Pintó R.M. et A. Bosch (1998) Flow cytometry detection of infectious *Rotaviruses* in environmental and clinical samples, *Appl Environ Microb*, 64 (7) : 2392-2396.
- Abad F.X., Pintó R.M., Villena C., Gajardo R. et A. Bosch (1997) *Astrovirus* survival in drinking water, *Appl Environ Microb*, 63 (8) : 3119-3122.
- Abbaszadegan M., Hasan M.N., Gerba C.P., Roessler P.F., Wilson B.R., Kuennen R. et E. Van Dellen (1997) The disinfection efficacy of a point-of-use water treatment system against bacterial, viral and protozoan waterborne pathogens, *Water Res*, 31 (3) : 574-582.
- Abbaszadegan M., Huber M.S., Gerba C.P., et I.L. Pepper (1993) Detection of *Enteroviruses* in groundwater with the polymerase chain reaction, *Appl Environ Microb*, 59 : 1318-1324.
- Abbaszadegan M., Stewart P. et M. LeChevallier (1999) A strategy for detection of viruses in groundwater by PCR, *Appl Environ Microb*, 65 (2) : 444-449.
- Ackermann H-W (2000) Bacteriophages in Encyclopedia of Microbiology, Volume 1, Second Edition, San Diego, Academic press.
- Ackermann H-W (2001) Le matin des bactériophages, *Virology*, 5 : 35-43.
- Adrian T. Wigand R. et J. Richter (1987) Gastroenteritis in infants, associated with a genome type of *Adenovirus* 31 and with combined *Rotavirus* and *Adenovirus* 31 infection, *Eur. J. Pediatr.*, 146 (1) : 38-40.
- Agbalika F., Hartemann P. et J.M. Foliguet (1984) Trypsin-treated MA-104 : a sensitive cell line for isolating enteric viruses from environmental samples, *Appl Environ Microb*, 47 : 378-380.
- Al-Soud W.A. et P. Rådström (1998) Capacity of Nine Thermostable DNA Polymerases To Mediate DNA Amplification in the Presence of PCR-Inhibiting Samples, *Appl Environ Microb*, 64 : 3748-3753.
- Al-Soud W.A. et P. Rådström (2000) Effects of Amplification Facilitators on Diagnostic PCR in the Presence of Blood, Feces, and Meat, *J Clin Microbiol*, 38 : 4463-4470.
- Amvrosieva T.V., Titov L.P., Mulders M., Hovi T., Dyakonova O.V., Votyakov V.I., Kvacheva Z.B., Eremin V.F. et Sharko R.M. (2001) Viral water contamination as the cause of aseptic meningitis outbreak in Belarus, *Central Eur J Public Health*, 9 (3) : 154-157.
- An Y.J., Kampbell D.H. et G.P. Breidenbach (2002) *Escherichia coli* and total coliforms in water and sediments at lake marinas, *Environ Pollut*, 120 (3) : 771-778.
- Anonyme (2000) Outbreak of poliomyelitis, Cape Verde, 2000, *MMWR Morbidity and Mortality Weekly Report*, 49 (47) : 1070.
- Anonyme (2001) Progress Toward Global Poliomyelitis Eradication, 2000 *MMWR. Morbidity and Mortality Weekly Report*, 50 (16) : 320-322.
- Appleton H. (2000) Control of food-borne viruses, *Brit Med Bull*, 56 (1) : 172-183.
- Appleton H. et P.G. Higgins (1975) Letter: Viruses and gastroenteritis in infants, *Lancet*, 1 (7919) : 1297.
- Arankalle V.A., Tsarev S.A. et M.S. Chadla (1995) Age-specific prevalence of antibodies to hepatitis A and E viruses in Pune, India, 1982 1992, *J Infect Dis*, 171 : 447-50.

- Araujo R., Muniesa M., Mendez J., Puig A., Queralt N., Lucena F. et J. Jofre (2001) Optimisation and standardisation of a method for detecting and enumerating bacteriophages infecting *Bacteroides fragilis*, J Virol Methods, 93 : 127-136.
- Armon R. et Y. Kott (1996) bacteriophage as indicators of pollution, Crit Rev Env Sci Tec, 26: 299-335
- Arya S.C. (2001) Outbreak of poliomyelitis in Angola, J Infect Dis, 183 (3) : 517-518.
- Atmar R.L. et M.K. Estes (2001) Diagnosis of noncultivable gastroenteritis viruses, the human *Caliciviruses*, Clin Microbiol Rev, 14 (1) : 15-37.
- Atmar R.L., Neill F.H., Romalde J.L., Le Guyader F., Woodley C.M., Metcalf T.G. et M.K. Estes (1995) Detection of *Norwalk virus* and hepatitis A virus in shellfish tissues with the PCR., Appl Environ Microb, 61 : 3014-3018.
- Auer M.T. et S.L. Niehaus (1993) modeling fecal coliform bacteria – Field and laboratory determination of loss kinetics, Water Res, 27 (4) : 693-701.
- Aulicino F.A., Mastrantonio A., Orsini P., Bellucci C., Muscillo M. et G. Larosa (1996) Enteric viruses in a wastewater treatment plant in Rome, Water Air Soil Poll, 91 : 327-334.
- Aulicino F.A., Patti A.M., My M., Gabrieli R., De Filippis P. et P. Orsini (1991) Viruses in marine waters, L'Igiene Moderna, 96 : 583-592.
- Baggi F., Demarta A. et R. Peduzzi (2001) Persistence of viral pathogens and bacteriophages during sewage treatment: lack of correlation with indicator bacteria, Res Microbiol, 152 : 743-751.
- Bajolet O. et C. Chippaux-Hyppolite (2001) Les *Rotavirus* et autres virus de diarrhées, bull soc path exo, 91 (5) : 432-437.
- Barcina I., González J.M., Iriberry J. et L. Egea (1989) Effect of visible light on progressive dormancy of *Escherichia coli* cells during the survival process in natural fresh water, Appl Environ Microb, 55 : 246-251.
- Barcina I., González J.M., Iriberry J. et L. Egea (1990) Survival strategy of *Escherichia coli* and *Bacteroides fragilis* in illuminated fresh and marine systems, J Appl Bacteriol, 68 (2) : 189-198.
- Barcina I., Lebaron P. et J. Vives-Rego (1997) Survival of allochthonous bacteria in aquatic systems: a biological approach, FEMS Microbiol Ecol, 23 (1) : 1-9.
- Barillier A. et J. Garnier (1993) Influence of temperature and substrate concentration on bacterial growth yield in Seine River water batch cultures, Appl Environ Microb, 59 (5) : 1678-1682.
- Baron J. (1995) désinfection par UV des *Poliovirus* et des bactériophages FRNA spécifiques, Agence de l'eau Seine-Normandie, AESN n°940624, 27p.
- Baron J. (1997) désinfection par UV des eaux résiduaires urbaines, Agence de l'eau Seine-Normandie, AESN n°960637, 27p.
- Baron J., Corre S., Denis P., Dufaut J.C., Patris T. et J.P. Prigent (1994) Désinfection par ultra-violets des effluents issus d'une station d'épuration : étude pilote dans la région brestoise, TSM, 5 : 263-267.
- Battigelli D.A., Sobsey M.D. et D.C. Lobe (1993) The inactivation of hepatitis A virus and other model viruses by U.V. irradiation, Water Sci Technol, 27 : 339-342.
- Baylet R., Sinégre F., Sauze F. et M. Gervais (1980) Lagunage et virologie des eaux usées : évolution de la charge en coliphages, Tech. Eau Assainissement, 378 : 37-41.
- Beards G.M., Desselberger U. et T.H. Flewett (1989) Temporal and geographical distributions of human *Rotavirus* serotypes (1983 to 1988), J Clin Microbiol., 27 : 2827-2833.
- Beaudeau P. et L. Bertin (1999) Etude *in situ* sur la pertinence des nouveaux indicateurs pour le classement de la qualité des eaux de baignade, Rapport de l'agence de l'eau Seine-Normandie, 58p.

Beaudeau P., Tousset N., Bruchon F., Lefèvre A. et H.D. Taylor (2001) *In situ* measurement and statistical modelling of *Escherichia coli* decay in small rivers, *Water Res*, 35 (13) : 3168-3178.

Beaudeau P., Tousset N., Lefèvre A. et L. Bertin (1998) Disparition des *Escherichia coli* dans les rivières normandes, Rapport de l'agence de l'eau Seine-Normandie, 92p.

Beaulieux F., See D.M., Leparc-Goffart I., Aymard M. et B. Lina (1996) Use of magnetic beads versus guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform RNA extraction followed by polymerase chain reaction for rapid, sensitive detection of *Enterovirus* RNA, *Res Virology*, 148 : 11-15.

Bell R.G. (1976) The limitation of the ratio of fecal coliforms to total coliphage as a water pollution index, *Water Res*, 10 : 745-748.

Belliot G., Laveran H. et S.S. Monroe (1997) Outbreak of gastroenteritis in military recruits associated with serotype 3 *Astrovirus* infection. *J Med Virol*, 51 : 101-106.

Ben-Dan T.B., Shteinman B., Kamenir Y., Itzhak O. et A. Hochman (2001) Hydrodynamical effects on spatial distribution of enteric bacteria in the Jordan River-Lake Kinneret contact zone, *Water Res*, 35 : 311-314.

Benyahya M., Bohatier J., Laveran H., Senaud J. et M. Ettayebi (1998) Comparison of elimination of bacteriophages MS2 and variant phiX-174 during sewage treatment by natural lagooning or activated sludges: A study on laboratory-scale pilot plants, *Environ Technol*, 19 : 513-519.

Benyahya M., Bohatier J., Laveran H., Senaud J. et M. Ettayebi (1997) Interaction between the ciliated protozoan *Tetrahymena pyriformis* and the semian *Rotavirus* SA-11, *Eur J Protistol*, 33 : 211-213.

Berger B., Hoch B., Kavka G. et G.J. Herndl (1996) Bacterial colonization of suspended solids in the River Danube, *Aquat Microb Ecol (AME)*, 10 (1) : 37-44.

Bergh O., Børsheim K.Y., Bratbak G. et M. Heldal (1989) High abundance of viruses found in aquatic environments, *Nature*, 340 (6233) : 467-468.

Bettarel Y., Sime-Ngando T., Amblard C. et H. Laveran (2000) A comparison of methods for counting viruses in aquatic systems, *Appl Environ Microb*, 66 : 2283-2289.

Beuret C. (2003) A simple method for isolation of enteric viruses (noroviruses and *Enteroviruses*) in water, *J Virol Methods*, 107 (1) : 1-8.

Beuret C., Kohler D. et T. Lüthi (2000) Norwalk-like Virus Sequences Detected by Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction in Mineral Waters Imported into or Bottled in Switzerland, *J Food Protect*, 63 (11) : 1576-1582.

Beuret C., Kohler D., Baumgartner A. et T.M. Lüthi (2002) Norwalk-like virus sequences in mineral waters: one-year monitoring of three brands, *Appl Environ Microb*, 68 (4) : 1925-1931.

Bidawid S., Farber J.M. et S.A. Sattar (2000) Rapid concentration and detection of hepatitis A virus from lettuce and strawberries, *J Virol Methods*, 88 (2) : 175-185.

Bile K., Isse A., Mohamud O., Allebeck P., Nilsson L., Norder H., Mushahwar I.K. et L.O. Magnus (1994) Contrasting roles of rivers and wells as sources of drinking water on attack and fatality rates in a hepatitis E epidemic in Somalia, *Am J Trop Med Hyg*, 51 : 466-474.

Bishop R.F., Davidson G.P. Holmes I.H. , Ruck B.J. (1973) Virus particles in epithelial cells of duodenal mucosa from children with acute non-bacterial gastroenteritis, *Lancet*, 2 : 1281-1283.

Bitton G., Butner J., Chou Y.J., Farrah S.R. et R.H. Ruskin (1983) Survival of pathogenic and indicator organisms in ground water, *Ground Water*, 21 : 405-410.

Biziagos E.J., Passagot J.M., Crance et R. Deloince (1988) Long-term survival of hepatitis A virus and *Poliovirus* type 1 in mineral water, *Appl Environ Microb*, 54 : 2705-2710.

- Blacklow N.R. et H.B. Greenberg (1991) Viral gastroenteritis, *New Engl J Med*, 325 : 252-264.
- Block J.C., Joret J.C., Chauvin A. et D. Stoerckel (1979) Étude virologique des eaux de surface dans le bassin de la haute Moselle, Rapport d'étude financé par le Bassin Rhin-Meuse, 50 p.
- Boher Sylvie (1991) Analyse virologique des huîtres et étude des cinétiques d'accumulation et de décontamination virale, Thèse université de Nancy I, 197 p.
- Bon F., Fascia P., Dauvergne M., Tenenbaum D., Planson H., Petion A.M., Pothier P. et E. Kohli (1999) Prevalence of group A *Rotavirus*, human *Calicivirus*, *Astrovirus*, and *Adenovirus* type 40 and 41 infections among children with acute gastroenteritis in Dijon, France, *J Clin Microbiol*, 37 : 3055-3058.
- Bon F., Fromantin C., Aho S., Pothier P. et E. Kohli (2000) G and P genotyping of *Rotavirus* strains circulating in France over a three-year period : detection of G9 and P[6] strains at low frequencies, *J Clin Microbiol*, 38 : 1681-1683.
- Bonnefont J.L., Martin Y.P. et B. Guennet (1990) Etude expérimentale de la décroissance des bactéries fécales en milieu marin - quantification, facteurs impliqués, *Water Res*, 24 : 267-273.
- Boom R., Sol J.A., Salimans M.M., Jansen L., Wertheim-Van Dillen P.M. et J. Van Der Norrdaa (1990) Rapid and simple method for purification of nucleic acids, *J Clin Microbiol*, 28 : 495-503.
- Borrego J.J., Morinigo M.A., De Vicente A., Cornax R. et P. Romero (1987) Coliphages as an indicator of faecal pollution in water. Its relationship with indicator and pathogenic microorganisms, *Water Res*, 21 : 1473-1480.
- Bos R., van der Mei H.C. et H.J. Busscher (1999) Physico-chemistry of initial microbial adhesive interactions – its mechanisms and methods for study, *FEMS Microbiol Rev*, 23 (2) : 179-229.
- Bos R., van der Mei H.C., Meinders J.M. et H.J. Busscher (1984) A quantitative method to study co-adhesion of microorganisms in a parallel plate flow chamber: basic principles of the analysis, *J Microbiol Meth*, 20 : 289-305.
- Bosch A. (1998) Human enteric viruses in the water environment: a minireview, *International Microbiology: The Official Journal of the Spanish Society for Microbiology*, 1 (3) : 191-196.
- Bosch A., Lucena F., Girones R. et J. Jofre (1986) Survey of viral pollution in Besos river, *J Water Poll Control Fed*, 58 : 87-91.
- Bosch A., Pinto R.M., Blanch A.R. et J. Jofre (1988) Detection of human *Rotavirus* in sewage through two concentrations procedures, *Water Res*, 22 : 343-348.
- Botero L., Montiel M. et L. Porto (1992) Recovery of *Enteroviruses* from water and sediment of lake Maracaibo, Venezuela, *J Environ Sci Health*, 27 : 2213-2226.
- Bower W.A., Nainan O.V., Han X. et H.S. Margolis (2000) Duration of viremia in hepatitis A virus infection, *J Infect Dis*, 182 (1) : 12-17.
- Brisou J.F. et B. Makhoulf (1982) Enzymatic release of sedimentary bacteria in the presence of antibiotics, *Comptes Rendus Des Seances de l'Academie Des Sciences. Serie III, Sciences de la Vie*, 295 : 679-682.
- Brown C.M., Cann J.W., Simons G., Fankhauser R.L., Thomas W., Parashar U.D. et M.J. Lewis (2001) Outbreak of *Norwalk virus* in a Caribbean island resort: application of molecular diagnostics to ascertain the vehicle of infection, *Epidemiol Infect*, 126 (3) : 425-432.
- Brussaard C.P. Marie D. et G. Bratbak (2000) Flow cytometric detection of viruses, *J Virol Methods*, 85 (1-2) : 175-182.
- Burkhardt W., Blackstone G.M., Skilling D. et A.W. Smith (2002) Applied technique for increasing *Calicivirus* detection in shellfish extracts, *J Appl Microbiol*, 93 (2) : 235-240.
- Caillou S., Castagnaro N. et M. Naval (1998) Sewage sludges: application of a technique for recovering *Enterovirus*, *Revista Argentina de Microbiologia*, 30 (2) : 96-99.

Calci K.R., Burkhardt W., Watkins W.D. et S.R. Rippey (1998) Occurrence of male-specific bacteriophage in feral and domestic animal wastes, human feces, and human-associated wastewaters, *Appl Environ Microb*, 64 : 5027-5029.

Caldwell G.G., Lindsey N.J., Wulff H., Donnelly D.D. et F.N. Bohl (1974) Epidemic of *Adenovirus* type 7 acute conjunctivitis in swimmers, *Am J Epidemiol*, 99 : 230-234.

Callahan K.M., Taylor D.J. et M.D. Sobsey (1995) Comparative survival of HAV, *Poliovirus* and indicator viruses in geographically diverse seawaters, *Water Sci Technol*, 31 : 189-193.

Carducci A., Cantiani L., Moscatelli R., Casini B., Rovini E., Mazzoni F., Giuntini A. et M. Verani (2002) Interference between *Enterovirus* and *Reovirus* as a limiting factor in environmental virus detection, *Lett Appl Microbiol*, 34 (2) : 110-113.

Castignolles N., Petit F., Mendel I., Simon L., Cattolico L. et C. Buffet-Janvresse (1998) Detection of *Adenovirus* in the waters of the Seine River estuary by nested-PCR, *Mol Cell Probe*, 12 (3) : 175-180.

Chambon M., Archimbaud C., Bailly J.L., Henquell C., Regagnon C., Charbonné F. et H. Peigue-Lafeuille (2001) Circulation of *Enteroviruses* and persistence of meningitis cases in the winter of 1999-2000, *J Med Virol*, 65 (2) : 340-347.

Chandler D.P., Wagon C.A. et H. Bolton Jr (1998) Reverse transcriptase (RT) inhibition of PCR at low concentrations of template and its implications for quantitative RT-PCR, *Appl Environ Microb*, 64 : 669-677

Chapron C D., Ballester N.A., Fontaine J.H., Frades C.N. et A.B. Margolin (2000) Detection of *Astroviruses*, *Enteroviruses*, and *Adenovirus* types 40 and 41 in surface waters collected and evaluated by the information collection rule and an integrated cell culture-nested PCR procedure, *Appl Environ Microb*, 66 (6) : 2520-2525.

Chiba S., Nakata S., Numata-Kinoshita K. et S. Honma (2000) *Sapporo virus*: history and recent findings, *J Infect Dis*, 181 (Suppl 2) : 303-308.

Cho H.B., Lee S.H., Cho J.C. et S.J. Kim (2000) Detection of *Adenoviruses* and *Enteroviruses* in tap water and river water by reverse transcription multiplex PCR, *Can J Microbiol*, 46 (5) : 417-424.

Christensen P.B., Engle R.E., Jacobsen S.E.H., Krarup H.B., Georgsen J. et R.H. Purcell (2002) High prevalence of hepatitis E antibodies among Danish prisoners and drug users, *J Med Virol*, 66 (1) : 49-55.

Chung H., Jaykus L.A. et M.D. Sobsey (1996) Detection of human enteric viruses in oysters by in vivo and in vitro amplification of nucleic acids, *Appl Environ Microb*, 62 (10) : 3772-3778.

Chung H., Jaykus L.A., Lovelace G. et M.D. Sobsey (1998) bacteriophages and bacteria as indicators of enteric viruses in oysters and their harvest waters, *Water Sci Technol*, 38 : 37-44.

Clarke K.J. (1998) Virus particle production in lysogenic bacteria exposed to protozoan grazing, *FEMS Microbiol Lett*, 166 (2) : 177-180.

Clayson E.T., Myint K.S.A. et R. Snitbhan (1995) Viremia, fecal shedding and IgM and IgG responses in patients with hepatitis E virus. *J Infect Dis*, 172 : 927-33.

Collivignarelli C., Bertanza G. et R. Pedrazzani (2000) A comparison among different wastewater disinfection systems : experimental results, *Environ Technol*, 21 : 1-16.

Cooper M.A., Dultsev F.N., Minson T., Ostanin V.P., Abell C. et D. Klenerman (2001) Direct and sensitive detection of a human virus by rupture event scanning, *Nature Biotechnology*, 19 (9) : 833-837.

Cornax R., M.A. Morinigo, M.C. Balebona, D. Castro et J.J. Borrego (1991) significance of several bacteriophage groups as indicators of sewage pollution in marine water, *Water Res*, 25 : 673-678.

Cornax R., Morinigo M.A., Paez I.G., Muñoz M.A. et J.J. Borrego (1990) Application of direct plaque assay for detection and enumeration of bacteriophages of *Bacteroides fragilis* from contaminated-water samples, *Appl Environ Microb*, 56 : 3170-3173.

- Corwin A.L., Khiem H.B., Clayson E.T., Pham K.S., Vo T.T., Vu T.Y., Cao T.T., Vaughn D. et J.R. Merven (1996) A waterborne outbreak of hepatitis E virus transmission in southwestern Vietnam, *Am J Trop Med Hyg*, 54 (6) : 559-562.
- Crance J.M., Deloince R., Lechevallier C., Crevat D., Laveran H. et R. Fontanges (1983) Release of hepatitis A virus into the culture medium, during its replication in PLC/PRF/5 cells, *Comptes Rendus Des Seances de l'Academie Des Sciences. Serie III, Sciences de la Vie*, 297 (3) : 111-114.
- Cromeans T.L., Nainan O.V. et Margolis S.H. (1997) Detection of hepatitis A virus in oyster meat. *Appl Env Microbiol*, 63, 2460-2463
- Cubitt W.D., Pead P.J. et A.A. Saeed (1981) A new serotype of *Calicivirus* associated with an outbreak of gastroenteritis in a residential home for the elderly, *J Clin Pathol*, 34 (8) : 924-926.
- D'Angelo L.J., Hierholzer J.C., Keenlyside R.A., Anderson L.J. et W.J. Martone (1979) Pharyngo-conjunctival fever caused by *Adenovirus* type 4: Recovery of virus from pool water, *J Infect Dis*, 140 : 42-47.
- Dahling D.R., Saffermann R.S. et B.A. Wright (1989) Isolation of *Enterovirus* and *Reovirus* from sewage and treated effluents in selected Puerto Rican communities, *Appl Environ Microb*, 55 : 503-506.
- Dan N. (2003) The effect of charge regulation on cell adhesion to substrates: salt-induced repulsion, *Colloid Surface B*, 27 (1) : 41-47.
- Davies C.M., Long J.A., Donald M. et N.J. Ashbolt (1995) Survival of fecal microorganisms in marine and freshwater sediments, *Appl Environ Microb*, 61 (5) : 1888-1896.
- De Jong J.C., Wermenbol A.G., Verweij-Uijterwaal M.W., Slaterus K.W., Wertheim-Van Dillen P., Van Doornum G.J., Khoo S.H. et J.C. Hierholzer (1999) *Adenoviruses* from human immunodeficiency virus-infected individuals, including two strains that represent new candidate serotypes Ad50 and Ad51 of species B1 and D, respectively, *J Clin Microbiol*, 37 (12) : 3940-3945.
- De Leon R., Matsui S.M., Baric R.S., Herrmann J.E., Blacklow N.R., Greenberg H.B. et M.D. Sobsey (1992) Detection of *Norwalk virus* in stool specimens by reverse transcriptase-polymerase chain reaction and nonradioactive oligoprobes, *J Clin Microbiol*, 30 : 3151-3157.
- De Wit M., Koopmans M., Kortbeek L., van Leeuwen N., Bartelds A. et Y. van Duynhoven (2001a) Gastroenteritis in sentinel general practices, the Netherlands, *Emerg Infect Dis*, 5 : 607-625.
- De Wit M.A., Koopmans M.P., Kortbeek L.M., Wannet W.J., Vinjé J., van Leusden F., Bartelds A.I. et Y.T. van Duynhoven (2001b) Sensor, a population-based cohort study on gastroenteritis in the Netherlands: incidence and etiology, *Am J Epidemiol*, 154 (7) : 666-674.
- Debartolomeis J. et V.J. Cabelli (1991) Evaluation of an *Escherichia coli* host strain for enumeration of F male-specific bacteriophages, *Appl Environ Microb*, 57 :1301-1305.
- Decho A.W. (2000) Microbial biofilms in intertidal systems: an overview, *Continental Shelf Research*, 20 (10-11) : 1257-1273.
- Deetz T.R., Smith E.M., Goyal S.M., Gerba C.P., Vollet J.J., Tsai L., Dupont H.L. et B.H. Keswick (1984) Occurrence of Rota and *Enteroviruses* in drinking and environmental waters in a developing nation, *Water Res*, 18 : 567-572.
- Deng M.I., Day S.P. et D.O. Cliver (1994) Detection of hepatitis A virus in environmental samples by antigen-capture PCR., *Appl Environ Microb*, 60 : 1927-1933.
- Desenclos J.C. (1996) Epidemiology of toxic and infectious risk related to shellfish consumption, *Rev Epidemiol Santé*, 44 : 437-454.
- Deshayes F., Schmitt M., Ledrans M., Gourier-Frery C. et H. De Valk (2001) Pollution du réseau d'eau potable a Strasbourg et survenue concomitante de gastro-enterites – BEH 02/2001

- Divizia M., De Filippis P., Di Napoli A., Venuti A., Peres B. et A. Pana A (1989) Isolation of wild type hepatitis A virus from the environment, *Water Res*, 23 : 1155-1160.
- Divizia M., Ruscio V., Degener A.M. et A. Pana (1998) Hepatitis A virus detection in wastewater by PCR and hybridization, *Microbiologica*, 21 : 161-167.
- Donaldson K.A., Griffin D.W. et J.H. Paul (2002) Detection, quantitation and identification of *Enteroviruses* from surface waters and sponge tissue from the Florida Keys using real-time RT-PCR, *Water Res*, 36 : 2505-2514.
- Donnison A.M. et C.M. Ross (1995) Somatic and F-specific coliphages in New Zealand waste treatment lagoons, *Water Res*, 29 : 1105-1110.
- Doyle J.D., Tunnicliff B., Kramer R., Kuehl R. et S.K. Brickler (1992) Instability of fecal coliform populations in waters and bottom sediments at recreational beaches in Arizona, *Water Res*, 26 : 979-988.
- Dubois E. (1995) Contamination de l'environnement littoral par les *Rotavirus* du groupe A, Thèse université de Rennes, 154 p.
- Dultsev F.N., Speight R.E., Fiorini M.T., Blackburn J.M., Abell C., Ostanin V.P. et D. Klenerman (2001) Direct and quantitative detection of bacteriophage by "hearing" surface detachment using a quartz crystal microbalance, *Analytical Chemistry*, 73 : 3935-3939.
- Dupray E. et A. Derrien (1995) Influence of the previous stay of *Escherichia coli* and *Salmonella spp.* in waste waters on their survival in seawater, *Water Res*, 29 : 1005-1011.
- Dupray E., Gauthier M., Gourmelon M., Joux F., Lebaron P., Martin Y. et M. Pommeupuy (1998) Responses of enteric bacteria to environmental stresses in seawater, *Oceanologica Acta*, 21 : 965-981.
- Durepaire N., Pradie M.P., Ploy, M.C., Mounier M., Ranger-Rogez S., Martin C. et F. Denis (1995) *Adenoviruses* from stool samples in hospital units. Comparison with main pathogens in gastroenteritis (*Rotavirus*, *Campylobacter*, *Salmonella*), *Pathol Biol*, 43 : 601-610.
- Dutka B.J. (1973), Coliforms are an inadequate index of water quality, *J Environ Health*, 36 : 39-46.
- Dutka B.J., El-Shaarawi A.H., Martins M.T. et P.S. Sanchez (1987) North and south American studies on the potential of coliphage as a water quality indicator, *Water Res*, 21 : 1127-1135.
- DVGW (1997), Deutscher Verein des Gas- und Wasserfaches, Arbeitsblatt W 294: UV-Desinfektionsanlagen für die Trinkwasserversorgung – Anforderungen und Prüfung.
- Edberg S.C., Leclerc H. et J.B. Robinson (1997) Natural protection of spring and well drinking water against surface microbial contamination. II. Indicators and monitoring parameters for parasites, *Crit Rev Microbiol*, 23 : 179-206.
- Edeline F. (1988) L'épuration biologique des eaux résiduaires, théorie et technologie, 3^{ème} Ed. Cebedoc, Liège, Tec et Doc-Lavoisier, Paris.
- Emiliani F. et S.M. González de Paira (1998) Bacteriological quality of Bendetti Lake (Santo Tomé, Santa Fe Province, Argentina) and associated environmental variables, *Revista Argentina de Microbiologia*, 30 (1) : Pages 30-38.
- Enriquez C.E., Husrt C.J. et C.P. Gerba (1995) survival of the enteric *Adenoviruses* 40 and 41 in tap, sea, and wastewater, *Water Res*, 29 : 2548-2553.
- EPA (Environmental Protection Agency) (2000) National Primary Drinking Water Regulations: Ground Water Rule; Proposed Rules, 65 (91) : 82p.
- Espigares M., Garcia F., Fernandes-Crehuet M., Alvarez A. et R. Galvez (1999) Detection of hepatitis A virus in wastewater, *Environ Tex*, 14 : 391-396.
- Fankhauser R.L., Noel J.S., Monroe S.S., Ando T. et R.I. Glass (1998) Molecular epidemiology of «Norwalk-like viruses» in outbreaks of gastroenteritis in the United States., *J Infect Dis*, 178 : 1571-1578.

