

UNIVERSITE DE NANTES
FACULTE DE MEDECINE

Détection moléculaire du parasite
***Cryptosporidium* dans des échantillons d'eau**

THESE DE DOCTORAT

ECOLE DOCTORALE DE CHIMIE-BIOLOGIE

Discipline : Biologie

Spécialité : Parasitologie

Présentée

Et soutenue publiquement par

Mélanie FONTAINE

Le 14 octobre 2003, devant le jury ci-dessous :

Rapporteurs :	M. Loïc FAVENNEC , Professeur, Université de Rouen M. Yves LEVI , Professeur, Université Paris Sud
Examineurs :	Mme Emmanuelle GUILLOT , Docteur, Expert Biologie moléculaire M. Jean-Paul MOISAN , Professeur, INSERM unité 463, Nantes M. Michel MIEGEVILLE , Maitre de Conférences, Université de Nantes Mme Nadine DUMOUTIER , Expert Biologie, Suez Environnement
Directeurs de thèse :	M. Michel MIEGEVILLE , Maitre de Conférences, Université de Nantes M. Jean-Paul MOISAN , Professeur, INSERM unité 463, Nantes

Remerciements

Au terme de ce travail, je souhaiterais remercier Patricia Renaud, directrice de la Recherche et de l'Innovation, Isabelle Venduvre, directrice des Programmes de Recherche et Jean-Michel Lainé, responsable de Pôle d'Expertise et de Recherche Analyse du Centre International de Recherche Sur l'Eau et l'Environnement (CIRSEE) de Suez-Environnement, pour m'avoir accueillie au sein de leur laboratoire.

Mes remerciements vont à mes directeurs de thèse, les Docteurs Michel Miegerville et Emmanuelle Guillot, pour m'avoir apporté leur soutien, leur confiance et leurs conseils scientifiques.

Que Messieurs les Professeurs Yves Levi et Loïc Favennec trouvent ici l'expression de ma considération pour toute l'attention qu'ils ont bien voulu accorder à l'examen de ce travail. De même, je remercie Madame Nadine Dumoutier et le Professeur Jean-Paul Moisan d'avoir accepté de faire partie de ce jury de thèse.

Ce travail a été effectué dans les laboratoires du CIRSEE aujourd'hui scindé en deux entités : laboratoire d'Analyses Lyonnaise Des Eaux France (LDEF) et laboratoire de Recherche Suez-Environnement. Je tiens à remercier toutes les personnes de ces équipes, et notamment l'équipe de biologie moléculaire, pour l'expérience scientifique et humaine qu'elles m'ont apportée dans ce parcours. Je tiens aussi à associer à cette thèse toutes les personnes qui m'ont soutenue, trop nombreuses pour être citées, et qui, je l'espère, se reconnaîtront ici .

Mes derniers remerciements vont à mes parents, à la famille Rey, à Agnès, Romain et Arnaud pour leur soutien de tous les jours.

« Choisir, c'est se priver du reste »

André Gide

Sommaire

<u>INTRODUCTION GÉNÉRALE</u>	1
<u>CHAPITRE I. SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE</u>	7
1. LE GENRE <i>CRYPTOSPORIDIUM</i>	7
1.1. <i>Historique</i>	7
1.2. <i>Taxonomie</i>	8
1.3. <i>Cycle de vie</i>	11
1.4. <i>Morphologie</i>	13
1.5. <i>Prévalence</i>	15
1.6. <i>La cryptosporidiose</i>	17
1.7. <i>Diagnostic</i>	18
1.8. <i>Traitement</i>	19
1.9. <i>Transmission</i>	19
1.10. <i>Pouvoir infectieux</i>	20
2. <i>CRYPTOSPORIDIUM DANS LES EAUX</i>	22
2.1. <i>La législation concernant la qualité des eaux propres destinées à la consommation</i>	22
2.1.1. <i>Recommandations de l'O.M.S.</i>	22
2.1.2. <i>En Europe</i>	22
2.1.3. <i>Aux Etats-Unis</i>	24
2.2. <i>Origine des contaminations</i>	25
2.3. <i>Occurrence</i>	26
2.4. <i>Survie dans l'environnement</i>	28
2.5. <i>Les épidémies hydriques à Cryptosporidium</i>	29
2.5.1. <i>Historique</i>	29
2.5.2. <i>L'exemple de la crise de Sydney de 1998</i>	32
2.6. <i>Traitements des eaux vis-à-vis de l'élimination des oocystes de Cryptosporidium</i>	33
2.6.1. <i>Rappels sur le traitement des eaux de consommation</i>	34
2.6.2. <i>Evaluation des traitements usuels sur Cryptosporidium</i>	35
a) <i>Les traitements physiques</i>	35
b) <i>Les traitements chimiques</i>	37
2.6.3. <i>Estimation du risque potentiel dû à la présence d'oocystes de Cryptosporidium dans l'eau</i>	38
2.7. <i>Difficultés liées à la détection des Cryptosporidium dans l'eau</i>	42
3. <i>LES DIFFÉRENTES APPROCHES DE DÉTECTION DE CRYPTOSPORIDIUM DANS L'ENVIRONNEMENT</i>	43
3.1. <i>Les méthodes conventionnelles</i>	43
3.1.1. <i>La méthode de référence USEPA 1622</i>	44
a) <i>Concentration initiale des oocystes</i>	44
b) <i>Elution et concentration</i>	45
c) <i>Purification des oocystes par séparation immuno-magnétique (IMS)</i>	45
d) <i>Coloration</i>	47

e) Détection - Quantification	48
3.1.2. La méthode française NF T 90-455	49
3.1.3. La méthode anglaise du DWI	50
3.1.4. Les limites	51
3.2. Méthodes alternatives non moléculaires	51
3.2.1 Alternatives pour la quantification des oocystes	52
a) Concentration initiale	52
Les membranes de filtration	52
La floculation	53