- Farkas T., Jiang X., Guerrero M.L., Zhong W., Wilton N., Berke T., Matson D.O., Pickering L.K. et G. Ruiz-Palacios (2000) Prevalence and genetic diversity of human *Caliciviruses* (HuCVs) in Mexican children, *J Med Virol*, 62 (2) : 217-223.
- Farrah S.R. (1982) Chemical factors influencing adsorption of bacteriophage MS2 to membrane filters, *Appl Environ Microb*, 43 (3) : 659-663.
- Fattal B. et M. Nishmi (1977) *Enterovirus* types in Israel sewage, *Water Res*, 11 : 393-396.
- Fattal B., Vasi R.J., Katzenelson E. et H.I. Shuval (1983) Survival of bacterial indicator organisms and Enteric viruses in the mediterranean coastal waters of Tel-Aviv, *Water Res*, 17 : 397-402.
- Feinstone S.M. et I.D. Gust (1997) Hepatitis A virus. In *Clinical Virology*, eds D. D. Richman, R. J. Whitley et F. D. Hayden, Churchill Livingstone Inc., New York. pp. 1049-1067.
- Feng Y. et Xu X. (1993) A new method of RNA preparation for detection of hepatitis A virus in environmental samples by polymerase chain reaction, *J Virol Methods*, 43 : 77-84.
- Festy B. (1984) Survey of virus isolation data from environmental samples, In Bitton G. et al., eds. *Health effects research laboratory*. US Environmental Protection Agency, Cincinnati OH.
- Fewtrell L., Godfree A.F., Jones F., Kay D., Salmon R.L. et M.D. Wyer (1992) Health effects of white-water canoeing, *Lancet*, 339 : 1587-1589.
- Fleet G.H., Heiskanen P., Reid I. et K.A. Buckle (2000) Foodborne viral illness--status in Australia, *Int J Food Microbiol*, 59 (1-2) : 127-136.
- Flint K.P. (1987) The long-term survival of *E. coli* in river water, *J Appl Bacteriol* 63 : 261-270.
- Floyd R. (1979) Viral aggregation: mixed suspensions of *Poliovirus* and *Reovirus*, *Appl Environ Microb*, 38 (5) : 980-986.
- Floyd R. et D.G. Sharp, (1978) Viral aggregation: effects of salts on the aggregation of *Poliovirus* and *Reovirus* at low pH, *Appl Environ Microb*, 35 (6) : 1084-1094.
- Fogarty J., Thornton L., Hayes C., Laffoy M., O'Flanagan D., Devlin J. et Corcoran R. (1985) Illness in a community associated with an episode of water contamination with sewage, *Epidemiol Infect*, 114 : 289-295.
- Foy H.M., Cooney M.K. et J.B. Hatlen (1968) *Adenovirus* type 3 epidemic associated with intermittent chlorination of a swimming pool, *Arch Environ Health*, 17 : 795-802.
- Fries M.K., Whalley M.J., Sutherland K. et E.J. Sharp (2000) Field verification of UV disinfection performance, *Water Environment Association of Ontario Conference*, 17 avril.
- Fujioka R.S., Hashimoto H.H., Siwak E.B. et R.H.F. Young (1981) Effect of sunlight on survival of indicator bacteria in seawater, *Appl Environ Microb*, 41 : 690-696.
- Funderburg S.W. et C.A. Sorber (1985) coliphages as indicators of enteric viruses in activated sludge, *Water Res*, 19 : 547-555.
- Gaggero A., Avendaño L.F., Fernández J., et E. Spencer (1992) Nosocomial transmission of *Rotavirus* from patients admitted with diarrhea, *J Clin Microbiol*, 30 : 3294-3297.
- Gannon J.J., Busse M.K. et E. Schillinger (1983) Fecal coliform disappearance in a river impoundment, *Water Res*, 17 : 1595-1601.
- Gantzer C., Dubois É., Crance J.M., Billaudel S., Kopecka H., Schwartzbrod L., Pommepuy M. et F. Le Guyader (1998c) Influence of environmental factors on the survival of enteric viruses in seawater, *Oceanologica Acta*, 21 (6) : 983-992.
- Gantzer C., Lucena F. Schwartzbrod L. et J. Jofre (1998a) Indicateurs de contamination virale du milieu hydrique: mythe ou réalité, *Virologie*, 2 : 117-125.

Gantzer C., Maul A., Audic J.M. et L. Schwartzbrod (1998b) detection of infectious *Enteroviruses*, *Enterovirus* genomes, somatic coliphages, and *Bacteroides fragilis* phages in treated wastewater, *Appl Environ Microb*, 64 : 4307-4312.

Gantzer C., Maul A., Levi Y. et L. Schwartzbrod (1998d) Fate of the genome and infectious units of *Coxsackie B3 virus* in phosphate buffered saline, *Water Res*, 32 : 1329-1333.

Gantzer C., Senouci S., Maul A., Levy Y. et L. Schwartzbrod (1997) *Enterovirus* genomes in wastewater : concentration on glass wool and glass powder and detection by RT-PCR, *J Virol Met*, 65 : 265-271.

Garcia-Lara J., Menon P., Servais P. et G. Billen (1991) Mortality of fecal bacteria in seawater, *Appl Environ Microbiol.*, 57 : 885-888.

Gauthier M., Munro P., Flatau G. Clement R. et A. Breittmayer (1993a) Nouvelles perspectives sur l'adaptation des entérobactéries en milieu marin, *Mar Life*, 3, 19p.

Gauthier M.J., Fatau G.N., Munro P.M. et R.L. Clément (1993b) Glutamate uptake and synthesis by *Escherichia coli* cells in seawater: effects on culturability loss and glycinebetaine transport, *Microbial Releases: Viruses, Bacteria, Fungi*, 2 (1) : Pages 53-59.

Gauthier M.J., Flatau G.N., Clément R.L. et P.M. Munro (1992) Sensitivity of *Escherichia coli* cells to seawater closely depends on their growth stage, *J Appl Bacteriol*, 73 (3) : 257-262.

Genthe B., Gericke M., Bateman B., Mjoli N. et R. Kfir (1995) Detection of enteric *Adenovirus* in South African waters using gene probes, *Water Sci Technol*, 31 : 345-350.

Gentsch, J.R., Woods P.A., Ramachandran M., Das B.K., Leite J.P., Alfieri A., Kumar R., Bhan M.K. et R.I. Glass (1996) Review of G and P typing results from a global collection of *Rotavirus* strains: implications for vaccine development, *J Infect Dis.*, 174 (Suppl 1) : 30-36.

Gerba C.P. (1984) Applied and theoretical aspects of virus adsorption to surfaces, *Adv Appl Microbiol*, 30 : 133-168.

Gerba C.P. et C.N. Haas (1988) Assessment of risks associated with enteric viruses in contaminated drinking water, American Society for testing and materials, Technical publication 976, Philadelphia - USA.

Gerba C.P., Rose J.B. et C.N. Haas (1996) Sensitive populations: who is at the greatest risk?, *Int J Food Microbiol*, 30 (1-2) : 113-123.

Gilgen M., Germann D., Luthy J. et P. Hubner (1997) Three step isolation method for sensitive detection of *Enterovirus Rotavirus*, hepatitis A virus and small round structured viruses in water samples, *Int J Food Microbiol*, 37 : 189-199.

Gilgen M., Wegmuller B., Burkhalter P., Buhler H.P., Muller V., Luthy J. et V. Candrian (1995) Reverse transcription PCR to detect *Enteroviruses* in surface water, *Appl Environ Microb*, 61 : 1226-1231.

Glass R.I., Bresee J., Jiang B., Gentsch J., Ando T., Fankhauser R., Noel J., Parashar U., Rosen B. et S.S. Monroe (2001) Gastroenteritis viruses: an overview, *Novartis Foundation Symposium*, 238 : 5-19.

Glass R.I., Kilgore P.E., Holman R.C., Jin S., Smith J.C., Woods P.A., Clarke M.J., Ho M.S. et J.R. Gentsch (1996a) The epidemiology of *Rotavirus* diarrhea in the United States: surveillance and estimates of disease burden, *J Infect Dis*, 174 (Suppl. 1) : 5-11.

Glass R.I., Noel J., Mitchell D., Herrmann J.E., Blacklow N.R., Pickering L.K., Dennehy P., Ruiz-Palacios G., de Guerrero M.L. et S.S. Monroe (1996b) The changing epidemiology of *Astrovirus*-associated gastroenteritis : *Rev Arch Virol*, 12 : 287-300.

Gofti-Laroche L., Gratacap-Cavallier B., Genoulaz O., Joret J.C., Hartemann P., Seigneurin J.M. et D. Zmirou (2001) A new analytical tool to assess health risks associated with the virological quality of drinking water (EMIRA study), *Water Sci Technol*, 43 (12) : 39-48.

- González J.M. et C.A. Suttle (1993) Grazing by marine nanoflagellates on viruses and virus-sized particles: ingestion and digestion, *Mar Ecol-Prog*, 94 : 1-10.
- González J.M., Iriberry J., Egea L. et I. Barcina (1995) Characterization of culturability, protistan grazing, and death of enteric bacteria in aquatic ecosystems, *Appl Environ Microb*, 58 (3) : 998-1004.
- Gosbell I., Robinson D., Chant K. et S. Crone (2000) Outbreak of *echovirus* 30 meningitis in Wingecarribee Shire, New South Wales, *Communicable Diseases Intelligence*, 24 (5) : 121-124.
- Goswami B.B., Kulka M., Ngo D., Istafanos P. et T.A. Cebula (2002) A polymerase chain reaction-based method for the detection of hepatitis A virus in produce and shellfish, *J Food Protect*, 65 (2) : 393-402.
- Gourmelon M., Touati D., Pommepuy M. et M. Cormier (1997) Survival of *Escherichia coli* exposed to visible light in seawater: analysis of rpoS-dependent effects, *Can J Microbiol*, 43 : 1036-1043.
- Grabow W.O., Gauss-Müller V., Prozesky O.W. et F. Deinhardt (1983) Inactivation of hepatitis A virus and indicator organisms in water by free chlorine residuals, *Appl Environ Microb*, 46 : 619-624.
- Grabow W.O.K., Botma K.L., De Villiers J.C., Clay C.J. et B. Erasmus (1999a) Assessment of cell culture and polymerase chain reaction procedures for the detection of *Poliovirus* in wastewater, *Bull. WHO*, 77 : 973-978.
- Grabow W.O.K., Coubrough P., Nupen E.M. et B.W. Bateman (1984) Evaluation of coliphages as indicators of the virological quality of sewage-polluted water, *Water SA*, 10 : 7-14.
- Grabow W.O.K., Idema G.K., Coubrough P. and B.W. Bateman (1989) Selection of indicator systems for human viruses in polluted seawater and shellfish, *Water Sci Technol*, 21 (3) : 111-117.
- Grabow W.O.K., Neubrech T.E., Holtzhausen C.S. et J. Jofre (1995) *Bacteroides fragilis* and *E. coli* bacteriophages: excretion by humans and animals, *Water Res*, 31 : p223-230
- Grabow W.O.K., Puttergill D.L. et A. Bosch (1992) Propagation of *Adenovirus* types 40 and 41 in the PLC/PRF/5 primary liver carcinoma cell line, *J Virol Methods*, 37 (2) : 201-207.
- Grabow W.O.K., Puttergill D.L. et A. Bosch (1993) Plaque assay for *Adenovirus* type 41 using the PLC/PRF/5 liver cell line, *Water Sci Technol*, 27 : 321-327.
- Grabow W.O.K., Taylor M.B. et J.C. de Villiers (2001) New methods for the detection of viruses: call for review of drinking water quality guidelines, *Water Sci Technol*, 43 (12) :1-8.
- Grabow W.O.K., Taylor M.B., Clay C.G. et J.C. De Villiers (1999b) Molecular detection of viruses in drinking water, Implications for safety and disinfection. Second conference International life sciences institute « The safety of water disinfection », Miami Beach, USA, November 1999.
- Graff J., Ticehurst J. et B. Flehmig (1993) Detection of hepatitis A virus in sewage sludge by antigen capture PCR., *Appl Environ Microb*, 59 : 3165-3170.
- Graham D.Y., Dufour G.R. et M.K. Estes (1987) Minimal infective dose of *Rotavirus*., *Arch Virol*, 92 : 261-271.
- Gratacap-Cavallier B., Genoulaz O., Brengel-Pesce K., Soule H., Innocenti-Francillard P., Bost M., Gofti L., Zmirou D. et J.M. Seigneurin (2000) Detection of human and animal *Rotavirus* sequences in drinking water, *Appl Environ Microb*, 66 (6) : 2690-2692.
- Green J., Bruce K., Conner C. et R. Mutesi (2000a) The APHA standard method for the enumeration of somatic coliphages in water has low efficiency of plating, *Water Res*, 34 : 759-762.
- Green J., Henshilwood K., Gallimore C.I., Brown D.W.G. et D.N. Lees (1998) A nested transcriptase PCR Assay for detection of small round-structured viruses in environmentally contaminated molluscan shellfish, *Appl Environ Microb*, 64 : 858-863.

- Green J., Vinje J., Gallimore C.I., Koopmans M., Hale A., Brown D.W., Clegg J.C. et J. Chamberlain (2000b) Capsid protein diversity among Norwalk-like viruses, *Virus Genes*, 20 (3) : 227-236.
- Green K.Y., Ando T., Balayan M.S., Berke T., Clarke I.N., Estes M.K., Matson D.O., Nakata S., Neill J.D., Studdert M.J. et H.J. Thiel (2000c) Taxonomy of the *Caliciviruses*, *J Infect Dis*, 181, Supplement 2 : 322-330.
- Greening G.E., Mirams M. et T. Berke (2001) Molecular epidemiology of 'Norwalk-like viruses' associated with gastroenteritis outbreaks in New Zealand, *J Med Virol*, 64 (1) : 58-66.
- Greensfelder L. (2000) Infectious diseases. Polio outbreak raises questions about vaccine, *Science*, 290 (5498) : 1867-1869.
- Grémy F. et F. Leterrier (1966) Colloïdes et macromolécules in *Éléments de biophysique*, Flammarion Medicine Sciences, Paris.
- Griffin D.D., Kirkwood C.D., Parashar U.D., Woods P.A., Bresee J.S., Glass R.I. et J.R. Gentsch (2000) Surveillance of *Rotavirus* strains in the United States: identification of unusual strains. The National *Rotavirus* Strain Surveillance
- Grimm A.C. et G.F. Shay (2002) Development of a molecular method to identify hepatitis E virus in water, *J Virol Methods*, 101 (1-2) : 175-188.
- Grinde B., Stene-Johansen K., Sharma B., Hoel T., Jensenius M. et K. Skaug (1997) Characterisation of an epidemic of hepatitis A virus involving intravenous drug abusers - infection by needle sharing?, *J Med Virol*, 53 (1) : 69-75.
- Grohmann G.S., Glass R.I., Pereira H.G., Monroe S.S., Hightower A.W., Weber R. et R.T. Bryan (1993) Enteric viruses and diarrhea in HIV-infected patients, Enteric Opportunistic Infections Working Group, *N. Engl. J.*
- Grohmann, G., Glass R.I., Gold J., James M., Edwards P., Borg T., Stine S.E., Goldsmith C. et S.S. Monroe (1991) Outbreak of human *Calicivirus* gastroenteritis in a day-care center in Sydney, Australia, *J Clin Microbiol*, 29 : 544-550.
- Grom J. et S. Bernard (1985) Virus enzyme-linked cell immunoassay (VELCIA): detection and titration of *Rotavirus* antigen and demonstration of *Rotavirus* neutralizing and total antibodies, *J Virol Methods*, 10 (2) : 135-144.
- Guélin, A. (1952) Application de la recherche des bacteriophages à l'étude des eaux polluées, *Ann Inst Pasteur Paris*, 82 : 78-89.
- Guérin N., Lequellerc-Nathan M., Rebiere I., Dubrou S. et M. Aymard (1997) Surveillance de la poliomyélite et des *Poliovirus* en France – BEH 12/1997.
- Guerrero R., Pedros-Alio C., Esteve I., Mas J., Chase D. et L. Margulis (1986) Predatory prokaryotes: predation and primary consumption evolved in bacteria, *Proc Nat Acad Sci of the United States of America*, 83 : 2138-2142.
- Guillaud J.F., Pommepuy M., Dupray E., Salomon J.C. et B. Thouvenin (1993) Urban wastewater discharge and bacteriological quality of receiving coastal waters : process and modelling, *Water Sci Technol*, 27 : 223-226.
- Guttmann-Bass N. et B. Fattal (1985) Analysis of tapwater for viruses : results of a survey, *Water Sci Technol*, 17 : 89-94.
- Hadler S.C. (1991) Global impact of hepatitis A infection changing patterns, in : *Viral hepatitis and liver disease*. Hollinger F.B., Lemon S.M., Margolis H., eds, Williams et Wilkins.
- Häfliger D., Gilgen M., Luthy J. et P. Hubner (1997) Semiautomated RT-PCR systems for small round structured viruses and detection of enteric viruses in seafood, *Int J Food Microbiol*, 37 : 27-36.
- Häfliger D., Hubner P. et J. Luthy (2000) Outbreak of viral gastroenteritis due to sewage-contaminated drinking water, *Int J Food Microbiol*, 54 : 123-126.
- Hale A.D., Green J. et D.W.G. Brown (1996) Comparison of four RNA extraction methods for the detection of small round structured viruses in faecal specimens, *J Virol Methods*, 57 : 195-201.
- Harley D., Harrower B., Lyon M. et A. Dick (2001) A primary school outbreak of pharyngoconjunctival fever caused by *Adenovirus* type 3, *Commun Dis Intell.*, 25 (1) : 9-12.

Havelaar A. H., van Olphen M. et J.F. Schijven (1995) Removal and inactivation of viruses by drinking water treatment processes under full scale conditions, *Water Sci Technol*, 31 (5-6) : 55-62.

Havelaar A.H. (1993) A bacteriophage standard for bathing waters. Final report. European contract B4-3040/92/012609.

Havelaar A.H. et W.H. Hogeboom (1984) A method for the detection of male-specific bacteriophages in sewage, *J Appl Bacteriol*, 56 : 439-447.

Havelaar A.H. et W.M. Hogeboom (1983) factors affecting the enumeration of coliphages in sewage and sewage-polluted waters, *Antonie van Leeuwenhoek*, 49 : 387-397.

Havelaar A.H. et W.M. Hogeboom (1988) F-specific RNA-bacteriophages as model viruses in water hygiene : ecological aspect, *Water Sci Technol*, 20 : 399-407.

Havelaar A.H., Van Olphen M. et Y.C. Drost (1993) F-specific RNA bacteriophages are adequate model organisms for enteric viruses in fresh water, *Appl Environ Microb*, 59 : 2956-2962.

Havelaar A.H. (1987) Bacteriophages as model organisms in water treatment, *Microbiol Sci*, 12 : 362-4.

Hejkal T., Keswick B. Labelle R., Gerba C.P., Sanchez Y., Dreesman G., Hafkin B. et J.L. Melnick (1982), Viruses in a community water supply associated with an outbreak of gastroenteritis and infectious hepatitis, *J Am Water Works Ass*, 74 : 318-321.

Hejkal T.W., Smith E.M. et C.P. Gerba (1984) Seasonal occurrence of *Rotavirus* in sewage, *Appl Environ Microb*, 47 (3) : 588-590.

Hermansson M. (1999) The DLVO theory in microbial adhesion, *Colloids Surface B*, 14 (1-4) : 105-119.

Hollinger F.B. et C. Ticehurst (1990) Hepatitis A virus, in : *Virology*. Fields B.N., Knipe D.M. et al., : eds Raven Press Ltd New-York.

Hoyt J.L., et A.B. Margolin (2000) Fortified sera and their use in environmental virology, *Appl Environ Microb*, 66 (5) : 2259-2262.

Hsu F.C., Shieh Y.S., van Duin J., Beekwilder M.J. et M.D. Sobsey (1995) Genotyping male-specific RNA coliphages by hybridization with oligonucleotide probes, *Appl Environ Microb*, 61 : 3960-3966.

Huang P.W., Laborde D., Land V.R., Matson D.O., Smith A.W. et X. Jiang (2000) Concentration and detection of *Caliciviruses* in water samples by reverse transcription-PCR, *Appl Environ Microb*, 66 (10) : 4383-4388.

Hugues B., Cini A., Plissier M. et Lefebvre J.R. (1980) Recherche des virus dans le milieu marin à partir d'échantillons de volumes différents. *Eau Quebec*, 13, 199-203.

Hugues B., Pietri C. et M. Andre (1985) Estimation of virus density in sewage effluents by two counting techniques : comparison of precisions as a function of inoculum volume, *Zbl Hyg I. Abt. Orig.*, B 181 : 409-417.

Hugues M.S., Coyle P.U. et J.H. Connolly (1992) *Enteroviruses* in recreational waters of Northern Ireland, *Epidemiol Infect*, 108 : 529-536.

Hung T., Chen G.M., Wang C.G., Yao H.L., Fang Z.Y., Chao T.X., Chou Z.Y., Ye W., Chang X.J. et S.S. Den (1984) Waterborne outbreak of *Rotavirus* diarrhoea in adults in China caused by a novel *Rotavirus*, *Lancet*, 1 : 1139-1142.

Hutin Y.J., Pool V., Cramer E.H., Nainan O.V., Weth J., Williams I.T., Goldstein S.T., Gensheimer K.F., Bell B.P., Shapiro C.N. Alter M.J. et H.S. Margolis (1999) A multistate, foodborne outbreak of hepatitis A. National Hepatitis A Investigation Team, *New Engl J Med*, 340 : 595-602.

IAWPRC Study Group on Health Related Water Microbiology (1991) Bacteriophages as model of viruses in water quality control, *Water Res*, 25 : 529-545.

Ignazzito G., Volterra J., Aulicismo F.A. et A.M. D'Angelo (1980) Coliphages as indicators in treatment plants, *Water Air Soil Poll.*, 13 : 391-398.

Ijzerman M.M., Dahling D.R. et G.S. Fout (1997) A method to remove environmental inhibitors prior to the detection of waterborne enteric viruses by reverse transcription-polymerase chain reaction, *J Virol Methods*, 63 (1-2) : 145-153.

Iritani N., Seto Y., Kubo H., Haruki K., Ayata M. et H. Ogura (2002) Prevalence of "Norwalk-like virus" infections in outbreaks of acute nonbacterial gastroenteritis observed during the 1999-2000 season in Osaka City, Japan, *J Med Virol*, 66 (1) : 131-138.

Irving L.G. et F.A. Smith (1981) One year survey of *Enteroviruses*, *Adenoviruses* and *Reoviruses* isolated from effluent at an activated sludge purification plant, *Appl Environ Microb*, 41 : 51-59.

ISO 9308/1 (1990) Qualité de l'eau - Recherche et dénombrement des organismes coliformes, des organismes coliformes thermotolérants et des *Escherichia coli* présumés - Partie 1: Méthode par filtration sur membrane.

ISO 7899/2 (1984) Qualité de l'eau - Recherche et dénombrement des streptocoques fécaux - Partie 2: Méthode par filtration sur membrane.

ISO 6461/1 (1986) Qualité de l'eau - Recherche et dénombrement des spores de micro-organismes anaérobies sulfito-réducteurs (clostridia) - Partie 1: Méthode par enrichissement dans un milieu liquide.

ISO/FDIS 10705/2 (1999) Qualité de l'eau - Détection et dénombrement des bactériophages - Partie 2: Dénombrement des coliphages somatiques.

ISO/FDIS 10705/1 (1997) Qualité de l'eau - Détection et dénombrement des bactériophages - Partie 1: Dénombrement des bactériophages ARN F spécifiques.

ISO/FDIS 10705/4 (1999) Qualité de l'eau - Détection et dénombrement des bactériophages - Partie 4: Dénombrement des bactériophages infectant *Bacteroides fragilis*.

Ivanova O.E., Eremeeva T.P., Lipskaya G.Y., Cherkasova E.A., Gavrillin E.V. et S.G. Drozdov (2001) Outbreak of paralytic poliomyelitis in the Chechen Republic in 1995, *Developments in Biologicals*, 105 : 231-237.

Jagals P., Grabow W.O.K. et J.C. de Villiers (1995) Evaluation of indicators for assessment of human and animal faecal pollution of surface run-off, *Water Sci Technol*, 31 (5-6) : 235-241.

James V.L., Lambden P.R., Caul E.O., Cooke S.J. et I.N. Clarke (1997) Seroepidemiology of human group C *Rotavirus* in the UK, *J Med Virol*, 52 : 86-91.

Jaykus L.A., De Leon R. et M.D. Sobsey (1993) Application of RT-PCR for the detection of enteric viruses in oysters. *Water Sci Technol*, 27, 49-53.

Jaykus L.A., De Leon R. et M.D. Sobsey (1995) Development of a molecular method for the detection of enteric viruses in oysters. *J Food Prot*, 58, 1357-1362.

Jaykus L.A., De Leon R. et M.D. Sobsey (1996) A virion concentration method for detection of human enteric viruses in oysters by PCR and oligoprobe hybridization, *Appl Environ Microb*, 62 : 2074-2080.

Jean J., Blais B., Darveau A. et I. Fliss (2001) Detection of hepatitis A virus by the nucleic acid sequence-based amplification technique and comparison with reverse transcription-PCR, *Appl Environ Microb*, 67 (12) : 5593-5600.

Jewett D.G., Hilbert T.A., Logan B.E., Arnold R.G. et R.C. Bales (1995) Bacterial transport in laboratory columns and filters: influence of ionic strength and pH on collision efficiency, *Water Res*, 29 (7) : 1673-1680.

Jiang B., Dennehy P.H., Spangenberg S., Gentsch J.R. et R.I. Glass (1995) First detection of group C *Rotavirus* in fecal specimens of children with diarrhea in the United States, *J Infect Dis*, 172 : 45-50.

Jiang S., Noble R. et W. Chu W (2001) Human *Adenoviruses* and coliphages in urban runoff-impacted coastal waters of Southern California, *Appl Environ Microb*, 67 (1) : 179-184.

- Jing Y., Qian Y., Huo Y., Wang L.P. et X. Jiang (2000) Seroprevalence against Norwalk-like human *Caliciviruses* in Beijing, China, *J Med Virol*, 60 (1) : 97-101.
- Jofre (1991) Les bactériophages dans le milieu hydrique in "Virologie des milieux hydriques". Schwartzbrod L. ed. Tec. et Doc. Lavoisier, Paris.
- Jofre J., Blasi M., Bosch A. et F. Lucena (1989) occurrence of bacteriophages infecting *Bacteroides fragilis* and other viruses in polluted marine sediments, *Water Sci Technol*, 21 : 15-19.
- Jofre J., Bosch A., Lucena F., Gironès R. et C. Tartera (1986) Evaluation of *Bacteroides fragilis* bacteriophages as indicators of the virological quality of water, *Water Sci Technol*, 18 : 167-173.
- Jofre J., Olle E., Ribas F., Vidal A. et F. Lucena (1995) potential usefulness of bacteriophages that infect *Bacteroides fragilis* as model organisms for monitoring virus removal in drinking water treatment plants, *Appl Environ Microb*, 61 : 3227-3231.
- Johnson P.R., Sun N. et M. Elimelech (1996) Colloid transport in geochemically heterogeneous porous media : modeling and measurements, *Environ Sci Technol*, 30 (11) : 3284-3293.
- Johnson W.P. et B.E. Logan (1996) Enhanced transport of bacteria in porous media by sediment-phase and aqueous-phase natural organic matter, *Water Res*, 30 (4) : 923-931.
- Jothikumar N., Cliver D.O. et W.M. Tadesse (1998) Immunomagnetic capture PCR for rapid concentration and detection of hepatitis A virus from environmental samples, *Appl Environ Microb*, 64 : 504-508.
- Jothikumar N., Paulmurugan R., Padmanabhan P., Sundari R.B., Kamatchiammal S. et K.S. Rao (2000) Duplex RT-PCR for simultaneous detection of hepatitis A and hepatitis E virus isolated from drinking water samples, *J Environ Monitoring: JEM*, 2 (6) : 587-590.
- Kapikian A.Z. (1997) Viral gastroenteritis In "Viral infections of humans. Epidemiology and Control", 4th ed. (Evans A.S., Kaslow R.A., eds.), Plenum Medical Book Company, New York and London, pp. 285-343.
- Kapikian A.Z. et R.M. Chanock (1996) *Rotaviruses*, In: Fields BN, Knipe DM, Howley PM, Chanock RM, Monath TP, Melnick JL, et al., editors. *Fields virology*, 3rd ed. Vol. 2. New York: Raven Press : 1657-1708.
- Kapikian A.Z., Wyatt R.G., Dolin R., Thornhill T.S., Kalica A.R. et R.M. Chanock (1972) Visualization by immune electron microscopy of a 27-nm particle associated with acute infectious nonbacterial gastroenteritis, *J Virol*, 10 (5) : 1075-1081.
- Kapuscinski R. et R. Mitchell (1981) Solar radiation induces sublethal injury in *Escherichia coli* in seawater, *Appl Environ Microb*, 41 : 670-675.
- Kapuscinski R.B. et R. Mitchell (1980) Processes controlling virus inactivation in coastal waters, *Water Res*, 14 : 363-371.
- Kapuscinski, R.B., et R. Mitchell (1983) Sunlight-induced mortality of viruses and *Escherichia coli* in coastal seawater. *Environ Sci Technol*, 17 : 1-6.
- Kar P., Gangwal P., Budhiraja B., Singhal R., Jain A., Madan K., Gupta R.K., Barua S.P. et M.C. Nath (2000) Analysis of serological evidence of different hepatitis viruses in acute viral hepatitis in prisoners in relation to risk factors, *The Indian Journal of Medical Research*, 112 : 128-132.
- Katayama H., Shimasaki A. et S. Ohgaki (2002) Development of a virus concentration method and its application to detection of *Enterovirus* and *Norwalk virus* from coastal seawater, *Appl Environ Microb*, 68 (3) : 1033-1039.
- Keswick B.H., Gerba C.P., Dupont H.L. et J.B. Rose (1984) Detection of Enteric viruses in treated drinking water, *Appl Environ Microb*, 47 : 1290-1294.
- Keswick B.H., Satterwhite T.K., Johnson P.C., DuPont H.L., Secor S.L., Bitsura J.A., Gary G.W. et J.C. Hoff (1985) Inactivation of *Norwalk virus* in drinking water by chlorine, *Appl Environ Microb*, 50 : 261-264.

Kew O., Morris-Glasgow V., Landaverde M., Burns C., Shaw J., Garib Z., André J., Blackman E., Freeman C.J., Jorba J., Sutter R., Tambini G., Venczel L., Pedreira C., Laender F., Shimizu H., Yoneyama T., Miyamura T., van Der Avoort H., Oberste M.S., Kilpatrick D., Cochi S., Pallansch M. et C. de Quadros (2002) Outbreak of poliomyelitis in Hispaniola associated with circulating type 1 vaccine-derived *Poliovirus*, *Science*, 296 (5566) : 356-359.

Kim T.D. et H. Unno (1996) The roles of microbes in the removal and inactivation of viruses in a biological wastewater treatment system, *Water Sci Technol*, 33 : 243-250.

Kingsley D.H. et G.P. Richards (2001) Rapid and efficient extraction method for reverse transcription-PCR detection of hepatitis A and Norwalk-like viruses in shellfish, *Appl Environ Microb*, 67 (9) : 4152-4157.

Kingsley D.H., Meade G.K. et G.P. Richards (2002) Detection of both Hepatitis A Virus and Norwalk-Like Virus in Imported Clams Associated with Food-Borne Illness, *Appl Environ Microb*, 68 (8) : 3914-3918.

Kirsten A.M., M. Bahar, Muniesa M. et A.H. Havelaar (2002) Optimisation of ISO 10705-1 on enumeration of F-specific bacteriophages, *J Virol Methods*, 103 : 129-136.

Kittigul L., Raengsakulrach B., Siritantikorn S., Kanyok R., Utrarachkij F., Diraphat P., Thirawuth V., Siripanichgon K., et S. Pungchitton (2000) Detection of *Poliovirus*, hepatitis A virus and *Rotavirus* from sewage and water samples, *The Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health*, 31 (1) : 41-46.

Knowlton D.R. et R.L. Ward (1987) Characterization of virucidal agents in activated sludge, *Appl Environ Microb*, 53 : 621-626.

Kohli E., Bon F. et P. Pothier (2001) Les principaux virus de gastro-entérites chez l'homme, *Bull Soc Fr Microbiol*, 16 : 97-102.

Kohn M.A., Farley T.A., Ando T., Curtis M., Wilson S.A., Jin Q., Monroe S.S., Baron R.C., McFarland L.M. et R.I. Glass (1995) An outbreak of *Norwalk virus* gastroenteritis associated with eating raw oysters. Implications for maintaining safe oyster beds, *JAMA*, 273 (6) : 466-471.

Koopmans M., Vinje J., de Wit M., Leenen I., van der Poel W. et Y. van Duynhoven (2000) Molecular epidemiology of human enteric *Caliciviruses* in The Netherlands, *J Infect Dis*, Supplement 2, 181 : 262-269.

Koopmans M., von Bonsdorff C.H., Vinjé J., de Medici D. et S. Monroe (2002) Foodborne viruses, *FEMS Microbiol Rev*, 26 (2) : 187-205.

Kopecka H.S., Dubrou J., Prevot J., Marechal et J.M. Lopez-Pila (1993) Detection of naturally occurring *Enteroviruses* in waters by reverse transcription, polymerase chain reaction, and hybridization, *Appl Environ Microb*, 59 : 1213-1219.

Kott Y. (1981) Viruses and bacteriophages, *Sci. Total. Environ.*, 18 : 13-23.

Kott Y., Ben-Ari H. et L. Vinokur (1978) Coliphages survival as viral indicator in various wastewater quality effluents, *Prog. Water Technol.*, 10 : 337-346.

Kott Y., Roze N., Sperber S. et N. Betzer (1974) Bacteriophages as viral pollution indicators, *Water Res*, 8 : 165-171.

Kott, Y. (1966) Estimation of low numbers of *Escherichia coli* bacteriophage by use of the most probably number method, *Appl Environ Microb*, 14 : 141-144.

Kreader C.A. (1996) Relief of amplification inhibition in PCR with bovine serum albumin or T4 gene 32 protein, *Appl Environ Microb*, 62 : 1102-1106.

Krikelis V., Markoulatos P. et N. Spyrou (1986) Viral pollution of coastal waters resulting from the disposal of untreated sewage effluent, *Water Sci Technol*, 18 : 43-48.

Krikelis, V., Spyrou, N. et P. Markoulatos (1988) Evaluation of Enteric Virus levels and serotypes recovered from wastewater and sea-water, *J. Hygiene, Epidem. Microb. Immun.*, 32 : 153-158.

- Kukkula M., Arstila P., Klossner M.L., Maunula L., Bonsdorff C.H. et P. Jaatinen (1997) Waterborne outbreak of viral gastroenteritis, *Scandinavian J Infect Dis*, 29 (4) : 415-418.
- Kuntchev A. (2001) From the Centers for Disease Control and Prevention. Imported wild *Poliovirus* causing poliomyelitis--Bulgaria, 2001, *JAMA*, 286 (23) : 2937-2938.
- LaBelle R.L. et C.P. Gerba (1979) Influence of pH, salinity, and organic matter on the adsorption of enteric viruses to estuarine sediment, *Appl Environ Microb*, 38 (1) : 93-101.
- Labrique A.B., Thomas D.L., Stoszek S.K. et K.E. Nelson (1999) Hepatitis E : an emerging infectious disease, *Epidemiol. Rev.*, 21 : 162-179.
- Lappalainen M., Chen R.W., Maunula L., von Bonsdorff C.H., Plyusnin A. et A. Vaheri (2001) Molecular epidemiology of viral pathogens and tracing of transmission routes: hepatitis-, calici- and hantaviruses, *J Clin Virol*, 21 (3) : 177-185.
- Lasobras J., Dellunde J., Joffre J. et F. Lucena (1999) Occurrence and levels of phages proposed as surrogate indicators of enteric viruses in different types of sludges, *J Appl Microbiol*, 86 : 723-729.
- Lasobras J., Muniesa M., Frías J., Lucena F. et J. Jofre (1997) Relationship between the morphology of bacteriophages and their persistence in the environment, *Water Sci Technol*, 35 : 129-132.
- Lavanchy D., Morel B. et P.C. Frei (1994) Seroprevalence of hepatitis E virus in Switzerland, *Lancet*, 344 (8924) : 747-748.
- Lazarova V., Janex M.L., Fiksdal L., Oberg C., Barcina I. et M. Pommepuy (1998) Advanced wastewater disinfection technologies: short and long term efficiency, *Water Sci Technol*, 38 (12) : 109-117.
- Le Guyader F., Dubois E., Menard D. et M. Pommepuy (1994) Detection of hepatitis A virus, *Rotavirus*, and *Enterovirus* in naturally contaminated shellfish and sediment by reverse transcription-nested PCR, *Appl Environ Microb*, 60 (10) : 3665-3671.
- Le Guyader F., Haugarreau L., Miossec L., Dubois E. et M. Pommepuy (2000) Three-year study to assess human enteric viruses in shellfish, *Appl Environ Microb*, 66 (8) : 3241-3248.
- Le Guyader F., Neil F.H., Estes M.K., Monroe S.S., Ando T. et R.L. Atmar (1996) Detection and analysis of small round-structured virus strain in oysters implicated in an outbreak of acute gastro-entérites, *Appl Environ Microb*, 62 (11) : 4268-4272.
- Le Guyader F., Pommepuy M. et M. Cormier (1991) Implantation of *Escherichia coli* in pilot experiments and the influence of competition on the flora, *Can J Microbiol*, 37 (2) : 116-121.
- Leary T.P., Erker J.C., Chalmers M.L., Wetzel J. D., Desai S. M., Mushahwar I.K. et T.S. Dermody (2002) Detection of *Reovirus* by reverse transcription-polymerase chain reaction using primers corresponding to conserved regions of the viral L1 genome segment, *J Virol Methods*, 104 (2) : 161-165.
- LeChevallier M.W. et G.A. McFeters (1985) Interactions between heterotrophic plate count bacteria and coliform organisms, *Appl Environ Microb*, 49 (5) : 1338-1341.
- Leclerc H., Edberg S., Pierzo V. et J.M. Delattre (2000) Bacteriophages as indicators of enteric viruses and public health risk in groundwater, *J Appl Microbiol*, 88 : 5-21.
- Lee J.V., Dawson S.R., Ward S., Surman S.B. et K.R. Neal (1997) Bacteriophages are a better indicator of illness rates than bacteria amongst users of a white water course fed by a lowland river, *Water Sci Technol*, 35 : 165-170.
- Lee S.H. et S.J. Kim (2002) Detection of infectious *Enteroviruses* and *Adenoviruses* in tap water in urban areas in Korea, *Water Res*, 36 : 248-256.
- Lees D.N., Henshilwood K. et Dore W.K. (1994) Development of a method for detection of *Enteroviruses* in shellfish by PCR with Poliovirus as a model. *Appl Environ Microb*, 60, 2999-3005

- Legeay O., Caudrelier Y., Cordevant C., Rigottier-Gois L. et M. Lange (2000) Simplified procedure for detection of enteric pathogenic viruses in shellfish by RT-PCR, *J Virol Methods*, 90 (1) : 1-14.
- Leong L.Y.C. (1983) The removal and inactivation of by treatment processes for potable water and wastewater - a review, *Water Sci Technol*, 15 : 91-114.
- Lewis D. et T.G. Metcalf (1988) Removal of viruses in sewage treatment: assessment of feasibility, *Microbiological Sciences*, 5 : 260-264.
- Lewis D.C., Lightfoot N.F., Cubitt W.D., Wilson S.A. (1989) Outbreaks of *Astrovirus* type 1 and *Rotavirus* gastroenteritis in a geriatric in-patient population, *J Hosp Infect*, 14 : 9-14.
- Lewis G.D., Austin F.J., Loutit M.W. et K. Sharples (1986) *Enterovirus* removal from sewage : the effectiveness of four different treatment plants, *Water Res*, 20 : 1291-1297.
- Lewis G.D., Molloy S.L., Greening G.E. et J. Dawson (2000) Influence of environmental factors on virus detection by RT-PCR and cell culture, *J Appl Microbiol*, 88 (4) : 633-640.
- Ley V., Higgins J. et R. Fayer (2002) Bovine *Enteroviruses* as indicators of fecal contamination, *Appl Environ Microb*, 68 (7) : 3455-3461.
- Lin T.Y., Chang L.Y., Hsia S.H., Huang Y.C., Chiu C.H., Hsueh C., Shih S.R., Liu C.C. et M.H. Wu (2002) The 1998 *Enterovirus* 71 outbreak in Taiwan: pathogenesis and management, *Clin Infect Dis*, 34 (Suppl 2) : 52-57.
- Lindberg A.M. et A. Andersson (1999) Purification of full-length *Enterovirus* cDNA by solid phase hybridization capture facilitates amplification of complete genomes, *J Virol Methods*, 77 (2) : 131-137.
- Lipp E.K., Farrah S.A. et J.B. Rose (2001) Assessment and impact of microbial fecal pollution and human enteric pathogens in a coastal community, *Mar Pollut Bull*, 42 (4) : 286-293.
- Lipp E.K., Jarrell J.L., Griffin D.W., Lukasik J., Jacukiewicz J. et J.B. Rose (2002) Preliminary evidence for human fecal contamination in corals of the Florida Keys, USA, *Mar Pollut Bull*, 44 (7) : 666-670.
- Lipson S.M. et G. Stotzky (1984) Effect of proteins on *Reovirus* adsorption to clay minerals, *Appl Environ Microb*, 48 (3) : 525-530.
- Liste M.B., Natera I., Suarez J.A., Pujol F.H., Liprandi F., et J.E. Ludert (2000) Enteric virus infections and diarrhea in healthy and human immunodeficiency virus-infected children, *J Clin Microbiol*, 38 : 2873-2877.
- Liu B.L., Lambden P.R., Gunther H., Otto P., Elschner M. et I.N. Clarke (1999) Molecular characterization of a bovine enteric *Calicivirus*: relationship to the Norwalklike viruses, *J Virol*, 73 : 819-825.
- Loge F.J., Thompson D.E. et D.R. Call (2002) PCR detection of specific pathogens in water: a risk-based analysis, *Environ Sci Technol*, 36 (12) : 2754-2759.
- Lopez-Pila J.M. et R. Szewzyk (2000) Estimating the infection risk in recreational waters from the faecal indicator concentration and from the ratio between pathogens and indicators, *Water Res*, 34 : 4195-4200.
- Lopman B.A., Brown D.W. et M. Koopmans (2002) Human *Caliciviruses* in Europe, *J Clin Virol*, 24 (3) : 137-160.
- Loveland J.P., Ryan J.N., Amy G.L. et R.W. Harvey (1996) The reversibility of virus attachment to mineral surfaces, *Colloids Surf., A: Physicochem. Eng. Aspects*, 107 : 205-221.
- Lucena et al. (2002) Occurrence and densities of bacteriophages proposed as indicators and bacterial indicators in river waters from Europe and South America, *Water Res*, 36 : 105-114.
- Lucena F., Araujo R. et J. Jofre (1996) Usefulness of bacteriophages infecting *Bacteroides fragilis* as index microorganisms of remote faecal pollution, *Water Res*, 30 : 2812-2816.

- Lukasik J., Scott T.M., Andryshak D. et S.R. Farrah (2000) Influence of salts on virus adsorption to microporous filters, *Appl Environ Microb* 66 :2914-2920.
- Lytle C.D. et L.B. Routson (1995) Minimized virus binding for tests of barrier matériels, *Appl Environ Microb* 61 : 643-649.
- Mahoney F.J., Farley T.A., Kelso K.Y., Wilson S.A., Horan J.M. et L.M. McFarland (1992) An outbreak of hepatitis A associated with swimming in a public pool, *J Infect Dis*, 165 : 613-618.
- Mancini J.J. (1978) Numerical estimates of coliforms mortality rates under various conditions, *Jour. WPCF.*, 50 : 2477-2484.
- Marie D., Brussaard C.P.D., Thyraug R., Bratbak G. et D. Vaulot, 1999. Enumeration of viruses in marine samples by flow cytometry. *Appl Environ Microb*, 65 : 45-52.
- Martín J., Ferguson G.L., Wood D.J. et P.D. Minor (2000) The vaccine origin of the 1968 epidemic of type 3 poliomyelitis in Poland, *Virology*, 278 (1) : 42-49.
- Martin J., Ferguson G.L., Wood D.J. et P.D. Minor (2001) Risks of reintroduction of polio after eradication: the vaccine origin of an outbreak of type 3 poliomyelitis, *Developments in Biologicals*, 105 : 83-92.
- Martins M.T., Soares L.A., Marques E. et A.G. Molina (1983) Human Enteric viruses isolated from influents of sewage treatment plants in Sao Paulo, Brazil, *Water Sci Technol*, 15 : 69-73.
- Martone W.J., Hierholzer J.C., Keenlyside R.A., Fraser D.W., D'Angelo L.J. et W.G. Winkler (1980) An outbreak of *Adenovirus* type 3 disease at a private recreation center swimming pool, *Am J Epidemiol*, 111 : 229-237.
- Marx A., Shay D.K., Noel J.S., Brage C., Bresee J.S., Lipsky S., Monroe S.S., Ando T., Humphrey C.D., Alexander et R.I. Glass (1999) An outbreak of acute gastroenteritis in a geriatric long-term-care facility: combined application of epidemiological and molecular diagnostic methods, *Infect Contr Hosp Epidemiol*, 20 (5) : 306-311.
- Marx F.E., Taylor M.B. et W.O.K. Grabow (1995) Optimization of a PCR method for the detection of *Astrovirus* type 1 in environmental samples, *Water Sci Technol*, 31 (5-6) : 359-362.
- Marx F.E., Taylor M.B. et W.O.K. Grabow (1998) The application of a reverse transcriptase-polymerase chain reaction-oligonucleotide probe assay for the detection of human *Astroviruses* in environmental water, *Water Res*, 32 : 2147-2153.
- Marzouk Y., Goyal S.M. et C.P. Gerba (1980) Relationship of viruses and indicator bacteria in water and wastewater of Israël, *Water Res*, 14 : 1585-1590.
- Mc Cambridge J. et T. Mc Meekin (1981) Effect of solar radiation and predacious microorganisms on survival of fecal and other bacteria, *Appl Environ Microb*, 41 : 1083-1087.
- Medema G.J. Bahar M. et F.M. Schets (1997b) Survival of cryptosporidium parvum, *Escherichia coli*, faecal enterococci and clostridium perfringens in river water: influence of temperature and autochthonous microorganisms, *Water Sci Technol*, 35 (11-12) : 249-252.
- Medema G.J., Van Asperen I.A. et A. H. Havelaar (1997a) Assessment of the exposure of swimmers to microbiological contaminants in fresh waters, *Water Sci Technol*, 35 : 157-163.
- Melnick J. (1996) *Enteroviruses: Polioviruses, coxsackieviruses, echoviruses, and newer Enteroviruses* in: Fields BN, Knippe DM, Howley PM, et al, eds. *Fields virology*. 3rd ed. Philadelphia, Pennsylvania: Lippincott-Raven Publishers, 655-712.
- Melnick J.L. et C.P. Gerba (1980) Viruses in water and soil, *Public Health Reviews*, 9 : 185-213.
- Melo V.L., da Costa E., do Carmo M., de Paula S.V. et A.M. Coimbra (2002) Hepatitis a outbreak in a public school in Rio de Janeiro, Brazil, *Memorias Do Instituto Oswaldo Cruz*, 97 (3) : 301-305.
- Meng S.Q. et C.P. Gerba (1996) Comparative inactivation of enteric *Adenoviruses*, *Poliovirus* and coliphages by ultraviolet irradiation, *Water Res*, 30 : 2665-2668.

Menecier D., Nicand E., Grandadam M., Bronstein J.A., Thiolet C., Farret O., Buisson Y. et C. Molinie (2000) Subfulminant hepatitis E in France, *Gastroentero Clin Biol*, 24 (4) : 467-469.

Menon P., Becquevort S., Billen G. et P. Servais (1996) Kinetics of flagellate grazing in the presence of two types of bacterial prey, *Microbial Ecol*, 31 : 89-101.

Metcalf T.G. (1978) Indicators for viruses in natural water, in *Water Pollution Microbiology*, Vol2, Ed. Michel R. New-York : Wiley et Sons : 124-129.

Metcalf T.G., Melnick J.L. et M.K. Estes (1995) Environmental virology: from detection of virus in sewage and water by isolation to identification by molecular biology--a trip of over 50 years, *Ann Rev Microbiol*, 49 : 461-487.

Mezrioui N., Baleux B. et M. Troussellier (1995) A microcosm study of the survival of *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium* in brackish water, *Water Res*, 29 : 459-465.

Midthun K., Greenberg H.B., Kurtz J.B., Gary G.W., Lin F.Y., et A.Z. Kapikian (1993) Characterization and seroepidemiology of a type 5 *Astrovirus* associated with an outbreak of gastroenteritis in Marin County, California, *J Clin Microbiol*, 31 : 955-962.

Miller M.A. et L. McCann (2000) Policy analysis of the use of hepatitis B, *Haemophilus influenzae* type b, *Streptococcus pneumoniae*-conjugate and *Rotavirus* vaccines in national immunization schedules, *Health Econ*, 9 : 19-35.

Mills A.L., Herman J.S., Hornberger G.M. et T.H. DeJesus (1994) Effect of solution ionic strength and iron coatings on mineral grains on the sorption of bacterial cells to quartz sand, *Appl Environ Microb*, 60 (9) : 3300-3306.

Miossec L. et V. Vailland (2001) Epidémiologie des gastro-entérites virales associées à la consommation des coquillages, *Bull Soc Fr Microbiol*, 16 : 103-114.

Miossec L., Le Guyader F., Haugarreau L. et M. Pommepuy (2000) Magnitude of rainfall on viral contamination of the marine environment during gastroenteritis epidemics in human coastal population, *Rev Epidemiol Sante*, 48 (Suppl 2) : 62-71.

Monceyron C. et B. Grinde (1994) Detection of hepatitis A virus in clinical and environmental samples by immunomagnetic separation and PCR., *J Virol Methods*, 46 : 157-166.

Monfort P et B. Baleux (1994) Effects of environmental factors present in the St. Lawrence Estuary (Quebec, Canada) on experimental survival of *Salmonella salamae* as determined by flow cytometry, *Can J Microbiol*, 40, : 712-719.

Monpoeho S., Dehée A., Mignotte B., Schwartzbrod L., Marechal V., Nicolas J.C., Billaudel S. et V. Férré (2000) Quantification of *Enterovirus* RNA in sludge samples using single tube real-time RT-PCR, *BioTechniques*, 29 : 88-93.

Mooijman K.A., Bahar M., Contreras N. et A.H. Havelaar (2001) Optimisation of the ISO-method on enumeration of somatic coliphages (draft ISO 10705-2), *Water Sci Technol*, 43 : 205-208.

Moore R.S., Taylor D.H., Sturman L.S., Reddy M.M. et G.W. Fuhs (1981) *Poliovirus* adsorption by 34 minerals and soils, *Appl Environ Microb*, 42 (6) : 963-975.

Morace G., Aulicino F.A., Angelozzi C., Costanzo L., Donadio F. et M. Rapisetta (2002) Microbial quality of wastewater: detection of hepatitis A virus by reverse transcriptase-polymerase chain reaction, *J Appl Microbiol*, 92 (5) : 828-836.

Mori I., Matsumoto K., Hatano M., Sudo M. et Y. Kimura (1995) An unseasonable winter outbreak of *echovirus* type 30 meningitis., *J Infect*, 31 : 219-223.

Morinigo M.A., Wheeler D., Berry C., Jones C., Munoz M.A., Cornax R. et J.J. Borrego (1992) Evaluation of different bacteriophages groups as faecal indicators in contaminated natural waters in southern England, *Water Res*, 26 : 263-271.

Morris R. (1984) Reduction of naturally occurring *Enteroviruses* by wastewater treatment processes, *J Hyg Camb*, 92 : 97-103.

- Moulin F., Marc E., Lorrot M., Sauve-Martin H., Taty-Taty R., Lebon P., Raymond J., Brunet F. et D. Gendrel (2001) Hospitalisation pour gastroenterites aigües communautaires à *Rotavirus* chez l'enfant de 1997 à 2000 à Paris – BEH 48/2001.
- Mounts A.W., Ando T., Koopmans M., Bresee J.S., Noel J. et R.I. Glass (2000) Cold weather seasonality of gastroenteritis associated with Norwalk-like viruses, *J Infect Dis*, 181, (Suppl 2) : 284-287.
- Muniesa M., Lucena F. et J. Jofre (1999) Study of the potential relationship between the morphology of infectious somatic coliphages and their persistence in the environment, *J Appl Microbiol*, 87 : 402-409.
- Munro P.M. Gauthier M.J. et F.M. Laumond (1987) Changes in *Escherichia coli* cells starved in seawater or grown in seawater-wastewater mixtures, *Appl Environ Microb*, 53 : 1476-1481.
- Murray J.P. et G.A. Parks (1980) *Poliovirus* adsorption on oxide surfaces. Correspondence with the DLVO-Lifshitz theory of colloid stability, In: Kavanaugh, M.C., Leckie, J.O. (Eds.), *Particulates in Water, Characterization, Fate, Effects, and Removal*, American Chemical Society, Washington, DC, pp. 97– 133.
- Muscillo M., Carducci A., La Rosa G., Cantiani L. et C. Marianelli (1997) Enteric virus detection in adriatic seawater by cell culture, polymerase chain reaction and polyacrylamide gel electrophoresis, *Water Res*, 31 (8) : 1980-1984.
- Muscillo M., La Rosa G., Marianelli C., Zaniratti S., Capobianchi M R., Cantiani L. et A. Carducci (2001) A new RT-PCR method for the identification of *Reoviruses* in seawater samples, *Water Res*, 35 (2) :548-556.
- Naparsted J., Kawata K., Olivieri V.P. et V.R. Sherman (1976) Virus removal in an activated sludge plant, *Water Sewage Works*, 123 : 16-20.
- Nasser A.M. et S.D. Oman (1999) Quantitative assessment of inactivation of pathogenic and indicator viruses in natural water sources, *Water Res*, 33 : 1748-1752.
- Nestor J. et J. Brisou (1986) Public health impact of adsorption of *Enteroviruses* on ocean and river sediments, *Rev Epidemiol Sante*, 34 : 181-190.
- Nicand E., Grandadam M. et R. Teyssou (2001) Virus de l'hépatite E : caractéristiques virologiques et épidémiologiques, *Bull Soc Fr Microbiol*, 16 (2) : 121-125.
- Nicand E., Teyssou R. et Y. Buisson (1998) Le risque fécal viral en 1998, *Virologie*, 2 : 103-16.
- Nieuwstad T.J., Havelaar A.H. et M. Van Olphen (1991) Hydraulic and microbiological characterization of reactors for uv disinfection of secondary wastewater effluent, *Water Res.*, 25 : 775-784.
- Nieuwstad T.J., Mulder E.P., Havelaar A.H. et M. Van Olphen (1988) Elimination of microorganisms for wastewater by tertiary precipitation followed by filtration, *Water Res*, 22 : 1389-1397.
- Nilsson M., Sigstam G., Svensson L. (2000b) Antibody prevalence and specificity to group C *Rotavirus* in Swedish sera, *J Med Virol*, 60 : 210-215.
- Nilsson M., Svenungsson B., Hedlund K.O., Uhnöo L., Lagergren A., Akre T. et L. Svensson (2000a) Incidence and genetic diversity of group C *Rotavirus* among adults, *J Infect Dis*, 182 : 678-84.
- Niu M.T., Polish L.B., Robertson B.H., Khanna B.K., Woodruff B.A., Shapiro C.N., Miller M.A., Smith J.D., Gedrose J.K. et M.J. Alter (1992) Multistate outbreak of hepatitis A associated with frozen strawberries, *J Infect Dis*, 166 : 518-524.
- Noel J.S., Fankhauser R.L., Ando T., Monroe S.S. et R.I. Glass (1999) Identification of a distinct common strain of «Norwalk-like viruses» having a global distribution, *J Infect Dis*, 179 : 1334-1344.
- Noel J.S., Lee T.W., Kurtz J.B., Glass R.I. et S.S. Monroe (1995) Typing of human *Astroviruses* from clinical isolates by enzyme immunoassay and nucleotide sequencing, *J Clin Microbiol*, 33 : 797-801.
- Noel J.S., Ando T., Leite J.P., Green K.Y., Dingle K.E., Estes M.K., Seto Y., Monroe S.S. et R.I. Glass (1997) Correlation of patient immune responses with genetically characterized small round-structured viruses involved in outbreaks of nonbacterial acute gastroenteritis in the United States, 1990 to 1995, *J Med Virol*, 53 (4) : 372-383.

NSF/ANSI 55 (2002), American National Standard/NSF International Standard, Ultraviolet Microbiological Water Treatment Systems.

Nuanalsuwan S. et D.O. Cliver (2002) Pretreatment to avoid positive RT-PCR results with inactivated viruses, *J Virol Meth*, 104 (2) : 217-225.

O'Keefe B. et J. Green (1989) coliphages as indicators of faecal pollution at three recreational beaches on the firth of forth, *Water Res*, 23 : 1027-1030.

O'Donovan D., Cooke R.P., Joce R., Eastbury A., Waite J. et K. Stene-Johansen (2001) An outbreak of hepatitis A amongst injecting drug users, *Epidemiol Infect*, 127 (3) : 469-473.

Oghaki S., Ketrtanakul A. et V. Pratertosoni (1986a) Effect of sunlight on coliphages in oxidation pond, *Water Sci Technol*, 18 : 37-46.

Oghaki S., Ketrtanakul A., Suddevgrai S., Pratertosoni V. et O. Suthienkul (1986b) Adsorption of Coliphages to Particulates, *Water Sci Technol*, 18 : 267-275.

OMS (1994) Directives de qualité de l'eau de boisson, 2è ed., Vol. 1: Recommandations, Genève, pp. 8-30. (extrait disponible août 2002 sur le site http://www.who.int/water_sanitation_health/DQEB/microbiolog.htm)

Omura T., Onuma M., Aizawa J., Umita T. et Y. Yagi (1989) Removal efficiencies of indicator micro-organism in sewage treatment plants, *Water Sci Technol*, 18 : 267-275.

OORMM5873 (1996) Österreichisches Normungsinstitut, Vornorm: Anforderungen an Anlagen zur Desinfektion von Wasser mittels Ultraviolett-Strahlen.

Oostvogel P.M., Rumke H.C., Conyn-Van Spaendonck M.A., van der Avoort H.G., Leeuwenburg J. et A.M. van Loon (2001) *Poliovirus* circulation among schoolchildren during the early phase of the 1992-1993 poliomyelitis outbreak in The Netherlands, *J Infect Dis*, 184 (11) : 1451-1455.

Pallin R., Wyn-Jones A.P., Place B.M. et N.F. Lightfoot (1997) The detection of *Enterovirus* in large volume concentrates of recreational waters by the polymerase chain reaction, *J Virol Met*, 67 : 57-67.

Palmateer G.A., Dutka B.J., Janzen E.M., Meissner S.M. et M.G. Sakellaris (1991) Coliphage and bacteriophage as indicators of recreational water quality, *Water Res*, 25 : 355-357.

Palombo E.A. et R.F. Bishop (1996) Annual incidence, serotype distribution, and genetic diversity of human *Astrovirus* isolates from hospitalized children in Melbourne, Australia, *J Clin Microbiol*, 34 (7) : 1750-1753.

Pang X. L., Honma S., Nakata S. et T. Vesikari (2000) Human *Caliciviruses* in acute gastroenteritis of young children in the community, *J Infect Dis*, 181 (Suppl 2) : 288-294.

Papapetropoulou M. et A.C. Vantarakis (1998) Detection of Adenovirus outbreak at a municipal swimming pool by nested PCR amplification, *Journal of Infection*, 36 (1) : 101-103.

Patti A.M., Aulicino F.A., Santi A.L., Muscillo M., Orsini P., Bellucini C., La Rosa G., Mastroeni I. et L. Voltera (1996) Enteric virus pollution of tyrrhenian areas, *Water, Air and Soil pollut*, 88 : 261-267.

Payment P. (1990) fate of human enteric viruses, coliphages and clostridium perfringens during drinking water treatment, *Can J Microbiol*, 37: 154-157.

Payment P., Fortin S. et M. Trudel (1986) Elimination of human Enteric viruses during conventional wastewater treatment by activated sludge, *Can J Microbiol*, 32 : 922-925.

Payment P., Gerba C.P., Wallis C. et J.L. Melnick (1976) Methods for concentrating viruses from large volumes of estuarine water on pleated membrane filters, *Water Res*, 10 :893-896.

- Payment P., Ménard B. et M. Prévost (1997) Enteric viruses, Giardia and Cryptosporidium levels in the raw water of treatment plants along the St-Lawrence river, in : AWWA-WQTC Proceeding, Denver 9-12 Nov., 5 p.
- Payment P., Morin E. et M. Trudel (1988) Coliphages and enteric viruses in the particulate phase of river water, Can J Microbiol, 34 (7) : 907-910.
- Payment P., Trudel M. et R. Plante (1985) Elimination of viruses and indicator bacteria at each step of treatment during preparation of drinking water at seven water treatment plants, Appl Environ Microb, 49 : 1418-1428.
- Pelosi E., Lambden P.R., Caul E.O., Liu B., Dingle K., Deng Y. et I.N. Clarke (1999) The seroepidemiology of genogroup 1 and genogroup 2 Norwalk-like viruses in Italy, J Med Virol, 58 (1) : 93-99.
- Penrod S.L., Olson T.M. et S.B. Grant (1996) Deposition kinetics of two viruses in packed beds of quartz granular media, Langmuir, 12 : 5576-5587.
- Pereira H.G., Linhares A.C., Candeias J.A. et R.I. Glass (1993) National laboratory surveillance of viral agents of gastroenteritis in Brazil, Bulletin of the Pan American Health Organization, 27 : 224-233.
- Perez O.M., Morales W., Paniagua M. et O. Strannegard (1996) Prevalence of antibodies to hepatitis A, B, C and E viruses in a healthy population in Leon, Nicaragua. Am J Trop Med Hyg, 55 : 17-21.
- Petrovicova A., Simkova A. et J. Cervenka. (1988) Enteroviruses and coliphage in different water ecosystems, Z. gesamte Hyg., 34 : 522-523.
- Pianetti A., Baffone W., Citterio B., Casaroli A., Bruscolini F. et L. Salvaggio (2000) Presence of Enteroviruses and Reoviruses in the waters of the Italian coast of the Adriatic Sea, Epidemiol Infect, 125 (2) : 455-462.
- Pina S., Buti M., Jardí R., Clemente-Casares P., Jofre J. et R. Girones (2001) Genetic analysis of hepatitis A virus strains recovered from the environment and from patients with acute hepatitis, The Journal of General Virology, 82 (12) : 2955-2963.
- Pina S., Puig, M., Lucena F., Jofre J. et R. Girones (1998) Viral pollution in the environment and in shellfish : human Adenovirus detection by PCR as an index of human viruses, Appl Environ Microb, 64 : 3376-3382.
- Pinto R.M., Abad F.X., Gayardo R. et A. Bosh (1996) Detection of infectious Astroviruses in water, Appl Environ Microb, 62 : 3073-3077.
- Pompey M., Butin M., Derrien A., Gourmelon M. Colwell R.R. et M. Cormier (1996) Retention of enteropathogenicity by viable but nonculturable Escherichia coli exposed to seawater and sunlight, Appl Environ Microb, 62 : 4621-4626.
- Pompey M., Derrien A., Le Guyader F., Menard D., Caprais M.P., Dubois E., Dupray E. et M. Gourmelon (1995) Microbial water quality on a Caribbean island (Martinique) Small Islands : Marine Sciences and sustainable development coastal and estuarine studies, 51 : 284-297.
- Poortinga A.T., Bos R., Norde W. et H.J. Busscher (2002) Electric double layer interactions in bacterial adhesion to surfaces, Surf Sci Rep, 47 (1) : 1-32
- Prevot J., Dubrou S. et J. Marechal (1993) Detection of human hepatitis A virus in environmental water by an antigen-capture polymerase chain reaction method, Water Sci Technol, 27 : 227-234.
- Primrose S.B., Seeley N.D., Logan K.B. et J.W. Nicolson (1982) Methods for studying aquatic bacteriophage, Appl Environ Microb, 43 : 694-701.
- Prüss A. (1998) Review of epidemiological studies on health effects from exposure to recreational water, Int J Epidemiol, 27 : 1-9.
- Puig A., Jofre J. et R. Araujo (1997) Bacteriophages infecting various Bacteroides fragilis strains differ in their capacity to distinguish human from animal faecal pollution, Water Sci Technol, 35 : 359-362.

Puig A., Jofre J. et R. Araujo (1998) Use of oxyrase enzyme (Oxyrase®) for the detection of bacteriophages of *Bacteroides fragilis* in aerobic incubating conditions, J Microbiol Meth, 31 (3) : 205-207.

Puig A., Queralt N., Jofre J. et R. Araujo (1999) Diversity of *Bacteroides fragilis* strains in their capacity to recover phages from human and animal wastes and from fecally polluted wastewater, Appl Environ Microb, 65 : 1772-1776.

Puig M., Jofre, J. Lucena F., Allard A., Wadell G. et R. Girones (1994) Detection of *Adenoviruses* and *Enteroviruses* in polluted waters by nested PCR amplification, Appl Environ Microb, 60 : 2963-2970.

Puig M., Pina S., Lucena F., Jofre J. et R. Girones (2000b) Description of a DNA amplification procedure for the detection of bacteriophages of *Bacteroides fragilis* HSP40 in environmental samples, J Virol Methods, 89, (1-2) : 159-166.

Puig, M; Jofre, J; Girones, R (2000a) Detection of phages infecting *Bacteroides fragilis* HSP40 using a specific DNA probe, J Virol Methods, 88 (2) : 163-173.

Qin S.M. et C.P. Gerba (1996) Comparative inactivation of enteric *Adenoviruses*, *Poliovirus* and coliphages by ultraviolet irradiation, Water Res, 30 : 2665-2668.

Queiroz A.P., Santos F.M., Sassaroli A., Hársi C.M., Monezi T.A. et D.U. Mehnert (2001) Electropositive filter membrane as an alternative for the elimination of PCR inhibitors from sewage and water samples, Appl Environ Microb, 67 (10) : 4614-4618.

Quignon F. (1995) Etude en milieu hydrique de l'inactivation du *Poliovirus* 1 et de son adsorption sur argile et sur bio film, Thèse université de Nancy I, 165 p.

Quignon F. et L. Schwartzbrod (1995) Influence of salts and montmorillonite upon heat inactivation of *Poliovirus* in sterile water, Water Sci Technol, 31 (5-6) : 177-180.

Quignon F., Gantzer C., Kiéné L. et L. Schwartzbrod (1998) Potentiation of the virucidal activity of sterilized natural waters, Can J Microbiol, 44 (2) : 190-194.

Quignon F., Thomas F., Gantzer C., Huyard A. et L. Schwartzbrod (1998b) Virus adsorption in a complex system: an experimentally designed study, Water Res, 32 (4) : 1222-1230.

Rajala R.L. et H. Tanski (1998) Survival and transfer of faecal indicator organisms of wastewater effluents in receiving lake waters, Water Sci Technol, 38 : 191-194.

Ramachandran M., Das B.K., Vij A., Kumar R., Bhambal S.S., Kesari N., Rawat H., Bahl L., Thakur S., Woods P.A., Glass R.I., Bhan M.K. et J.R. Gentsch (1996) Unusual diversity of human *Rotavirus* G and P genotypes in India, J Clin Microbiol, 34 : 436-439.

Rao V.C., Lakhe S.B. et S.V. Waghmare (1981) Virus removal in waste stabilization ponds in India, Water Res, 15 : 773-778.

Rao V.C., Metcalf T.G. et J.L. Melnick (1986) Human viruses in sediments, sludges, and soils, W.H.O. Bull., 64 : 1-14.

Rao V.C., Seidel K.M., Goyal S.M., Metcalf T.G. et J.L. Melnick (1984) Isolation of *Enteroviruses* from water suspended solids and sediments from Galveston Bay : survival of *Poliovirus* and *Rotavirus* adsorbed to sediments, Appl Environ Microb, 48 : 404-409.

Regan P.M. et A.B. Margolin (1997) Development of a nucleic acid capture probe with reverse transcriptase-polymerase chain reaction to detect *Poliovirus* in groundwater, J Virol Methods, 64 : 65-72.

Reuter G., Farkas T., Berke T., Jiang, X. et G.S. Matson (2002) Molecular epidemiology of human *Calicivirus* gastroenteritis outbreaks in Hungary, 1998 to 2000, J Med Virol, 68 (3) : 390-398.

Rey J.L., Ramadani Q., Soarès J.L., Nicand E., Ibrahime D., Preteni E., Buisson Y. et R. Teyssou (2002) Sero-epidemiological study of the hepatitis epidemic in Mitrovica in the aftermath of the war in Kosovo (1999), Bull Soc Path Exo, 95 (1) : 3-7.

- Reynolds K.A., Gerba C.P. et I.L. Pepper (1996) Detection of infectious *Enteroviruses* by an integrated cell culture-PCR procedure, *Appl Environ Microb*, 62 : 1424-1427.
- Reynolds K.A., Gerba C.P., Abbaszadegan M. et L.L. Pepper (2001) ICC/PCR detection of *Enteroviruses* and hepatitis A virus in environmental samples, *Can J Microbiol*, 47 (2) : 153-157.
- Rhodes M.W. et H.I. Kator (1991) Use of *Salmonella* typhimurium WG49 to enumerate male-specific coliphages in an estuary and watershed subject to nonpoint pollution, *Water Res*, 25 : 1315-1324.
- Ricca D.M. et J.J. Cooney (1999) coliphages and indicator bacteria in Boston Harbor, Massachusetts, *Environ Toxicol*, 14 : 404-408.
- Rice T.D., Williams H.N. et B.F. Turng (1998) Susceptibility of Bacteria in Estuarine Environments to Autochthonous *Bdellovibrios*, *Microb Ecol*, 35 : 256-264.
- Rijnaarts H.H.M., Norde W., Lyklema J. et A.J.B. Zehnder (1999) DLVO and steric contributions to bacterial deposition in media of different ionic strengths, *Colloids Surface B*, 14 (1-4) : 179-195.
- Rosenblum L.S., Villarino M.E., Nainan O.V., Melish M.E., Hadler S.C., Pinsky P.P., Jarvis W.R., Ott C.E., et H.S. Margolis (1991) Hepatitis A outbreak in a neonatal intensive care unit: risk factors for transmission and evidence of prolonged viral excretion among preterm infants, *J Infect Dis*, 164 : 476-482.
- Rozen Y. et S. Belkin (2001) Survival of enteric bacteria in seawater, *FEMS Microbiol Rev*, 25 (5) : 513-529.
- Ryan J.N., Elimelech M., Ard R.A., Harvey R.W. et P.R. Johnson (1999) Bacteriophage PRD1 and silica colloid transport and recovery in an iron oxide-coated sand aquifer, *Environ Sci Technol*, 33 : 63- 73.
- Santos N., Lima R.C., Nozawa C.M., Linhares R.E. et V. Gouvea (1999) Detection of porcine *Rotavirus* type G9 and of a mixture of types G1 and G5 associated with Wa-like VP4 specificity: evidence for natural human-porcine genetic reassortment, *J Clin Microbiol*, 37 : 2734-2736.
- Santos N., Lima R.C., Pereira C.F. et V. Gouvea (1998) Detection of *Rotavirus* types G8 and G10 among Brazilian children with diarrhea, *J Clin Microbiol*, 36 : 2727-2729.
- Scarlatti G., Leitner T., Halapi E., Wahlberg J., Marchisio P., Clerici-Schoeller M.A., Wigzell H., Fenyo E.M., Albert J., Uhlen M. et P. Rossi (1993) Comparison of variable region 3 sequences of human immuno-deficiency virus type 1 from infected children with the RNA and DNA sequences of the virus population of their mothers, *Proc. Natl. Acad. Sci*, 90 : 1721-1725.
- Scarpino P.B. (1975) Human Enteric Viruses and Bacteriophages as Indicators of Sewage Pollution, In: *Discharge of Sewage From Sea Outfalls*, Ed. Gameson, A.L.H. Pub. Pergamon Press, Oxford : 49p.
- Schaiberger G.E., Edmond T.D. et C.P. Gerba (1982) Distribution of *Enteroviruses* in sediments contiguous with a deep marine sewage outfall, *Water Res*, 16 : 1425-1428.
- Schaper M. et J. Jofre (2000) Comparison of methods for detecting genotypes of F-specific RNA bacteriophages and fingerprinting the origin of faecal pollution in water samples, *J Virol Methods*, 89 : 1-10.
- Schaper M., Jofre J., Uys M. et W.O.K. Grabow (2002) Distribution of genotypes of F-specific RNA bacteriophages in human and non-human sources of faecal pollution in South Africa and Spain, *J Appl Microbiol*, 92 : 657-667.
- Scheuerman P.R., Schmidt J.P. et M. Alexander (1988) Factors affecting the survival and growth of bacteria introduced into lake water, *Archives of Microbiology*, 150 (4) : 320-325.
- Schiff G.M., Stefanovic G., Young B. et J.K. Pennekamps (1984) Minimum human infective dose of enteric virus (*Echovirus* 12) in drinking water, *Monogr Virol*, 15 : 222-228.
- Schijven J.F. et S.M. Hassanizadeh (2000) Removal of Viruses by Soil Passage: Overview of Modeling, Processes, and Parameters, *Crit Rev Env Sci Tec*, 30 (1) : 49-127.

- Schijven J.F., Hoogenboezem W., Nobel P.J., Medema G.J. et A. Stakelbeek (1998) Reduction of FRNA-bacteriophages and faecal indicator bacteria by dune infiltration and estimation of sticking efficiencies, *Water Sci Technol*, 38 (12) : 127-131.
- Schlauder G.G., Desai S.M., Zanetti A.R., Tassopoulos N.C., Mushahwar I.K. (1999) Novel hepatitis E virus (HEV) isolates from Europe : evidence for additional genotypes of HEV, *J Med Virol*, 57 : 243-251.
- Schlauder G.G., Erker J.C., Kwo P.Y., Knigge M.F., Smally D.L., Rosenblatt J.E., Desai S.M. et I.K. Mushahwar (1998) The sequence and phylogenetic analysis of a novel hepatitis E virus isolated from a patient with acute hepatitis reported in the United States, *J Gen Virol*, 79 : 447-456.
- Schvoerer E., Bonnet F., Dubois V., Cazaux G., Serceau R., Fleury H.J. et M.E. Lafon (2000) PCR detection of human enteric viruses in bathing areas, waste waters and human stools in Southwestern France, *Res Microbiol*, 151 (8) : 693-701.
- Schvoerer E., Ventura M., Dubos O., Cazaux G., Serceau R., Gournier N., Dubois V., Caminade P., Fleury H.J.A. et M.E. Lafon (2001) Qualitative and quantitative molecular detection of *Enteroviruses* in water from bathing areas and from a sewage treatment plant, *Res Microbiol*, 152 : 179-186.
- Schwab K.J., De Leon R. et M.D. Sobsey (1996) Immunoaffinity concentration and purification of waterborne enteric viruses for detection by reverse transcriptase PCR, *Appl Environ Microb*, 62 : 2086-2094.
- Schwartz K., Hansen-Gagge T. et C. Bertram (1990) Improved yields of long PCR products using gene 32 protein, *Nucleic Acids Res.*, 18 :1079.
- Schwartzbrod J., Mathieu C., Thevenot M.T., Baradel J.M. et L. Schwartzbrod (1987) Wastewater sludge : parasitological and virological contamination, *Water Sci Technol*, 19 : 33-40.
- Schwartzbrod L et A Bosch (1991) Principes généraux de mise en évidence des virus du milieu hydrique in "Virologie des milieux hydriques". Schwartzbrod L. ed. Tec. et Doc. Lavoisier, Paris.
- Schwartzbrod L. et C. Gantzer (1996) virus - eau - produits végétaux et coquillages, *Actualités en microbiologie des aliments*, Coll. Soc. Microbiol./Alim., 10: 113-117.
- Schwartzbrod L., Bennani A., De Laverne E. et J. Schwartzbrod (1983) Détection des *Rotavirus* dans les eaux usées par immuno-enzymologie, *Rev. Fr. Sciences Eau*, 2 : 145-152.
- Schwartzbrod L., Finance C., Aymard M., Brigaud M. et F. Lucena (1985a) Recovery of *Reovirus* from tapwater, *Zbl Hyg I. Abt. Orig.*, 181 : 383-389.
- Schwartzbrod L., Vilagines P., Schwartzbrod J., Sarette B., Vilagines R. et J. Collomb (1985b) Evaluation of the viral population in two waste water treatment plants. Study of different sampling techniques, *Water Res*, 19 : 1353-1356.
- Sekla L. Stackiw W., Kay C. et L. Van Buckenhout (1980) Enteric viruses in renovated water in Manitoba, *Can J Microbiol*, 26 : 518-523.
- Sellwood J., Dadswell J.V. et J.S. Slade (1981) Viruses in sewage as an indicator of their presence in the community, *The Journal of Hygiene*, 86 : 217-225.
- Sen A., Kobayashi N., Das S., Krishnan T., Bhattacharya S.K., Urasawa S. et T.N. Naik (2000) Amplification of various genes of human group B *Rotavirus* from stool specimens by RT-PCR, *J Clin Virol*, 17 : 177-181.
- Servais P., Billen G. et J. Vives-Rego (1985) Rate of bacterial mortality in aquatic environments, *Appl Environ Microb*, 49 : 1448-1454.
- Shan S., Desslberger U. et T.A. Mckee (1997) The development of an antigen capture polymerase chain reaction assay to detect and type human *Enteroviruses*, *J Virol Methods*, 65 : 139-144.
- Shapiro C.N., Coleman P.J., McQuillan G.M., Alter M.J. et H.S. Margolis (1992) Epidemiology of hepatitis A: seroepidemiology and risk groups in the USA, *Vaccine*, 10 (Suppl. 1) : 59-62.

- Shastri S., Doane A.M., Gonzales J., Upadhyayula U. et D.M. Bass (1998) Prevalence of *Astroviruses* in a children's hospital. *J Clin Microbiol*, 36 : 2571-2574.
- Sherman V.R., Kawata K., Olivieri V.P. et J.D. Napasted (1975) Virus removal in trickling filter plants, *Water Sewage Works*, 122 : 36-44.
- Shieh Y.S., Baric R.S. et M.D. Sobsey (1997) Detection of low levels of enteric viruses in metropolitan and airplane sewage, *Appl Environ Microb*, 63 : 4401-4407.
- Shieh Y.S., Wait D., Tai L. et M.D. Sobsey (1995) Methods to remove inhibitors in sewage and other fecal wastes for *Enterovirus* detection by the polymerase chain reaction, *J Virol Methods*, 54 (1) : 51-66.
- Shimohara E., Sugishima S. et M. Kaneko (1984) Virus removal by activated sludge treatment, *Water Sci Technol*, 17 : 153-158.
- Sibille I., Sime-Ngando T., Mathieu L. et J.C. Block (1998) Protozoan bacterivory and *Escherichia coli* survival in drinking water distribution systems, *Appl Environ Microb*, 64 (1) : 197-202.
- Simkova A. et J. Cervenka (1981) Coliphages as ecological indicators of *Enteroviruses* in various water systems, *Bull. WHO*, 59 : 611-618.
- Sinton L.W., Hall C.H., Lynch P.A. et R.J. Davies-Colley (2002) Sunlight inactivation of fecal indicator bacteria and bacteriophages from waste stabilization pond effluent in fresh and saline waters, *Appl Environ Microb*, 68 (3) : 1122-1131.
- Skraber S., Gantzer C., Maul A. et L. Schwartzbrod L. (2002) Fate of bacteriophages and bacterial indicators in river water, *Water Res*, 36 : 3621-3629.
- Slade J.S. (1984) Viruses and bacteria in a chalk well, *Water Sci Technol*, 17 : 111-121.
- Sobsey M.D. et A.R. Hickey (1985) Effects of humic and fulvic acids on *Poliovirus* concentration from water by microporous filtration, *Appl Environ Microb*, 49 (2) : Pages 259-264.
- Sobsey M.D., Amanti A. et T.R. Handzel (1995) Detection and occurrence of coliphage indicator viruses in water, water quality technology conference, nov12-16 : 2087-2097.
- Sobsey M.D., Battigelli D.A., Shin G.A. et S. Newland (1998) RT-PCR amplification detects inactivated viruses in water and wastewater, *Water Sci Technol*, 38 : 91-94.
- Sobsey M.D., Dean C.H., Knuckles M.E. et R.A. Wagner (1980) Interactions and survival of enteric viruses in soil materials, *Appl Environ Microb*, 40 : 92-101.
- Sobsey M.D., Fuji T. et P.A. Schields (1988) Inactivation of hepatitis A virus and model viruses in water by free chlorine and monochloramine, *Water Sci Technol*, 20 : 385-391.
- Sommer R., Cabaj A., Sandu T. et M. Lhotsky (1999) Measurement of UV radiation using suspensions of microorganisms, *Journal of Photochemistry and Photobiology. B, Biology*, 53 (1-3) : 1-6.
- Sommer R., Cabaj A., Schoenen D., Gebel J., Kolch A., Havelaar A.H. et F.M. Schets (1995) Comparison of three laboratory devices for UV-inactivation of microorganisms, *Water Sci Technol*, 31 (5-6) : 147-156.
- Sommer R., Haider T., Cabaj A., Pribil W. et M. Lhotsky (1998) Time dose reciprocity in UV disinfection of water, *Water Sci Technol*, 38 (12) : 145-150.
- Sommer R., Pribil W., Appelt S., Gehringer P., Eschweiler H., Leth H., Cabaj A. et T. Haider (2001) Inactivation of bacteriophages in water by means of non-ionizing (UV-253.7 nm) and ionizing (gamma) radiation: a comparative approach, *Water Res*, 35 (13) : 3109-3116.
- Sommer R., Weber G., Cabaj A., Wekerle J., Keckand G. et G. Schauburger (1989) UV-inactivation of microorganisms in water, *Intern. J hyg Environ Med*, 189 : 214-224.

Soule H., Genoulaz O., Gratacap-Cavallier B., Chevallier P., Liu J.X. et J.M. Seigneurin (2000) Ultrafiltration and reverse transcription-polymerase chain reaction: an efficient process for *Poliovirus*, *Rotavirus* and hepatitis A virus detection in water, *Water Res*, 34 (3) : 1063-1067.

Spinner M.L. et G.D. Di Giovanni (2001) Detection and identification of mammalian *Reoviruses* in surface water by combined cell culture and reverse transcription-PCR, *Appl Environ Microb*, 67 (7) : 3016-3020.

Stanek J.E. et J.O. Falkinham (2001) Rapid coliphage detection assay, *J Virol Methods*, 91 (1) : 93-98.

Stene-Johansen K., Jenum P.A., Hoel T., Blystad H., Sunde H. et K. Skaug (2002) An outbreak of hepatitis A among homosexuals linked to a family outbreak, *Epidemiol Infect*, 129 (1) : 113-117.

Stetler R.E., Ward R.L. et S.C. Waltrip (1983) Enteric virus and indicator bacteria levels in water treatment system modified to reduce trihalomethane production, *Appl Environ Microb*, 47 : 319-324.

Straub T.M., Pepper I.L. et C.P. Gerba (1994) Detection of naturally occurring *Enteroviruses* and hepatitis A virus in undigested and anaerobically digested sludge using PCR., *Can J Microbiol*, 40 : 884-888.

Straub T.M., Pepper I.L. et C.P. Gerba (1995) Removal of PCR inhibiting substances in sewage sludge amended soil, *Water Sci Technol*, 31 : 311-315.

Straub T.M., Pepper I.L., Abbaszadegan M. et C.P. Gerba (1994) A method to detect *Enteroviruses* in sewage sludge-amended soils, *Appl Environ Microb*, 60 : 1014-1017.

Subekti D.S., Tjaniadi P., Lesmana M., Simanjuntak C., Komalarini S., Digdowirogo H., Setiawan B., Corwin A.L., Campbell J.R., Porter K.R. et B.A. Oyofo (2002) Characterization of Norwalk-like virus associated with gastroenteritis in Indonesia, *J Med Virol*, 67 (2) : 253-258.

Sugieda M., Nagaoka H., Kakishima Y., Ohshita T., Nakamura S. et S. Nakajima (1998) Detection of Norwalklike virus genes in the caecum contents of pigs, *Arch Virol*, 143 : 1215-1221.

Sundkvist T., Hamilton G.R., Hourihan B.M. et I.J. Hart (2000) Outbreak of hepatitis A spread by contaminated drinking glasses in a public house, *Communicable Disease and Public Health / PHLS*, 3 (1) : 60-62.

Suttle C.A. et F. Chen (1992) Mechanisms and rates of decay of marine viruses in seawater, *Appl Environ Microb*, 58 : 3721-3729.

Syriopoulou V., Hadjichristodoulou C., Daikos G., Pirounaki M., Chatzicou V., Pavlopoulou I., Anagnostakou M., Theodoridou M. et H. Dellagrammaticas (2002) Clinical and epidemiological aspects of an *Enterovirus* outbreak in a neonatal unit, *J Hosp Infect*, 51 (4) : 275-280.

Tabassum S., Shears P et C.A. Hart (1994) Genomic characterization of *Rotavirus* strains obtained from hospitalized children with diarrhoea in Bangladesh, *J Med Virol*, 43 : 50-56.

Talal A.H., Moe C.L., Lima A.A., Weigle K.A., Barrett L., Bangdiwala S.I., Estes M.K. et R.L. Guerrant (2000) Seroprevalence and seroincidence of Norwalk-like virus infection among Brazilian infants and children, *J Med Virol*, 61 (1) : 117-124.

Tani N., Dohi Y., Kurumatani N. et K. Yonemasu (1995) Seasonal distribution of *Adenoviruses*, *Enteroviruses* and *Reoviruses* in urban river water, *Microbiol Immunol*, 39 : 577-580.

Tansuphasiri U., Vathanophas K., Pariyanonda A., Kittigul L., Utrarachkij F., Diraphat P., Siripanichgon K., Punchitton S. et K. Chitpirom K. (2000) Rapid detection of *Polioviruses* in environmental water samples by one-step duplex RT-PCR, *The Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health*, 31 (1) : 47-56.

Tartera (1986) Estudi dels bacteriòfags de *Bacteroides fragilis* com a indicadors de la contaminació fecal vírica, *Thèse de recherche*, Barcelone, 190 p.

Tartera C. et J. Jofre (1987) Bacteriophages active against *Bacteroides fragilis* in sewage-polluted waters, *Appl Environ Microb*, 53 : 1632-1637.

- Tartera C., Bosch A. et J. Jofre (1988) The inactivation of bacteriophages infecting *Bacteroides fragilis* by chlorine treatment and UV-irradiation, FEMS Microbiol. Lett., 56 : 313-316.
- Tartera C., Lucena F. et J. Jofre (1989) Human origin of *Bacteroides fragilis* bactériophages present in the environment, Appl Environ Microb, 55 : 2696-2701.
- Taylor D.H., Moore R.S et L.S. Sturman (1981) Influence of pH and electrolyte composition on adsorption of *Poliovirus* by soils and minerals, Appl Environ Microb, 42 : 976– 984.
- Taylor J.M. (1982) Viruses in fresh and saline waters. In "Viruses and disinfection of water and wastewater", Butler Ed. University of Surrey, Surrey Press. Surrey, U.K.
- Taylor M.B., Cox N., Vrey M.A. et W.O.K Grabow (2001) The occurrence of hepatitis A and *Astroviruses* in selected river and dam waters in South Africa, Water Res, 35 (11) : 2653-2660.
- Taylor M.B., Grabow W.O.K. et W.D. Cubitt (1997b) Propagation of human *Astrovirus* in the PLC/PRF/5 hepatoma cell line, J Virol Methods, 67 (1) : 13-18.
- Taylor M.B., Marx F.E. et W.O.K. Grabow (1997a) *Rotavirus*, *Astrovirus* and *Adenovirus* associated with an outbreak of gastroenteritis in a South African child care centre, Epidemiol Infect, 119 (2) : 227-230.
- Thélot B. et A. Bourrillon (1996) Coincidences of public transport strike with bronchiolitis epidemic, Lancet, 348 :1743-1744.
- Thurston J.A., Gerba C.P., Foster K.E. et M.M. Karpiscak (2001) Fate of indicator microorganisms, giardia and cryptosporidium in subsurface flow constructed wetlands, Water Res, 35 (6) : 1547-1551.
- Todo, T., Takemori H., Ryo H., Ihara M., Matsunaga O., Nikaido O., Sato K., et T. Nomura (1993) A new photoreactivating enzyme that specifically repairs ultraviolet light-induced (6-4) photoproducts, Nature, 361 : 371-374.
- Traoré O., Belliot G., Mollat C., Piloquet H., Chamoux C., Laveran H., Monroe S.S. et S Billaudel (2000) RT-PCR identification and typing of *Astroviruses* and Norwalk-like viruses in hospitalized patients with gastroenteritis: evidence of nosocomial infections, J Clin Virol, 17 (3) : 151-158.
- Tree J.A., Adams M.R. et D.N. Lees (1997) virus inactivation during disinfection of wastewater by chlorination and UV irradiation and the efficacy of F+ bacteriophage as a 'viral indicator', Water Sci Technol, 35 (11-12) : 227-232.
- Troussellier M., Bonnefont J.L., Courties C., Derrien A., Dupray E., Gauthier M., Gourmelon M., Joux F., Lebaron P., Martin Y. et M. Pommepuy (1998) Responses of enteric bacteria to environmental stresses in seawater, Oceanologica Acta, 21 (6) : 965-981.
- Tsai Y.L. et B.H. Olson (1992) Rapid method for separation of bacterial DNA from humic substances in sediments for polymerase chain reaction, Appl Environ Microb, 58 : 2292-2295.
- Turner M., Istre G.R., Beauchamp H., Baum M. et S. Arnold (1987) Community outbreak of *Adenovirus* type 7a infections associated with a swimming pool, Southern Med J, 80 : 712–715.
- Turner S.J. et G.D. Lewis (1995) Comparison of F-specific bacteriophage, enterococci, and faecal coliform densities through a wastewater treatment process employing oxidation ponds, Water Sci Technol, 31 (5-6) : 85-89.
- Tyler J.M. (1982) Virus in fresh and saline waters, In "Viruses and disinfection of water and wastewater", BUTLER M., ed. University of Surrey Press. Surrey, U.K.
- Vainio K., Stene-Johansen K., Øystein J.T., Bruu A L. et B. Grinde (2001) Molecular epidemiology of *Calicivirus* infections in Norway, J Med Virol, 65 (2) : 309-314.
- Valente F., Otten M., Balbina F., Van de Weerd R., Chezzi C., Eriki P., Van-Dúnne J. et J.M. Bele (2000) Massive outbreak of poliomyelitis caused by type-3 wild *Poliovirus* in Angola in 1999, Bulletin of the World Health Organization, 78 (3) : 339-346.

Van Asperen I.A., Medema G., Borgdorff M.W., Sprenger M.J.W. et A.H. Havelaar (1998) Risk of gastroenteritis among triathletes in relation to faecal pollution of fresh waters, *Int J Epidemiol*, 27 : 309-315.

Van Olphen M., De Bruin H.A.M., Havelaar A.H. et J.F. Schijven (1991) The virological quality of recreational waters in the Netherlands, *Water Sci Technol*, 24 : 209-212.

Van Regenmortel M.H.V., Fauquet C.M., Bishop D.H.L., Carstens E.B., Estes M.K., Lemon S.M., Maniloff J., Mayo M.A., McGeoch D.J., Pringle C.R. et R.B. Wickner (2000) *Virus Taxonomy: The Classification and Nomenclature of Viruses*. The Seventh Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses, Academic Press, San Diego, 1167pp.

Vandevivere P., Baveye P., de Lozada D.S. et P. DeLeo (1995) Microbial clogging of saturated soils and aquifer materials : evaluation of mathematical models, *Water Resour Res*, 31 (9) : 2173-2180.

Vilagines Ph., Sarrette B., Le Guyader M., Cun C. et R. Vilagines (1997) Relationship between cultivable viruses, F-specific RNA phages and the principal fecal bacterial indicators in raw waters, treated wastewaters and surface water, *Eur J Water Qual*, 28 : 201-222.

Villar L.M., Esteves da Costa M.C., de Paula V.S., Gaspar A.M. et Coimbra J. (2002) Hepatitis a outbreak in a public school in Rio de Janeiro, Brazil, *Memorias Do Instituto Oswaldo Cruz*, 97 (3) : 301-305.

Vinje J., Altena S.A. et M.P. Koopmans (1997) The incidence and genetic variability of small round-structured viruses in outbreaks of gastroenteritis in The Netherlands, *J Infect Dis*, 176 (5) : 1374-1378.

Vipond I.B., Pelosi E., Williams J., Ashley C.R., Lambden P.R., Clarke I.N. et E.O. Caul (2000) A diagnostic EIA for detection of the prevalent SRSV strain in United Kingdom outbreaks of gastroenteritis, *J Med Virol*, 61 (1) : 132-137.

Vivier J.C., Clay C.G. et W.O.K. Grabow (2001) Detection and rapid differentiation of human *Enteroviruses* in water sources by restriction enzyme analysis, *Water Sci Technol*, 43 : 209-212.

Vivier J.C., Ehlers M.M. et W.O.K. Grabow (2002) Detection of *Enteroviruses* in treated drinking water, *Water Res*, in press.

Wada M. (1993) Relationship between water pollution and bacterial flora in river water, *Japanese Journal of Hygiene*, 48 (3) : 707-720.

Wait D.A. et M.D. Sobsey (2001) Comparative survival of enteric viruses and bacteria in Atlantic Ocean seawater, *Water Sci Technol*, 43 (12) : 139-142.

Walter R., Macht W., Durkop J., Hecht R., Hornig U. et P. Schulze (1989) Virus levels in river waters, *Water Res*, 23 : 133-138.

Ward R.L. (1981) Evidence that micro-organisms cause inactivation of virus in activated sludge, *Appl. Environ. Microbiol.*, 43 : 1221-1224.

Ward R.L. et C.S. Ashley (1980) Effects of wastewater sludge and its detergents on the stability of *Rotavirus*, *Appl Environ Microbiol*, 39 : 1154-1158.

Ward R.L., Bernstein D.I., Young E.C., Sherwood J.R., Knowlton D.R. et G.M. Schiff (1986) Human *Rotavirus* studies in volunteers : determination of infectious dose and serological response to infection, *J Infect Dis*, 154 : 871-880.

Weinbauer M.G., Wilhelm S.W., Suttle C.A. et D.R. Garza (1997) Photoreactivation compensates for UV damage and restores infectivity to natural marine virus communities, *Appl Environ Microb*, 63 (6) : 2200-2205.

Weinbauer M.G., Wilhelm S.W., Suttle C.A., Pledger R.J. et D.L. Mitchell (1999) Sunlight induced DNA damage and resistance in natural viral communities, *Aquat Microb Ecol*, 17 : 111-120.

Wentzel R.S., O'Neill P.E. et J.F. Kitchens (1982) Evaluation of coliphage detection as a rapid indicator of water quality, *Appl Environ Microb*, 43 : 430-434.

- White P.A., Hansman G.S., Li A., Dable J., Isaacs M., Ferson M., McIver C.J. et W.D. Rawlinson (2002) Norwalk-like virus 95/96-US strain is a major cause of gastroenteritis outbreaks in Australia, *J Med Virol*, 68 (1) : 113-118.
- WHO (1999), Health-based monitoring of recreational waters: the feasibility of a new approach (the 'annapolis protocol'), disponible sur le site : www.who.int/water_sanitation_health/Recreational_water/Annapolis.pdf
- WHO (2000) Hepatitis A, WHO/CDS/CSR/EDC/2000.7, disponible sur le site <http://www.who.int/emc-documents/>
- Wiedenmann A., Fischer B., Straub U., Wang C.H., Flehmig B. et D. Schoenen (1993) Disinfection of hepatitis A virus and MS2 coliphage in water by ultraviolet irradiation : comparison of U.V. susceptibility, *Water Sci Technol*, 27 : 335-338.
- Wiggins B.A. et M. Alexander (1985) Minimum bacterial density for bacteriophage replication: implications for significance of bacteriophages in natural ecosystems, *Appl Environ Microb*, 49 : 19-23.
- Wilkinson J., Jenkins A., Wyer M. et D. Kay (1995) Modelling faecal coliform dynamics in streams and rivers, *Water Res*, 29 : 847-855.
- Wilkinson M.H. (2001) Predation in the presence of decoys : an inhibitory factor on pathogen control by bacteriophages or bdellovibrios in dense and diverse ecosystems, *J Theor Biol*, 208 : 27-36.
- Wilson I.G. (1997) Minireview: Inhibition and facilitation of nucleic acid amplification, *Appl Environ Microb*, 63 : 3741-3751.
- Wommack K.E., Hill R.T., Muller T.A. et R.R. Colwell (1996) Effects of sunlight on bacteriophage viability and structure, *Appl Environ Microb*, 62 : 1336-1341.
- Wood D.J. et B. Hull (1999) L20B cells simplify culture of *Polioviruses* from clinical samples, *J Med Virol*, 58 (2) : 188-192.
- Woody M.A. et D.O. Cliver (1995) Effects of temperature and host cell growth phase on replication of F-specific RNA coliphage Q β , *Appl Environ Microb*, 61 : 1520-1526.
- Worm H.C., Wim H.M. van der Poel et G. Brandstätter (2002) Hepatitis E: an overview, *Microbes and Infection*, 4 (6) : 657-666.
- Yanko W.A., Jackson J.L., Williams F.P., Walker A.S. et M.S. Castillo (1999) An unexpected temporal pattern of coliphage isolation in groundwaters sampled from wells at varied distances from reclaimed water recharge sites, *Water Res*, 33 : 53-64.
- Yates M.V. et C.P. Gerba (1998) Microbial Considerations in Wastewater Reclamation and Reuse, In: Asano T (ed.) *Wastewater Reclamation and Reuse*. Lancaster, Pennsylvania, Technomic Publishing Company, p. 437-488.
- Yates M.V., Citek R.W., Kamper M.F. et A.M. Salazar (1999) Detecting *Enteroviruses* in water : comparing infectivity, molecular and combination methods, Intern. Symposium Wat. Path. AWWA, Août 1999.
- Yokoi H., Kitahashi T., Tanaka T. et E. Utagawa (2001) Detection of *Astrovirus* RNA from sewage works, seawater and native oysters samples in Chiba City, Japan using reverse transcription-polymerase chain reaction, *Kansenshogaku Zasshi. The Journal of the Japanese Association for Infectious Diseases*, 75 (4) : 263-269.
- Zaïss U. (1981) Dispersal and fate of coliphages in the River Saar, *Zbl Bakt, Mikrobiologie und Hygiene*, 174 : 160-173.
- Zaïss U. et H.H. Hennies (1988) Quantitative determinations of the elimination of coliphages and other fecal indicators during wastewater treatment, *Zbl Hyg B.*, 186 : 512-525.
- Zdrazilek J., Drasnar M., Hlavova H., Jadrnickova E., Jandazek L., Kasova V., Koza J., Matyasova L., Uvizl M., Walihrach J. et J. Weigendova (1982) Presence of *Polioviruses* and other enteral viruses in sewage : a survey in the CZECH Socialist republic 1969-1976, *J Hyg Epid Microbiol Immunol*, 26 : 1-14.
- Zerda K.S., Gerba C.P., Hou K.C. et S.M. Goyal (1985) Adsorption of viruses to charge-modified silica, *Appl Environ Microb*, 49 (1) : 91-95.

Zhang C., Li P. et Z. Wang (1984) A preliminary study of the virus contamination in tapwater, *J Environ Sci*, 5 : 29-33.

Zmirou D., Ferley J.P., Collin J.F., Charrel M. et J. Berlin (1987) A follow-up study of gastro-intestinal diseases related to bacteriologically substandard drinking water, *Am J Public Health*, 77 : 582-584.

Zmirou D., Rey S., Courtois X., Ferley J.P., Blatier J.F., Chevalier P., Boudot J., Potelon J.L. et R. Mounir (1995) Residual microbiological risk after simple chlorine treatment of drinking ground water in small community systems, *Eur J Public Health*, 5 : 75-81.

ANNEXES

Annexe 1 : Étude bibliographique sur les indicateurs bactériens et phagiques dans le milieu hydrique

Annexe 2 : Composition des milieux utilisés pour la recherche des bactériophages et mode de conservation des souches hôtes et des bactériophages témoins

Annexe 3 : Influence des radiations UV sur 6 microorganismes indicateurs

Annexe 4 : Influence de différents traitements d'épuration sur 6 microorganismes dans les eaux usées brutes de Nancy et Épinal

Annexe 5 : Évolution des concentrations de 6 microorganismes dans l'eau de la rivière Moselle en fonction de la date et du site de prélèvement

Annexe 6 : Survie des coliformes thermotolérants et des coliphages somatiques en eau de rivière en fonction de la température et de la saison de prélèvement

Annexe 6 bis : Paramètres physico-chimiques de l'eau de rivière en fonction de la saison de prélèvement

Annexe 7 : Survie des coliformes thermotolérants et des coliphages somatiques dans l'eau de rivière pure ou diluée avec du PBS

Annexe 8 : Concentrations en coliformes thermotolérants, coliphages somatiques et présence de génome viral (*entérovirus* et *Norwalk-like virus*) dans l'eau de la rivière Moselle en fonction de la date et du site de prélèvement

ANNEXE 1

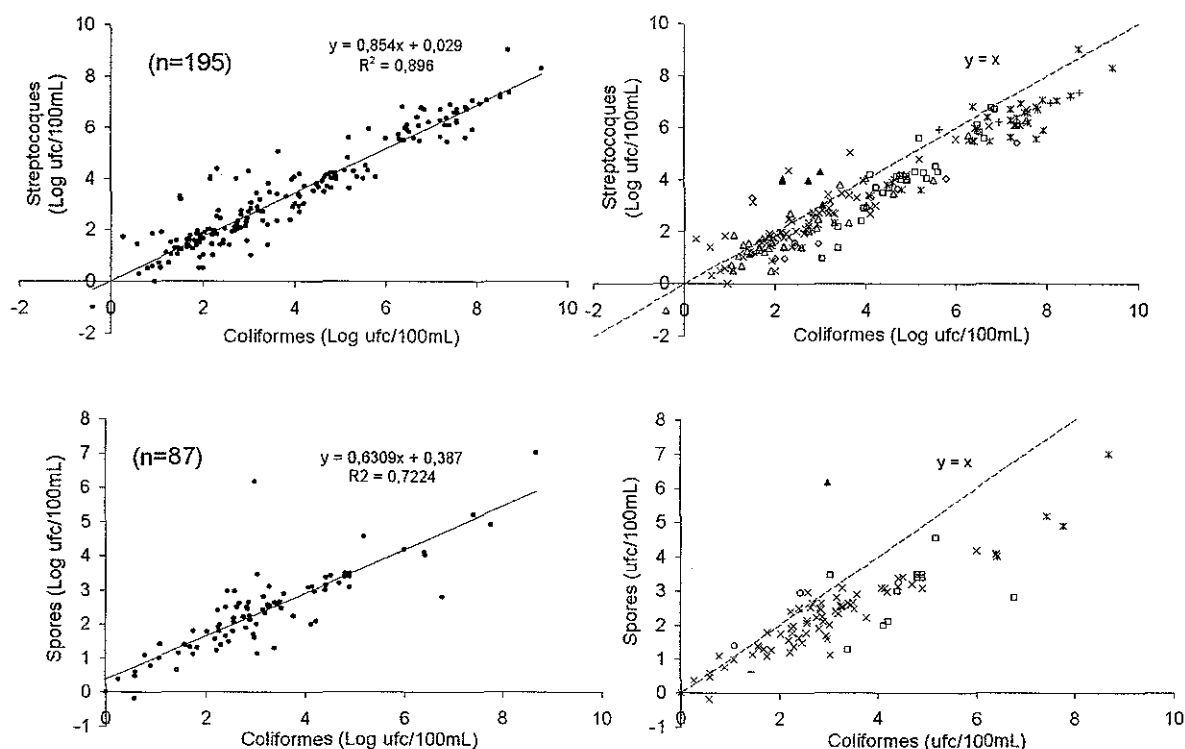
Étude bibliographique sur les indicateurs bactériens et phagiques dans le milieu hydrique

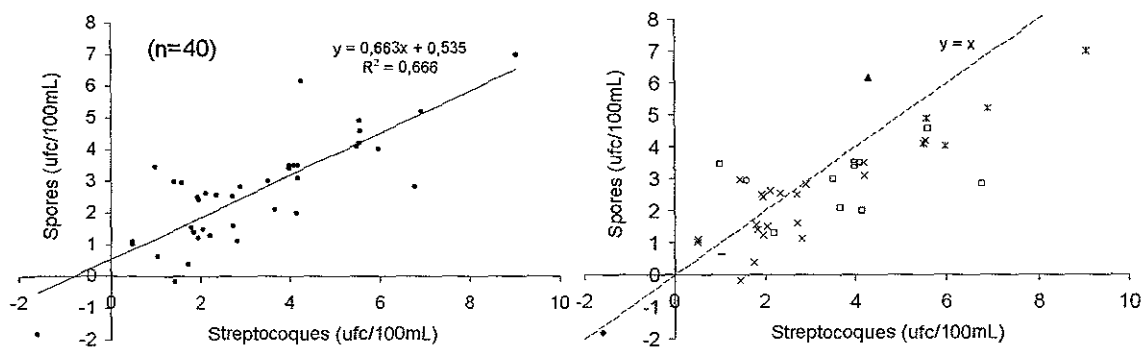
Tous les résultats sont présentés sous forme graphique. Les concentrations en microorganismes sont comparées deux à deux afin de déterminer les corrélations éventuelles. Pour chaque comparaison, deux graphiques sont présentés. Le graphique de gauche présente l'ensemble des points ainsi que la droite de régression linéaire qui leur est associée. Le graphique de droite identifie le type d'eau correspondant à chaque point selon la légende ci-dessous. La droite d'équation $y = x$ est également représentée sur le graphique de droite afin de faciliter la comparaison entre microorganismes. Ainsi, les points qui s'approche de cette droite traduisent une égalité de concentrations entre les deux indicateurs. À l'inverse, tous points qui s'en éloignent indique une différence de concentration.

Légende :

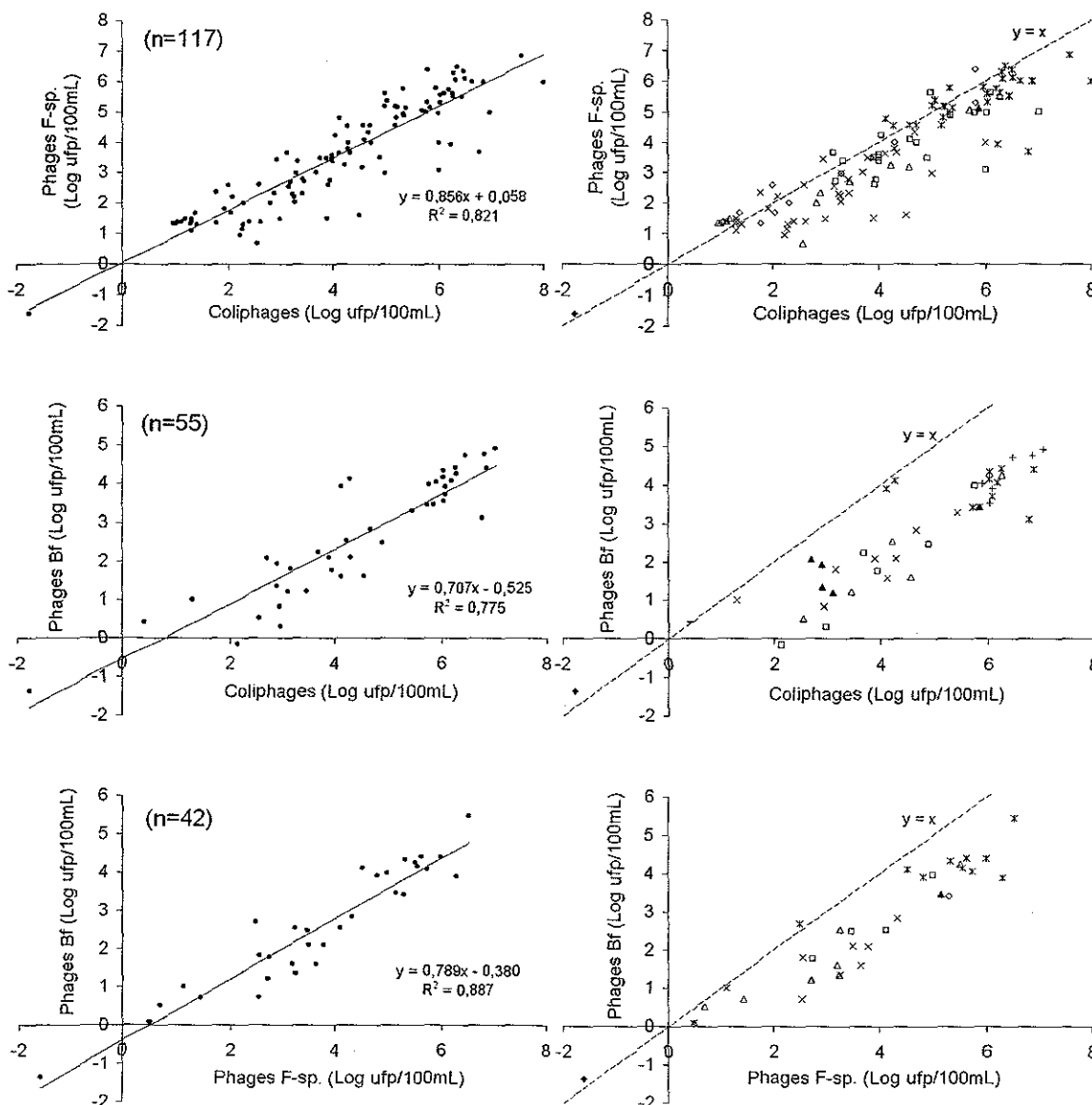
- | | |
|---------------------------------|-----------------------|
| × Eaux usées brutes | □ Eaux usées traitées |
| + Boues | ◇ Lagunage |
| × Eaux de surface | △ Eaux de mer |
| ▲ Sédiments marins | — Eaux souterraines |
| ○ Traitements de potabilisation | ◇ Eaux potables |
| --- $y=x$ | |

1- Recherche de corrélations entre les différents paramètres bactériens

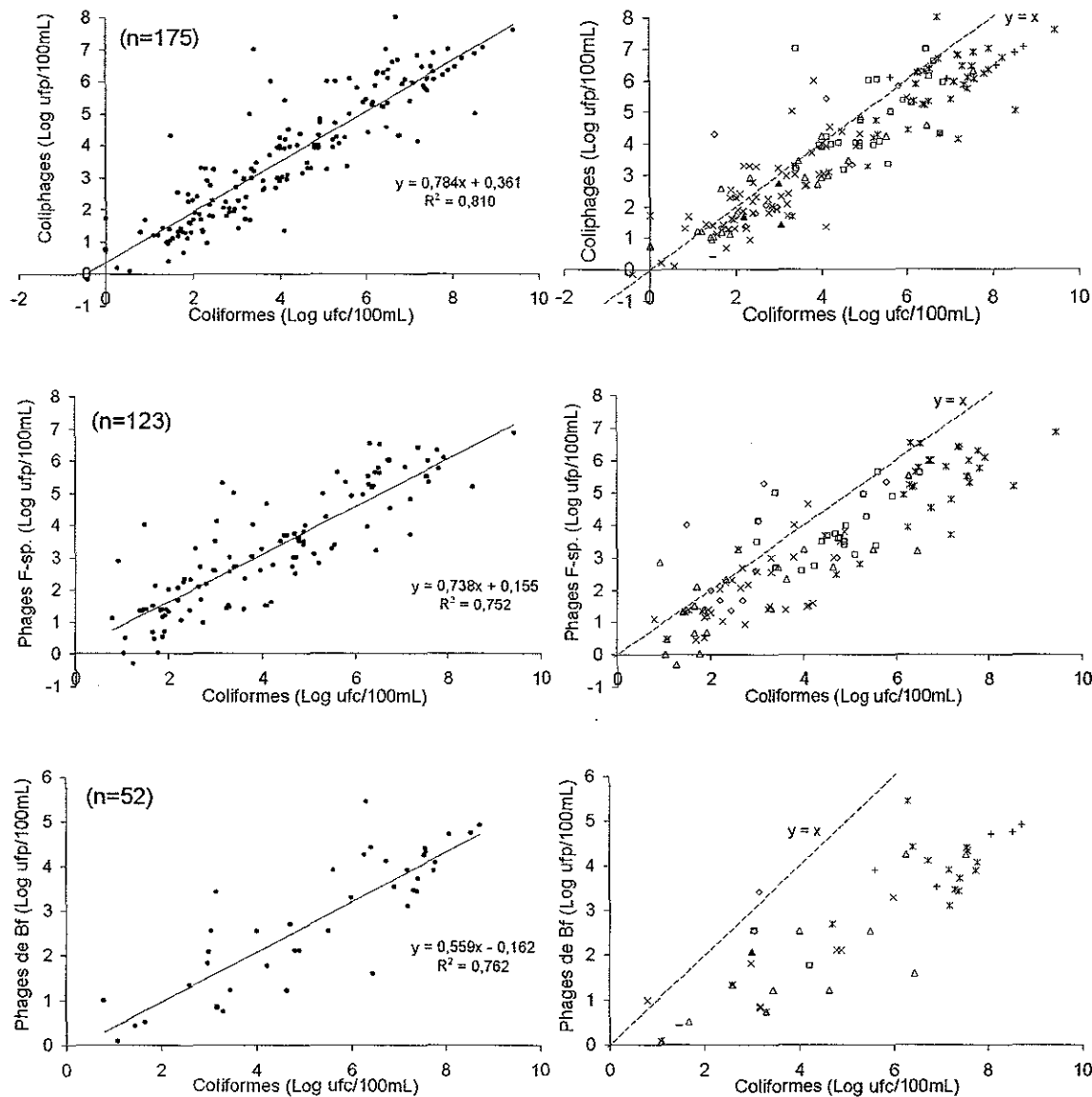




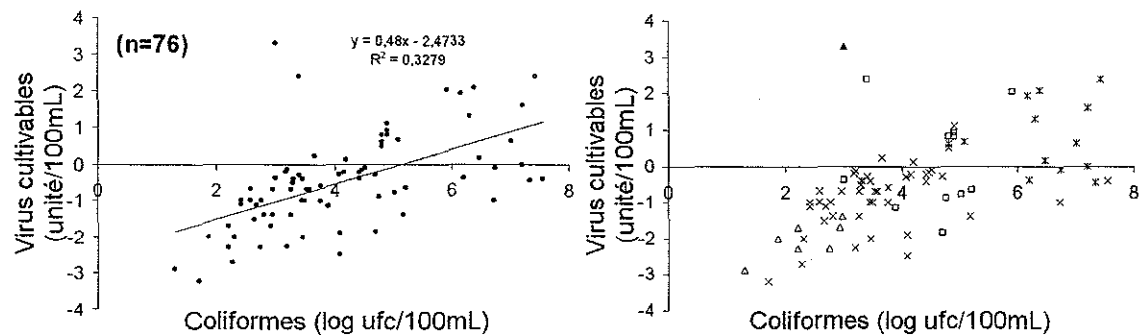
2- Recherche de corrélations entre les différents paramètres phagiques

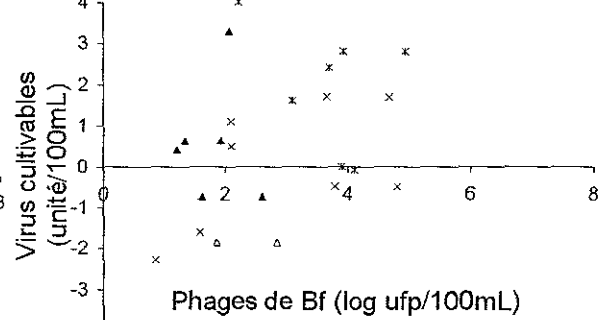
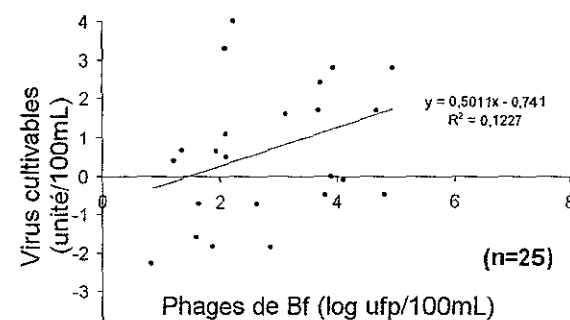
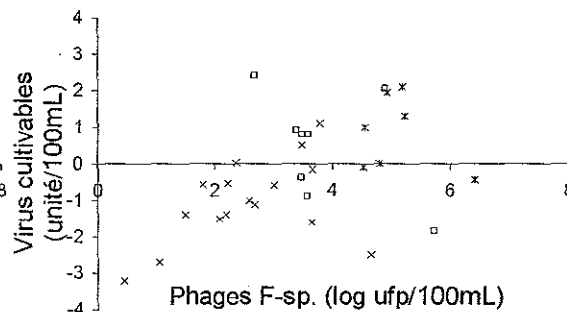
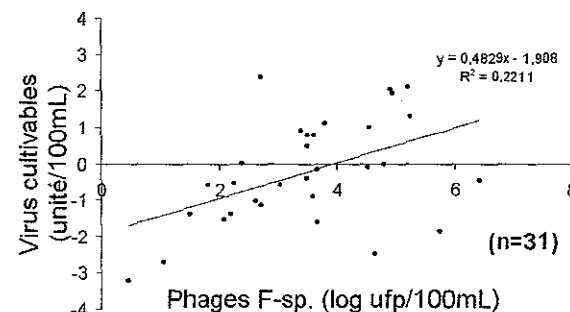
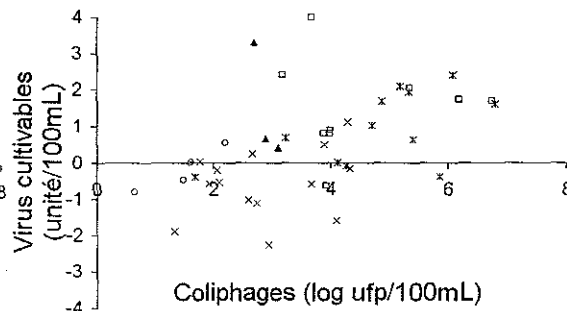
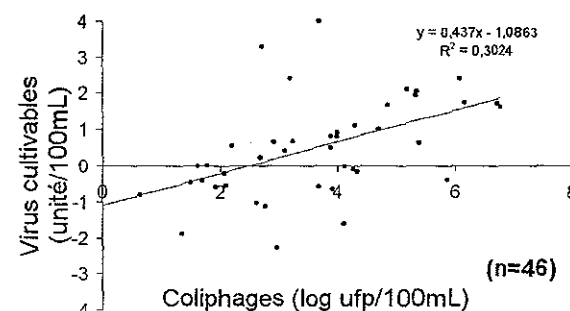
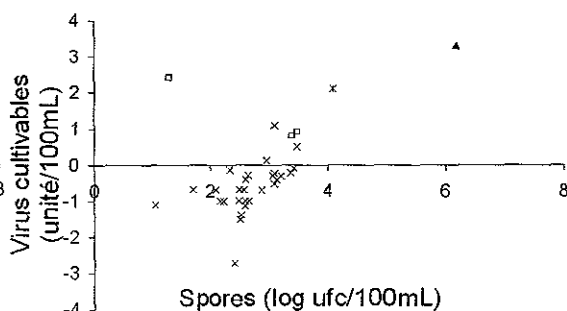
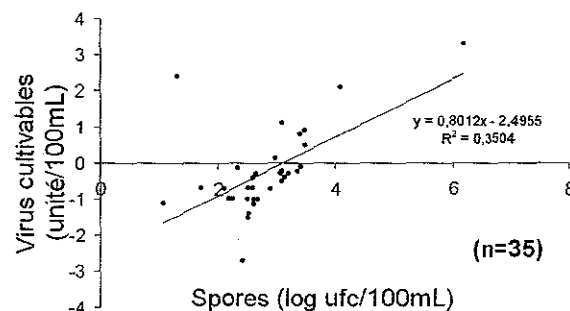
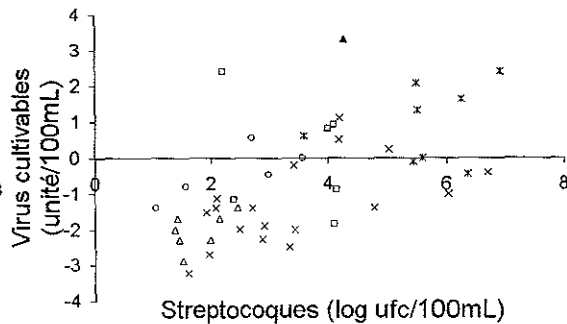
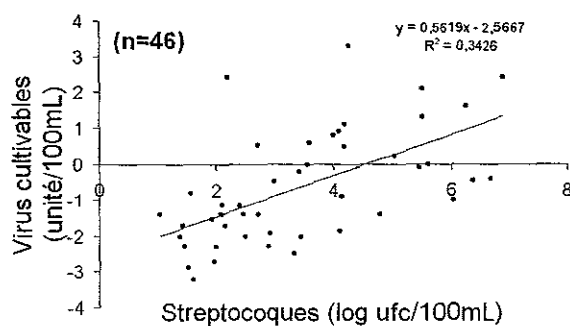


3- Recherche de corrélations entre bactéries indicatrices et bactériophages



4- Recherche de corrélations entre indicateurs et virus pathogènes infectieux





ANNEXE 2

Composition des milieux utilisés pour la recherche des bactériophages et mode de conservation des souches hôtes et des bactériophages témoins

1- Composition des milieux utilisés pour la recherche des coliphages somatiques

MSB (Modified Scholten's Broth)

La composition du milieu est la suivante :

Peptone de caséine	10 g
Extrait de levure	3 g
Extrait de viande	12 g
NaCl	3 g
Solution de Na_2CO_3 à 150 g.L^{-1}	4,63 mL
Solution de MgCl_2 à $4,14 \text{ mol.L}^{-1}$	0,3 mL
Eau désionisée qsp	1 L

Ce milieu est chauffé jusqu'à dissolution complète des différents constituants. Il est réparti en aliquots de 50 mL dans des erlens, puis autoclavé à 121°C pendant 15 min et conservé à 4°C pendant un maximum de 6 mois.

Avant utilisation, 50 mL de milieu sont complétés par ajout de 300 μL d'une solution de CaCl_2 1M stérilisée par filtration sur membrane en ester de cellulose de porosité 0,22 μm .

MSA (Modified Scholten's Agar)

Ce milieu est constitué de MSB complété par 15 g.L^{-1} d'agar (PROLABO 20 768.292). Pour la dissolution complète de l'agar, il faut porter le mélange à ébullition. Le milieu est ensuite stérilisé par autoclavage à 121°C pendant 15 min.

Après autoclavage, 1 L de milieu en surfusion est additionné de 6 mL d'une solution de CaCl_2 1M préalablement stérilisée par filtration sur membrane en ester de cellulose de porosité 0,22 μm . Il est coulé dans des boîtes de pétri de 90 mm qui peuvent être conservés à 4°C pendant un maximum de 6 mois.

ssMSA (semi-solid Modified Scholten's Agar)

Ce milieu est constitué par du MSB complété par 8 g.L^{-1} de d'agar (PROLABO 20 768.292). Pour la dissolution complète de l'agar, il faut porter le mélange à ébullition. Le milieu est ensuite réparti en aliquot de 50 mL ou 100 mL puis autoclavé à 121°C pendant 15 min et conservé à 4°C pendant un maximum de 6 mois.

Avant utilisation, 50 mL de milieu sont complétés par ajout de 300 μL d'une solution de CaCl_2 1M stérilisée par filtration sur membrane en ester de cellulose de porosité 0,22 μm .

Pour l'analyse d'eaux fortement contaminées, 50 mL de ces différents milieux peuvent être additionnés de 0,5 mL d'une solution d'acide nalidixique à 25 mg.mL^{-1} et ce afin de limiter la croissance des bactéries autres que la souche hôte WG5.

2- Composition des milieux utilisés pour la recherche des bactériophages à ARN F-spécifiques

TYGB (Tryptone Yeast-extract Glucose Broth)

La composition du milieu est la suivante :

Tryptone	10 g
Extrait de levure	1 g
NaCl	3 g
Eau désionisée qsp	1 L

Ce milieu est chauffé jusqu'à dissolution complète des différents constituants. Il est réparti en aliquots de 50 mL dans des erlens, puis autoclavé à 121°C pendant 15 min et conservé à 4°C pendant un maximum de 6 mois.

Avant utilisation, 50 mL de milieu sont complétés par ajout de 500 µL d'une solution de CaCl_2 30 g.L⁻¹ / glucose 100 g.L⁻¹ stérilisée par filtration sur membrane en ester de cellulose de porosité 0,22 µm.

TYGA (Tryptone Yeast-extract Glucose Agar)

Ce milieu est constitué de TYGB complété par 15 g.L⁻¹ d'agar (PROLABO 20 768.292). Pour la dissolution complète de l'agar, il faut porter le mélange à ébullition. Le milieu est ensuite stérilisé par autoclavage à 121°C pendant 15 min.

Après autoclavage, 1 L de milieu en surfusion est complété par ajout de 10 mL d'une solution de CaCl_2 30 g.L⁻¹ / glucose 100 g.L⁻¹ préalablement stérilisée par filtration sur membrane en ester de cellulose de porosité 0,22 µm. Il est coulé dans des boîtes de pétri de 90 mm qui pourront être conservés à 4°C pendant un maximum de 6 mois.

ssTYGA (semi-solid Tryptone Yeast-extract Glucose Agar)

Ce milieu est constitué par du TYGB complété par 8 g.L⁻¹ d'agar (PROLABO 20 768.292). Pour la dissolution complète de l'agar, il faut porter le mélange à ébullition. Le milieu est ensuite réparti en aliquots de 50 mL puis autoclavé à 121°C pendant 15 min et conservé à 4°C pendant un maximum de 6 mois.

Avant utilisation, 50 mL de milieu sont complétés par ajout de 500 µL d'une solution de CaCl_2 30 g.L⁻¹ / glucose 100 g.L⁻¹ stérilisée par filtration sur membrane en ester de cellulose de porosité 0,22 µm.

Pour l'analyse d'eaux fortement contaminées, 50 mL de ces différents milieux peuvent être additionnés de 0,5 mL d'une solution d'acide nalidixique à 25 mg.mL⁻¹ et ce afin de limiter la croissance des bactéries autres que la souche hôte WG49.

3- Composition des milieux utilisés pour la recherche des phages de *Bacteroides fragilis*

Bacteroides Phage Recovery Medium Broth (BPRMB)

La composition du milieu est la suivante :

Peptone de caséine	10 g
Peptone de viande	10 g
Extrait de levure	2 g
NaCl	5 g
L-cystéine	0,5 g
Dextrose	1,80 g
MgSO ₄	0,12 g
Eau désionisée qsp	1 L

A noter que ce mélange sous forme de poudre auquel il suffit de rajouter l'eau peut être acheté tout fait (ADSA MICRO, 2-409)

Ce milieu est chauffé jusqu'à dissolution complète des différents constituants. 1 L de milieu est complété par ajout de 1 mL de solution de CaCl₂ à 0,05 mg.L⁻¹. Il est autoclavé à 121°C pendant 15 min et conservé à 4°C pendant un maximum de 6 mois.

Avant utilisation, 50 mL de milieu sont complétés par ajout des solutions suivantes :

Hémine 0,1 % (dans NaOH 0,02 %)	500 µL	(Autoclaver)
Na ₂ CO ₃ 1 M	1250 µL	(Filtrer sur 0,22 µm)
HCl fumant	125 µL	

Le pH est ajusté à 6,8 +/-0,5

Bacteroides Phage Recovery Medium Agar (BPRMA)

Ce milieu est constitué de BPRMB complété par 16 g.L⁻¹ d'agar (PROLABO 20 768.292). Pour la dissolution complète de l'agar, il faut porter le mélange à ébullition. Le milieu est stérilisé par autoclavage à 121°C pendant 15 min.

Après autoclavage, 1 L de milieu en surfusion est complété par ajout des solutions suivantes :

Hémine 0,1 % (dans NaOH 0,02 %)	10 mL	(Autoclaver)
Na ₂ CO ₃ 1 M	25 mL	(Filtrer sur 0,22 µm)
HCl fumant	2,5 mL	

Le pH est ajusté à 6,8 +/-0,5

Le milieu complet est coulé dans des boîtes de pétri de 90 mm qui pourront être conservés à 4°C pendant un maximum de 6 mois.

Semi-solid Bacteroides Phage Recovery Medium Agar (ssBPRMA) :

Ce milieu est constitué par du BPRMB complété par 8 g.L⁻¹ d'agar (PROLABO 20 768.292). Pour la dissolution complète de l'agar, il faut porter le mélange à ébullition. Il est réparti en aliquots de 50 mL puis autoclavé à 121°C pendant 15 min et conservé à 4°C pendant un maximum de 6 mois.

Avant utilisation, 100 mL de milieu sont complétés par ajout des solutions suivantes :

Hémine 0,1 % (dans NaOH 0,02 %)	1 mL	(Autoclaver)
Na ₂ CO ₃ 1 M	2,5 mL	(Filtrer sur 0,22 µm)
HCl fumant	250 µL	

Le pH est ajusté à 6,8 +/-0,5

Pour l'analyse d'eaux fortement contaminées, 50 mL de ces différents milieux pourront être additionnés de 0,5 mL d'une solution d'acide nalidixique à 25 mg.mL⁻¹ et de 40 µL d'une solution de kanamycine à 125 mg.mL⁻¹, et ce afin de limiter la croissance des bactéries autres que la souche hôte RYC2056.

4- Mode de conservation des souches hôtes et des bactériophages témoins

Les souches hôtes

Pour la mise en évidence des coliphages somatiques, la souche bactérienne *E. coli* **WG5** cultivée en phase exponentielle de croissance est conservée en aliquot d'environ 2 mL à -80°C dans la solution de culture (MSB) additionnée de 20 % de glycérol.

Pour la mise en évidence des bactériophages F-spécifiques, la souche bactérienne *S. typhimurium* **WG49** cultivée en phase exponentielle de croissance est conservée en aliquot d'environ 2 mL à -80°C dans la solution de culture (TYGB) additionnée de 20 % de glycérol.

Pour la mise en évidence des bactériophages de *Bacteroides fragilis*, la souche bactérienne *B. fragilis* **RYC2056** cultivée en phase exponentielle de croissance est conservée en aliquot d'environ 2,5 mL à -80°C dans la solution de culture (BPRMB) additionnée de 50 % de cryoprotecteur réalisé extemporanément, stérilisé par filtration sur membrane en ester de cellulose de porosité 0,22 μm et dont la composition est la suivante :

Albumine bovine sérum, fraction V	10 g
Sucrose	20 g
Eau distillée	qsp 100 mL

Les bactériophages :

Les trois phages témoins, **Φ X174** (coliphages somatiques), **MS2** (bactériophages F-spécifiques) et **B56-3** (phages de *Bacteroides fragilis*) sont conservés à -80°C à raison d'environ 100 ufp/ml dans une solution de peptone saline (1 g/L de peptone ; 8,5 g/L de NaCl) additionnée de 5 % de glycérol.

ANNEXE 3

Influence des radiations UV sur 6 microorganismes indicateurs

Dose (mW.s/cm ²) -->		lampes					
		0	8 W			15 W	
		29	58	86	86	173	
Coliformes (log ufc/100mL)	4-mai	4,39	3,50	nd	nd	2,21	nd
	9-mai	4,95	3,52	2,37	1,35	1,40	0,40
	16-mai	4,66	3,76	2,45	1,80	1,48	0,70
	29-mai	4,19	3,49	2,40	1,19	0,70	0,40
	26-juil	3,60	2,40	1,00	nd	1,00	0,30
	9-aoû	4,53	3,00	1,91	nd	1,56	0,74
	17-aoû	4,77	3,68	2,58	nd	2,20	1,54
Entérocoques (log ufc/100mL)	23-aoû	5,51	nd	nd	nd	2,39	1,99
	4-mai	4,27	4,03	nd	nd	2,71	nd
	9-mai	4,57	4,13	3,47	2,50	2,58	1,10
	16-mai	4,57	4,11	3,36	2,61	2,28	1,80
	29-mai	4,02	3,54	2,88	2,02	1,65	1,07
	26-juil	3,48	3,00	2,31	nd	1,85	0,96
	9-aoû	4,05	3,34	2,55	nd	1,99	1,00
Spores (log ufc/100mL)	17-aoû	4,17	4,04	2,90	nd	2,17	1,51
	23-aoû	4,57	nd	nd	nd	2,56	1,90
	4-mai	2,93	2,89	nd	nd	2,63	nd
	9-mai	3,05	2,72	2,68	2,69	2,88	1,82
	16-mai	2,74	2,89	2,09	2,05	2,05	1,86
	29-mai	2,66	2,39	2,59	2,21	1,81	1,76
	26-juil	2,65	2,52	2,24	nd	1,94	1,30
Coliphages (log ufp/100mL)	9-aoû	3,00	2,82	2,35	nd	2,72	1,65
	17-aoû	3,10	2,77	2,74	nd	2,82	2,34
	23-aoû	3,48	nd	nd	nd	2,64	2,38
	4-mai	5,50	4,44	nd	nd	3,21	nd
	9-mai	5,29	4,03	3,22	2,56	2,87	1,92
	16-mai	4,98	4,14	3,36	2,65	2,78	1,52
	29-mai	4,78	3,54	2,93	1,82	1,52	<1,23
Phages F-spécifiques (log ufp/100mL)	26-juil	4,74	3,00	2,00	nd	2,12	1,35
	9-aoû	4,76	2,88	2,00	nd	1,70	1,52
	17-aoû	4,72	3,31	2,54	nd	2,51	<1,23
	23-aoû	5,28	nd	nd	nd	2,60	1,80
	4-mai	4,65	4,42	nd	nd	3,76	nd
	9-mai	4,62	4,18	3,82	3,33	3,56	2,52
	16-mai	4,45	3,85	3,46	3,21	3,05	2,35
Phages de Bf (log ufp/100mL)	29-mai	4,26	3,79	3,49	3,04	2,65	1,82
	26-juil	3,20	2,65	2,60	nd	2,00	<1,23
	9-aoû	3,85	3,43	2,89	nd	2,48	1,40
	17-aoû	3,90	3,41	3,18	nd	2,70	2,00
	23-aoû	3,98	nd	nd	nd	2,94	2,81
	4-mai	3,41	2,97	nd	nd	2,04	nd
	9-mai	3,11	2,85	2,60	2,00	2,37	2,30
pH	16-mai	3,01	2,48	2,00	<1,23	1,88	<1,23
	29-mai	2,43	2,30	<1,23	<1,23	1,52	<1,23
	26-juil	2,00	1,82	<1,23	nd	<1,23	<1,23
	9-aoû	2,48	1,88	1,40	nd	<1,23	<1,23
	17-aoû	2,85	2,51	<1,23	nd	<1,23	<1,23
	23-aoû	2,90	nd	nd	nd	<1,23	<1,23
	4-mai	7,52	7,69	nd	nd	7,64	nd
Autres paramètres	9-mai	7,64	7,76	7,96	8,15	7,90	8,07
	16-mai	7,62	7,87	7,97	7,97	7,82	7,94
	29-mai	7,33	7,50	7,60	7,65	7,64	7,74
	26-juil	7,21	7,34	7,48	nd	7,42	7,68
	9-aoû	7,58	7,72	7,83	nd	8,02	8,04
	17-aoû	7,47	7,59	7,79	nd	7,90	7,96
	23-aoû	7,57	nd	nd	nd	7,74	7,90
		Conductivité (µS/cm)		Turbidité (NTU)		Température (°C)	
Autres paramètres	4-mai	906		4,4		nd	
	9-mai	nd		nd		nd	
	16-mai	960		3,5		17,6	
	29-mai	825		2,2		nd	
	26-juil	341		2,3		18,4	
	9-aoû	750		3,1		18,2	
	17-aoû	782		2,4		18,1	
	23-aoû	812		2,3		17,9	

nd: non déterminé

ANNEXE 4

Influence de différents traitements d'épuration sur 6 microorganismes dans les eaux usées brutes de Nancy et Épinal

Sites	date	Type d'eau	Coliformes	Entérocoques	spores	coliphages	Phages F-sp.	Phage de Bt	température °C	pH	turbidité NTU	conductivité µS/cm
			(log ufc/100mL)	(log ufc/100mL)	(log ufc/100mL)	(log ufc/100mL)	(log ufc/100mL)	(log ufc/100mL)				
Nancy	9/08/00	Brute	6,74	6,12	4,52	6,45	5,75	4,18	18,2	7,5	94	865
Nancy	9/08/00	Primaire	6,53	5,75	3,66	6,15	5,75	3,96	18,2	7,5	14	826
Nancy	9/08/00	Secondaire	4,53	4,05	2,77	4,76	3,85	2,48	18,2	7,5	3	750
Nancy	4/09/00	Brute	6,67	5,94	4,24	6,70	5,52	4,48	18,9	7,9	49	838
Nancy	4/09/00	Primaire	6,61	5,74	3,96	6,57	5,35	4,00	18,9	7,5	27	768
Nancy	4/09/00	Secondaire	4,70	4,00	2,77	5,11	3,55	2,60	18,9	7,1	8	637
Nancy	30/08/00	Brute	6,90	6,20	4,64	6,63	5,74	4,18	21,3	7,6	92	1048
Nancy	30/08/00	Primaire	6,68	5,98	4,07	6,52	5,61	4,29	21,3	7,5	35	921
Nancy	30/08/00	Secondaire	5,17	4,46	3,20	5,11	3,72	2,70	21,3	7,3	8	869
Nancy	26/07/00	Brute	6,10	5,65	3,52	5,40	4,95	3,41	18,4	7,5	29	187
Nancy	26/07/00	Primaire	6,00	5,55	3,05	5,18	4,74	3,40	18,4	7,4	19	211
Nancy	26/07/00	Secondaire	3,60	3,65	2,74	4,70	3,20	2,00	18,4	7,2	5	340
Nancy	24/07/00	Brute	6,60	6,15	4,65	6,50	5,74	3,81	18,2	8,2	141	750
Nancy	24/07/00	Primaire	6,47	5,85	4,01	6,15	5,18	4,16	18,2	7,8	50	645
Nancy	24/07/00	Secondaire	4,32	4,42	2,82	5,29	3,81	2,30	18,2	7,1	12	441
Nancy	23/08/00	Brute	6,81	6,02	4,35	6,84	5,76	5,00	17,9	7,9	45	872
Nancy	23/08/00	Primaire	6,68	5,93	4,37	6,56	5,71	4,40	17,9	7,8	31	876
Nancy	23/08/00	Secondaire	5,51	4,57	3,48	5,28	3,98	2,90	17,9	7,6	2	812
Nancy	21/08/00	Brute	6,89	6,41	4,56	6,86	5,93	4,78	20,0	7,8	78	986
Nancy	21/08/00	Primaire	6,66	6,07	4,30	6,85	5,84	4,23	20,0	7,6	30	927
Nancy	21/08/00	Secondaire	5,05	4,48	2,82	5,08	3,76	2,54	20,0	7,3	3	742
Nancy	21/06/00	Brute	6,86	6,49	4,25	6,51	5,88	4,85	21,2	7,9	125	1078
Nancy	21/06/00	Primaire	6,53	6,30	4,00	6,44	6,23	4,77	21,4	10,0	56	1051
Nancy	21/06/00	Secondaire	5,23	4,76	2,18	4,58	3,97	2,30	21,4	7,7	4	984
Nancy	19/06/00	Brute	6,66	6,28	4,33	6,59	6,07	4,74	17,0	8,2	132	1128
Nancy	19/06/00	Primaire	6,79	6,19	4,03	6,54	6,16	4,70	17,0	7,8	61	1034
Nancy	19/06/00	Secondaire	4,94	4,48	2,35	4,00	3,81	2,54	17,0	7,5	3	873
Nancy	17/08/00	Brute	6,66	6,03	4,28	6,43	5,81	5,37	18,1	7,7	47	838
Nancy	17/08/00	Primaire	6,59	5,70	3,95	6,22	5,85	4,21	18,1	7,6	26	800
Nancy	17/08/00	Secondaire	4,77	4,17	3,10	4,72	3,90	2,85	18,1	7,5	2	782
EPINAL	29/03/00	Brute	6,11	6,13	4,22	6,10	5,92	4,39	10,3	6,9	538	400
EPINAL	29/03/00	Secondaire	4,30	4,10	2,83	4,65	3,64	2,51	10,0	7,0	4	409
EPINAL	29/03/00	Tertiaire	3,77	3,30	1,77	4,50	2,78	2,40	10,0	7,0	5	458
EPINAL	27/03/00	Brute	6,64	6,04	3,88	6,22	5,83	4,87	9,3	7,8	74	503
EPINAL	27/03/00	Secondaire	4,52	4,10	2,03	4,13	3,53	2,18	9,3	6,8	3	277
EPINAL	27/03/00	Tertiaire	3,88	2,70	1,82	3,60	2,81	1,52	9,2	6,4	5	301
EPINAL	25/04/00	Brute	6,49	5,95	3,96	6,49	5,74	4,64	11,6	7,6	43	596
EPINAL	25/04/00	Secondaire	4,19	3,90	2,24	4,10	3,13	2,44	12,4	6,8	4	428
EPINAL	25/04/00	Tertiaire	4,28	3,90	2,07	3,78	2,65	1,70	12,4	6,8	8	416
EPINAL	24/07/00	Brute	6,65	5,70	4,05	6,36	6,19	3,85	18,6	7,2	51	467
EPINAL	24/07/00	Secondaire	4,42	3,60	2,95	4,49	3,38	2,18	18,6	7,2	5	461
EPINAL	24/07/00	Tertiaire	4,58	3,90	2,35	3,85	2,88	1,70	18,7	7,2	5	467
EPINAL	23/03/00	Brute	6,20	6,00	3,96	6,07	6,01	4,32	10,0	7,2	65	405
EPINAL	23/03/00	Secondaire	4,45	4,13	2,12	4,35	3,18	2,44	10,8	7,0	3	434
EPINAL	23/03/00	Tertiaire	4,14	3,48	2,03	3,48	2,80	1,22	10,9	6,7	21	472
EPINAL	21/03/00	Brute	6,49	6,15	4,46	6,00	5,69	4,48	10,5	7,5	73	407
EPINAL	21/03/00	Secondaire	4,39	4,32	2,36	4,56	4,05	2,97	10,5	7,1	4	395
EPINAL	21/03/00	Tertiaire	3,87	3,65	2,26	3,96	3,24	2,40	10,5	6,8	13	413
EPINAL	2/05/00	Brute	6,18	5,95	3,62	6,42	3,74	4,99	12,2	7,5	92	669
EPINAL	2/05/00	Secondaire	4,31	4,19	2,64	4,48	1,87	2,60	12,3	6,9	10	558
EPINAL	2/05/00	Tertiaire	4,30	4,11	2,89	4,19	1,54	1,40	12,3	6,9	10	579
EPINAL	19/06/00	Brute	6,49	5,95	4,74	6,53	6,41	4,61	17,8	7,2	117	662
EPINAL	19/06/00	Secondaire	4,94	4,20	2,74	4,38	3,53	2,00	17,8	7,1	4	509
EPINAL	19/06/00	Tertiaire	4,72	4,26	2,35	3,90	3,19	2,30	17,8	7,1	4	514
EPINAL	13/04/00	Brute	6,56	5,85	3,49	6,26	5,60	3,78	11,7	7,6	114	91
EPINAL	13/04/00	Secondaire	5,29	5,17	2,25	5,36	4,73	2,54	11,7	7,2	13	76
EPINAL	13/04/00	Tertiaire	4,57	4,20	1,70	4,45	3,41	1,70	11,6	6,9	8	68

nd: Non déterminé

ANNEXE 5

Évolution des concentrations de 6 microorganismes dans l'eau de la rivière Moselle en fonction de la date et du site de prélèvement

Sites	date	température °C	pH	turbidité NTU	conductivité µS/cm	débit m³/j	Coliformes	Entérocoques	spores	coliphages	Phages F-sp.	Phage de Bt
							(log ufc/100mL)			(log ufp/100mL)		
1	22-fév	3,6	nd	4,9	121	133	3,31	2,79	2,03	2,88	2,54	2,15
	25-fév	5,9	nd	2,6	131	101	2,98	2,77	2,09	2,56	2,48	1,82
	29-fév	7,3	nd	1,8	125	96	2,74	2,68	1,52	2,87	2,75	1,82
	16-mars	7,3	7,6	1,9	123	74	2,82	2,76	1,35	3,03	2,43	1,70
	3-avr	8,6	8,1	4,1	171	43	2,18	1,60	1,74	3,20	2,37	2,00
	11-avr	10,9	9,2	2,0	40	30	2,12	1,95	<0,90	3,05	1,40	1,30
	27-avr	14,6	7,9	2,2	243	36	1,84	1,54	1,52	3,39	1,52	1,90
	18-mai	12,1	7,6	6,8	300	26	2,13	0,82	1,95	2,78	2,30	<1,23
	8-juin	15,3	7,6	7,8	173	51	2,76	2,00	<0,90	2,85	2,60	1,40
	17-juil	13,4	7,9	4,2	127	98	3,06	2,80	<0,90	3,28	2,76	<1,23
	3-aoû	18,9	7,9	3,1	226	35	2,84	2,46	1,74	3,19	2,00	<1,23
	21-aoû	19,3	8,1	1,6	278	12	2,23	1,70	1,82	3,08	2,00	1,70
	12-sep	18,2	7,6	3,4	250	15	2,61	1,85	1,96	3,22	<1,40	1,52
	27-sep	17,6	7,7	1,1	326	11	2,50	1,98	1,22	3,29	2,24	<1,23
	31-oct	11,0	7,5	2	270	63	3,27	2,59	1,40	3,45	2,88	<1,23
2	13-nov	9,5	7,6	3	194	96	3,08	2,69	0,92	3,20	2,88	2,00
	22-fév	4,1	nd	8,4	166	133	3,06	2,85	1,82	3,18	1,70	<1,23
	25-fév	6,0	nd	4,1	196	101	3,15	2,86	2,25	3,24	2,67	1,22
	29-fév	7,4	nd	4,5	189	96	3,02	2,84	1,89	3,10	2,73	1,82
	16-mars	7,4	7,9	3,7	191	74	3,00	2,53	1,05	3,21	2,90	2,00
	3-avr	8,4	8,3	4,2	259	43	2,18	2,28	1,74	3,39	2,37	1,70
	11-avr	10,1	8,5	2,8	57	30	3,03	2,89	1,82	3,12	2,72	1,30
	27-avr	14,2	8,2	2,4	373	36	2,06	2,19	1,05	3,63	2,22	1,90
	18-mai	12,3	7,8	8,5	421	26	2,85	2,04	1,82	3,20	2,85	<1,23
	8-juin	16,4	7,7	7,6	217	51	3,03	2,34	1,74	3,32	2,74	2,00
	17-juil	13,5	7,9	4,1	166	98	3,27	2,94	1,05	3,43	2,70	1,40
	3-aoû	18,9	8,0	6,9	281	35	3,24	2,70	1,74	4,14	2,85	<1,23
	21-aoû	20,2	8,2	3,0	393	12	3,01	2,11	2,09	3,77	2,00	<1,23
	12-sep	19,4	7,8	2,8	341	15	3,68	2,76	2,07	3,69	2,64	1,52
	27-sep	17,5	8,0	1,3	464	11	3,36	2,58	1,52	3,78	2,10	<1,23
3	31-oct	10,8	7,7	6	395	63	3,52	3,03	1,52	3,91	3,15	<1,23
	13-nov	9,1	7,7	5	270	96	3,32	2,80	1,62	3,49	3,12	1,52
	22-fév	4,4	nd	8,1	167	133	3,12	2,86	1,90	3,05	1,70	1,78
	25-fév	5,9	nd	3,8	187	101	3,00	2,81	2,05	3,18	2,64	1,82
	29-fév	7,2	nd	2,8	188	96	3,15	2,86	1,65	3,22	2,52	2,00
	16-mars	7,7	8,0	2,3	201	74	3,11	2,73	1,82	3,19	2,67	1,92
	3-avr	8,1	7,8	14,7	306	43	2,30	2,08	1,52	3,32	2,22	2,00
	11-avr	10,1	8,3	4,6	57	30	2,42	2,18	1,22	3,11	1,88	1,90
	27-avr	14,2	8,2	4,5	359	36	1,38	1,29	1,52	3,00	<1,40	2,30
	18-mai	12,3	7,8	5,6	392	26	1,64	0,77	1,65	2,90	1,82	<1,23
	8-juin	17,1	7,6	8,8	199	51	2,76	1,81	1,66	3,45	2,00	1,70
	17-juil	14,3	7,9	4,2	161	98	3,21	2,64	1,35	3,41	2,81	1,40
	3-aoû	17,7	7,9	10,1	273	35	2,69	2,16	1,52	3,86	2,12	<1,23
	21-aoû	19,7	8,4	4,7	370	12	1,00	0,80	1,74	2,70	<1,40	<1,23
	12-sep	18,4	8,6	2,2	313	15	1,63	0,80	1,22	3,16	<1,40	<1,23
	27-sep	18,0	8,0	1,6	392	11	1,87	1,34	0,92	3,32	1,40	<1,23
	31-oct	11,6	7,8	4	381	63	2,73	1,96	1,40	3,82	2,67	<1,23
	13-nov	8,8	7,7	4	260	96	3,46	2,77	1,22	3,51	3,10	2,00

ANNEXE 5 (suite)

Évolution des concentrations de 6 microorganismes dans l'eau de la rivière Moselle en fonction de la date et du site de prélèvement

4	22-fév	4,6	nd	9,1	164	133	2,89	2,68	1,67	3,05	2,40	<1,23
	25-fév	5,5	nd	4,4	190	101	3,16	2,79	2,12	3,14	2,88	2,26
	29-fév	7,2	nd	2,1	190	96	2,95	2,82	1,35	3,15	2,70	1,22
	16-mars	8,0	8,0	2,9	206	74	2,85	2,60	1,65	3,44	2,60	1,52
	3-avr	7,9	8,0	5,6	279	43	2,48	2,15	1,35	3,46	2,00	1,78
	11-avr	10,4	8,4	5,6	57	30	2,07	1,98	<0,90	2,97	2,00	1,30
	27-avr	13,9	8,1	5,3	362	36	1,28	0,90	1,35	3,04	1,52	<1,23
	18-mai	12,0	7,7	8,1	385	26	1,04	0,40	1,05	2,60	1,52	<1,23
	8-juin	17,1	7,6	10,8	198	51	2,43	1,64	1,26	3,51	2,00	<1,23
	17-juil	14,0	7,9	3,9	162	98	3,18	2,76	<0,90	3,64	2,72	1,88
	3-aoû	19,3	7,9	8,3	283	35	2,00	1,58	1,65	3,79	2,12	1,52
	21-aoû	19,8	8,0	5,7	374	12	0,91	1,07	1,89	2,37	<1,40	1,70
	12-sep	18,4	7,8	3,2	308	15	1,48	0,86	1,70	3,20	1,82	<1,23
	27-sep	17,6	7,7	1,8	388	11	1,37	1,44	<0,90	3,35	<1,40	<1,23
	31-oct	11,2	7,6	6	379	63	2,56	1,64	1,22	3,70	2,30	<1,23
	13-nov	8,7	7,7	6	259	96	3,26	2,59	0,92	3,50	3,19	1,82
5	22-fév	4,7	nd	7,1	182	133	3,00	2,75	2,03	3,17	2,18	2,15
	25-fév	6,0	nd	4,7	208	101	3,11	2,92	2,05	3,18	2,75	1,92
	29-fév	7,4	nd	5,6	209	96	2,40	2,65	1,65	3,18	2,48	<1,23
	16-mars	8,1	8,0	2,7	212	74	2,28	2,36	1,52	3,14	2,52	1,70
	3-avr	7,9	7,9	7,5	297	43	2,30	1,54	1,82	3,37	2,43	1,92
	11-avr	10,6	8,1	5,9	58	30	1,44	1,40	1,35	2,99	1,70	1,30
	27-avr	14,1	8,0	4,4	374	36	0,95	1,18	1,52	3,30	1,82	<1,23
	18-mai	12,1	7,8	4,6	393	26	1,66	1,30	1,05	2,75	1,70	<1,23
	8-juin	17,0	7,7	6,4	205	51	2,36	1,54	1,26	3,45	2,30	<1,23
	17-juil	13,8	7,8	6,9	167	98	3,11	2,69	1,05	3,58	2,88	1,70
	3-aoû	18,4	8,0	6,5	312	35	2,51	2,13	1,52	3,79	2,00	<1,23
	21-aoû	20,0	8,1	14,2	378	12	2,43	2,43	2,05	2,30	<1,40	<1,23
	12-sep	18,3	7,7	3,3	321	15	1,72	1,42	0,92	3,01	<1,40	<1,23
	27-sep	17,0	7,7	2,3	395	11	2,05	1,96	0,92	3,13	1,88	<1,23
	31-oct	11,3	7,6	4	394	63	2,89	2,56	0,92	3,67	2,56	<1,23
	13-nov	9,0	7,8	5	275	96	3,18	2,60	1,62	3,41	2,88	<1,23
6	22-fév	4,6	nd	8,9	183	133	3,07	2,73	1,60	3,11	2,18	2,18
	25-fév	5,5	nd	4,8	208	101	3,15	2,77	1,65	3,29	2,56	2,00
	29-fév	6,9	nd	4,2	211	96	2,78	2,65	2,07	3,19	2,60	1,52
	16-mars	8,1	7,9	2,7	217	74	2,15	2,16	1,05	3,14	2,22	1,70
	3-avr	8,1	7,8	7,8	287	43	2,48	1,98	1,82	3,34	2,37	2,10
	11-avr	10,0	7,9	4,9	58	30	2,49	2,02	1,35	3,04	1,88	1,30
	27-avr	14,4	7,8	3,9	386	36	1,63	1,77	1,35	3,13	2,00	<1,23
	18-mai	12,0	7,7	6,2	103	26	2,50	1,75	1,74	2,95	2,30	<1,23
	8-juin	13,3	7,6	8,4	212	51	2,61	1,92	<0,90	3,57	2,51	1,70
	17-juil	14,2	7,9	7,5	175	98	3,09	2,59	1,35	3,54	2,51	1,40
	3-aoû	18,5	8,2	8,1	324	35	2,68	2,46	1,52	3,62	1,82	1,82
	21-aoû	18,9	7,8	3,6	376	12	3,25	3,18	2,09	3,63	2,54	<1,23
	12-sep	18,6	7,6	2,9	328	15	2,35	1,98	<0,90	3,20	1,52	<1,23
	27-sep	17,6	7,7	1,2	418	11	2,66	2,34	<0,90	3,12	2,24	<1,23
	31-oct	11,2	7,7	4	393	63	3,17	2,60	0,92	3,65	2,78	<1,23
	13-nov	9,0	7,8	6	278	96	3,45	2,67	1,40	3,56	3,00	2,00

nd: Non déterminé

ANNEXE 6

Survie des coliformes thermotolérants et des coliphages somatiques en eau de rivière en fonction de la température et de la saison de prélèvement

saison	température °C	date	Coliformes	Coliphages	Poliovirus	
			Log ufc ou ufp/100mL		Infectieux Log NPPUCP/mL	Génome Ct
hiver	4	10/01/02	3,84	3,52	4,57	23,65
		11/01/02	3,63	3,54	4,46	24,09
		12/01/02	3,51	3,42	4,26	24,03
		13/01/02	3,30	3,37	4,20	24,72
		14/01/02	3,05	3,41	3,84	24,65
		15/01/02	2,88	3,31	3,75	25,14
		17/01/02	2,32	3,15	3,32	25,62
		19/01/02	1,99	3,06	3,25	25,86
		22/01/02	1,28	2,98	nd	nd
	18	10/01/02	3,84	3,52	4,22	23,60
		11/01/02	3,56	3,40	3,92	24,34
		12/01/02	2,81	3,28	3,28	25,97
		13/01/02	2,19	3,19	2,85	26,29
		14/01/02	1,24	2,95	2,61	26,27
		15/01/02	0,86	2,81	2,45	26,77
		17/01/02	0,18	2,73	1,99	28,08
		19/01/02	<0	2,30	1,57	29,14
		22/01/02	<0	1,82	nd	nd
	25	10/01/02	3,84	3,52	4,35	23,27
		11/01/02	3,54	3,32	3,75	25,08
		12/01/02	2,70	3,26	2,93	25,99
		13/01/02	1,74	3,06	2,37	27,21
		14/01/02	0,91	2,48	2,07	27,38
		15/01/02	0,90	2,00	1,78	27,88
		17/01/02	0,40	1,88	1,42	29,15
		19/01/02	< 0	1,40	0,95	29,36
été	4	4/09/01	3,10	3,29	4,79	23,80
		5/09/01	3,04	3,57	4,58	23,36
		6/09/01	3,03	3,47	4,69	23,64
		7/09/01	3,10	3,50	4,36	23,60
		8/09/01	2,91	3,40	4,31	24,08
		9/09/01	2,77	3,28	3,84	25,19
		10/09/01	2,67	3,35	3,48	25,59
		11/09/01	2,41	3,35	2,75	28,18
		12/09/01	2,17	3,14	2,47	29,39
		13/09/01	1,79	3,26	2,35	nd
		14/09/01	1,56	3,10	2,24	30,52
		17/09/01	1,18	3,16	1,66	nd
	18	4/09/01	3,10	3,29	4,80	24,01
		5/09/01	2,64	3,37	3,64	26,76
		6/09/01	2,15	3,16	2,83	28,70
		7/09/01	1,64	3,14	2,29	30,39
		8/09/01	1,39	2,85	1,83	30,80
		9/09/01	1,20	2,82	1,21	32,07
		10/09/01	0,60	2,51	0,99	32,25
		11/09/01	0,30	nd	0,26	34,16
		12/09/01	0,30	2,15	<0	32,91
		13/09/01	<0	2,08	<0	nd
		14/09/01	<0	nd	<0	34,77
		17/09/01	<0	1,60	<0	nd
	25	4/09/01	3,10	3,29	4,63	24,03
		5/09/01	2,41	3,01	3,14	28,13
		6/09/01	2,00	2,72	2,78	30,02
		7/09/01	1,80	2,78	1,43	30,97
		8/09/01	1,45	2,48	1,12	31,44
		9/09/01	0,95	2,12	0,70	33,04
		10/09/01	0,70	2,00	0,26	33,85
		11/09/01	0,60	1,40	<0	nd
		12/09/01	0,48	1,30	<0	36,58
		13/09/01	<0	1,30	<0	nd

nd: Non déterminé

ANNEXE 6 bis

Paramètres physico-chimiques de l'eau de rivière en fonction de la saison de prélèvement

Analyses effectuées par le Laboratoire d'Hygiène et de recherche en Santé Publique (LHRSP)

Paramètres	Unités	Été (11/9/01)	Hiver (10/1/02)
Température	°C	19,2	1,2
pH	-	8,1	7,7
Conductivité	µS/cm	469	63
Turbidité	NTU	6,4	3,7
Hydrogencarbonates	mg HCO ₃ /L	63	106
Alcalinité	mg CaO/L	29	49
Résidus secs à 180°C	mg/L	178	202
Aluminium	mg Al/L	0,15	0,085
Fer	mg Fe/L	366	95
Nitrates	mg NO ₃ /L	4,4	8,5
Orthophosphates	mg PO ₄ /L	0,16	<0,05
Oxygène dissous	mg O ₂ /L	9,5	12,6
oxidabilité au KMnO ₄ à chaud	mg O ₂ /L	6,12	1,9
Matières en suspension	mg/L	8	<2

ANNEXE 7

Survie des coliformes thermotolérants et des coliphages somatiques seuls ou associés dans les PBS

		Jours de survie						
		0	1	2	5	7	12	15
coliformes (log ufc/100mL)	seuls	9,10	9,06	9,10	9,15	9,12	8,95	8,90
	en présence de coliphages	9,61	9,69	9,69	9,79	9,74	9,45	9,34
Coliphages (log ufp/100mL)	seuls	7,61	7,34	7,30	7,15	6,97	6,83	6,53
	en présence de coliformes	7,60	7,41	7,39	7,28	7,08	6,93	6,76

ANNEXE 7 (suite)

Survie des coliformes thermotolérants et des coliphages somatiques dans l'eau de rivière pure ou diluée avec du PBS

date	Coliformes	Coliphages	Eau de rivière	PBS
	Log ufc ou ufp/100mL		%	%
10/1	9,60	7,72	0	100
11/1	9,53	7,48	0	100
12/1	9,58	7,54	0	100
13/1	9,65	7,44	0	100
14/1	9,52	7,44	0	100
16/1	9,59	7,42	0	100
18/1	9,52	7,37	0	100
21/1	9,56	7,19	0	100
23/1	9,48	6,91	0	100
28/1	9,58	6,89	0	100
30/1	9,59	6,96	0	100
3/2	9,51	6,74	0	100
6/2	9,43	6,64	0	100
10/2	9,51	6,61	0	100
17/2	9,05	6,56	0	100
20/2	8,91	6,26	0	100
10/1	9,60	7,63	50	50
11/1	9,65	7,71	50	50
12/1	8,53	7,59	50	50
13/1	7,68	7,32	50	50
14/1	6,98	6,96	50	50
16/1	6,41	6,51	50	50
18/1	5,58	5,90	50	50
21/1	5,62	5,53	50	50
23/1	4,85	4,92	50	50
28/1	4,89	4,51	50	50
30/1	4,83	4,00	50	50
3/2	4,81	3,71	50	50
6/2	4,04	3,55	50	50
10/2	3,48	3,45	50	50
17/2	2,91	3,10	50	50
20/2	2,60	2,95	50	50
10/1	9,60	7,42	90	10
11/1	9,13	6,39	90	10
12/1	7,66	6,48	90	10
13/1	7,02	6,18	90	10
14/1	6,97	5,95	90	10
16/1	6,36	5,68	90	10
18/1	5,45	5,32	90	10
21/1	6,02	4,73	90	10
23/1	5,59	4,54	90	10
28/1	4,98	3,57	90	10
30/1	5,09	3,45	90	10
3/2	4,96	3,15	90	10
6/2	4,41	2,88	90	10
10/2	3,48	2,81	90	10
17/2	2,80	2,65	90	10
20/2	2,26	2,48	90	10
10/1	9,60	7,32	100	0
11/1	9,09	6,28	100	0
12/1	8,24	6,00	100	0
13/1	7,76	5,84	100	0
14/1	7,56	5,85	100	0
16/1	6,45	5,36	100	0
18/1	6,00	4,62	100	0
21/1	6,11	4,28	100	0
23/1	5,76	3,83	100	0
28/1	5,30	3,36	100	0
30/1	5,36	3,26	100	0
3/2	5,60	3,16	100	0
6/2	5,05	2,74	100	0
10/2	4,62	2,60	100	0
17/2	3,98	2,00	100	0
20/2	3,90	2,18	100	0

ANNEXE 8

Concentrations en coliformes thermotolérants, coliphages somatiques et présence de génome viral (*entérovirus* et *Norwalk-like virus*) dans l'eau de la rivière Moselle en fonction de la date et du site de prélèvement

	date	Sites	débit m ³ /j	température °C	pH	turbidité NTU	conductivité µS/cm	Coliformes Log ufc ou	Coliphages ufp/100mL	Entérovirus	Calici SR47	Calici SR61	Calici SR67
1	5/12/00	1	65	8,5	7,63	6,4	227	3,30	3,18	+	-	-	-
		2	65	8,2	7,94	4,3	378	3,40	3,59	-	-	-	-
		3	65	8,2	7,98	6,6	390	3,38	3,59	-	+	-	-
		4	65	8,3	7,80	6,2	394	3,18	3,52	-	-	-	-
		5	65	8,3	7,82	5,9	417	3,11	3,48	-	-	-	-
2	11/12/00	1	98	8,6	7,08	7,4	224	3,54	3,47	+	-	-	-
		2	98	8,3	7,69	21,2	342	3,46	3,53	+	-	-	-
		3	98	8,4	7,59	26,1	325	3,61	3,64	-	-	-	-
		4	98	8,6	7,63	30,1	320	3,57	3,65	-	-	-	-
		5	98	8,3	7,56	28,7	337	3,51	3,56	-	+	-	-
3	14/12/00	1	71	8,8	7,78	5,3	223	3,38	3,11	-	+	-	-
		2	71	8,9	7,86	6,0	341	3,44	3,41	+	+	-	-
		3	71	8,9	7,88	6,7	343	3,48	3,45	-	+	-	-
		4	71	8,6	7,92	6,5	343	3,46	3,41	-	+	-	-
		5	71	8,8	7,92	8,8	366	3,21	3,19	-	-	-	-
4	4/01/01	1	97	6,2	7,65	6,1	122	3,75	3,62	-	+	-	-
		2	97	6,1	7,95	5,5	204	3,62	3,59	+	+	+	-
		3	97	6,0	7,93	7,0	216	3,62	3,58	-	+	-	-
		4	97	6,0	7,92	8,0	213	3,58	3,58	-	+	-	-
		5	97	6,1	7,83	8,7	235	3,65	3,63	-	+	-	-
5	9/01/01	1	130	5,6	7,63	5,9	92	3,46	3,28	-	+	-	-
		2	130	5,7	7,78	11,9	149	3,63	3,46	-	+	-	-
		3	130	5,7	7,78	14,9	145	3,47	3,44	-	+	-	-
		4	130	5,6	7,77	15,4	144	3,46	3,46	-	+	-	-
		5	130	5,7	7,69	18,3	152	3,43	3,36	-	-	-	-
6	17/01/01	1	48	1,6	7,28	2,3	135	3,14	2,82	-	+	-	-
		2	48	1,9	7,54	4,1	215	3,34	3,54	-	+	-	-
		3	48	1,8	7,59	2,7	208	3,29	3,21	-	+	-	-
		4	48	1,5	7,62	3,3	210	3,04	3,35	-	+	-	-
		5	48	1,8	7,51	3,3	230	3,08	3,37	-	+	-	-
7	12/06/01	1	26	15,2	7,57	5,0	244	2,09	3,05	-	-	-	-
		2	26	15,3	7,74	8,0	363	2,84	3,20	-	-	-	-
		3	26	15,6	7,79	8,3	379	2,43	2,95	-	-	-	-
		4	26	15,3	7,79	12,9	385	2,04	2,99	-	-	-	-
		5	26	15,0	7,76	10,1	393	1,82	2,75	-	-	-	-
8	26/06/01	1	22	21,6	7,70	4,1	246	1,53	2,06	+	-	-	-
		2	22	21,8	7,80	4,9	328	2,65	2,81	+	-	-	-
		3	22	21,8	7,62	5,0	327	1,62	2,41	-	-	-	-
		4	22	21,7	7,55	5,1	330	1,00	2,34	+	-	-	-
		5	22	21,8	7,55	6,6	324	1,03	2,51	-	-	-	-
9	26/07/01	1	26	22,3	7,96	4,9	199	1,78	2,48	-	-	-	-
		2	26	22,7	8,43	6,3	308	2,04	2,79	-	-	-	-
		3	26	22,8	8,07	5,3	365	1,85	2,41	+	-	-	-
		4	26	22,8	7,98	9,7	417	1,88	2,38	-	-	-	-
		5	26	22,5	7,88	11,3	390	1,51	2,34	-	+	-	-

ANNEXE 8 (suite)

**Concentrations en coliformes thermotolérants, coliphages somatiques
et présence de génome viral (*entérovirus* et *Norwalk-like virus*)
dans l'eau de la rivière Moselle en fonction de la date et du site de prélèvement**

	date	Sites	débit m³/j	température °C	pH	turbidité NTU	conductivité µS/cm	Coliformes	Coliphages	Entérovirus	Calici SR47	Calici SR61	Calici SR67
								Log ufc ou	ufp/100mL				
10	1/08/01	1	18	23,6	7,61	3,0	222	2,51	2,41	-	-	-	-
		2	18	23,4	7,81	5,2	311	2,59	2,85	-	-	-	-
		3	18	23,4	8,75	3,3	327	1,57	2,20	+	-	-	-
		4	18	23,6	7,80	7,7	332	1,92	2,00	-	-	-	-
		5	18	23,3	7,70	8,8	361	1,31	2,30	-	-	-	-
11	3/08/01	1	15	22,8	7,85	6,1	259	2,28	2,54	-	-	-	-
		2	15	23,2	7,84	4,4	340	3,28	3,38	-	-	-	-
		3	15	23,0	8,29	4,6	324	1,79	2,18	-	-	-	-
		4	15	23,0	7,78	7,4	326	1,17	1,88	-	-	-	-
		5	15	23,4	7,83	10,3	336	1,32	2,00	-	-	-	-
12	28/08/01	1	8	23,2	7,83	4,7	343	1,88	2,30	+	-	-	-
		2	8	23,9	7,91	5,1	463	2,72	3,09	-	-	-	-
		3	8	24,0	7,93	6,8	449	1,22	2,00	-	-	-	-
		4	8	23,5	7,78	7,7	442	0,88	1,30	-	-	-	-
		5	8	23,0	7,88	5,9	448	1,38	2,00	+	-	-	-
13	11/09/01	1	33	13,8	7,91	4,5	187	3,72	3,80	-	-	-	-
		2	33	13,8	7,78	5,0	276	3,70	3,80	-	-	-	-
		3	33	14,5	7,69	7,5	279	3,16	3,61	-	-	-	-
		4	33	14,6	7,71	6,9	290	3,06	3,60	-	-	-	-
		5	33	14,7	7,90	7,8	388	2,75	3,47	-	-	-	-
14	16/05/02	1	34	16,1	7,58	2,41	220	2,11	2,40	-	-	-	-
		2	34	15,8	7,88	3,9	295	3,03	2,65	-	-	-	-
		3	34	16,5	7,82	4,01	297	2,16	2,60	-	-	-	-
		4	34	16,1	7,81	3,53	294	1,76	2,78	-	+	-	-
		5	34	15,8	7,75	3,62	295	1,43	2,40	-	-	-	-
15	17/05/02	1	32	18,2	7,41	3,13	225	1,68	2,43	-	-	-	-
		2	32	17,7	7,90	3,53	308	2,74	2,56	-	+	-	-
		3	32	17,5	7,82	3,91	293	1,51	2,30	-	-	-	-
		4	32	17,8	7,68	4,12	292	1,51	2,12	-	-	-	-
		5	32	17,2	7,59	4,06	299	1,50	2,12	-	-	-	-
16	23/05/02	1	29	17,4	8,01	3,8	308	2,37	2,35	-	-	-	-
		2	29	16,8	8,33	5,8	381	3,34	3,02	-	-	-	-
		3	29	17,0	8,37	5,4	433	1,52	2,10	-	-	-	-
		4	29	17,0	8,30	8,1	371	1,56	2,18	-	-	-	-
		5	29	17,2	8,18	5,0	362	1,56	2,00	-	-	-	-
17	28/05/02	1	30	15,4	7,78	4,94	231	2,52	3,08	-	-	-	-
		2	30	15,2	8,03	5,74	360	3,07	3,18	-	-	-	-
		3	30	15,7	8,01	7,55	355	2,46	3,04	-	-	-	-
		4	30	15,5	7,81	6,46	336	2,16	3,08	-	+	-	-
		5	30	15,6	7,77	5,05	340	1,66	2,95	-	-	-	-
18	30/05/02	1	26	16,4	7,98	4,33	253	2,62	2,75	-	-	-	-
		2	26	16,0	8,13	6,02	367	3,02	2,85	-	-	-	-
		3	26	16,6	8,31	4,8	377	1,63	2,94	-	-	-	-
		4	26	16,2	8,06	5,3	366	1,75	2,67	-	-	-	-
		5	26	16,2	8,10	5,08	365	1,21	2,64	-	-	-	-

Prénom, Nom :

Sylvain SKRABER



Nature de la thèse :

**Doctorat de l'Université Henri Poincaré, Nancy I
en Biologie - Santé - Environnement**

VU, APPROUVE et PERMIS D'IMPRIMER n° 800

Nancy, le 10 mars 2003

Le Président de l'Université Henri Poincaré, Nancy I



Claude BURLET

RÉSUMÉ

Actuellement, le contrôle microbiologique du milieu hydrique repose uniquement sur la recherche d'indicateurs bactériens de contamination fécale tels que les coliformes thermotolérants, *E. coli*, les entérocoques et les spores de bactéries anaérobies sulfito-réductrices. Or, ces indicateurs bactériens sont de mauvais indicateurs de la contamination virale. Il est donc nécessaire de définir un ou plusieurs indicateurs qui prennent en compte le risque viral lié au milieu hydrique.

Dans ce contexte, certains bactériophages ont été proposés pour jouer ce rôle. Il s'agit des coliphages somatiques, des bactériophages F-spécifiques et des phages de *Bacteroides fragilis*.

Notre travail a consisté à comparer les informations apportées d'une part par les indicateurs bactériens classiques et d'autre part par les bactériophages afin de déterminer si ces derniers apportent des informations originales en tant qu'indicateur. Ainsi, six microorganismes (coliformes thermotolérants, entérocoques, spores de bactéries anaérobies sulfito-réductrices, coliphages somatiques, bactériophages F-spécifiques et phages de *Bacteroides fragilis*) ont été comparés en tant qu'indicateur d'efficacité des traitements d'épuration des eaux usées, en tant qu'indicateur de la contamination fécale des eaux de rivière et des eaux souterraines et enfin, en tant qu'indicateur de la contamination spécifiquement virale des eaux de rivière.

Notre travail a montré que, en terme d'efficacité de traitement, les indicateurs phagiques n'apportent pas d'informations supplémentaires par rapport aux indicateurs bactériens lorsqu'un traitement biologique classique est analysé qu'il soit ou non suivi d'un traitement tertiaire de déphosphatation. Par contre, lorsqu'un traitement de désinfection par UV est appliqué après un traitement biologique, des différences importantes au niveau de l'abattement de la charge fécale apparaissent. Les spores sont les plus résistantes suivies des phages de *Bacteroides fragilis* et des bactériophages F-spécifiques. Les entérocoques présentent une résistance intermédiaire alors que les coliformes thermotolérants et les coliphages somatiques apparaissent comme les plus sensibles au traitement.

En ce qui concerne l'estimation de la charge fécale dans les eaux de rivière et les eaux souterraines, nous avons introduit la notion d'abattement de la contamination fécale initiale (ACFI). Ceci nous a permis d'évaluer la qualité d'une eau pour chaque indicateur et de constater que, dans l'eau de rivière, les coliformes thermotolérants sous-estiment le niveau de la charge fécale alors que les coliphages somatiques donnent une estimation plus importante de la pollution fécale dans l'espace et le temps. L'explication de ce phénomène a été en partie donnée par les résultats de l'étude de survie réalisée *in vitro* à partir d'échantillons d'eau de la rivière Moselle. Ces résultats démontrent en effet que les coliphages somatiques survivent significativement plus longtemps que les coliformes thermotolérants quelles que soient les conditions expérimentales (température et composition de l'eau).

Au cours de la dernière partie de notre travail consacrée à la contamination virale proprement dite, seuls les coliphages somatiques et les coliformes thermotolérants ont été pris en compte en tant qu'indicateur. Concernant les virus pathogènes, nous avons recherché les entérovirus par culture cellulaire et RT-PCR qualitative (*in situ*) ou quantitative (*in vitro*) ainsi que les Norwalk-like virus par RT-PCR qualitative (*in situ*). Nos résultats *in vitro* montrent que, dans l'eau de rivière, le génome viral peut être considéré soit comme un indicateur de contamination fécale spécifiquement viral qui présente la même écologie que les virus pathogènes infectieux, soit comme un indicateur de la pollution virale qui sur-estime légèrement le risque par rapport aux virus infectieux. L'étude *in situ* dans les eaux de la rivière Moselle, si elle n'a pas permis la mise en évidence d'entérovirus infectieux, a montré que lorsque les concentrations en coliphages somatiques augmentent, la probabilité de détecter du génome viral augmente également ce qui n'est pas le cas avec les coliformes thermotolérants. De plus, nous avons observé que la quasi-totalité des échantillons positifs en génome viral (33/34) est obtenue lorsque la concentration en coliphages somatiques est supérieure à 100 ufp/100mL. Nous proposons donc cette valeur en tant que seuil dans l'évaluation du risque viral dans les eaux de rivière.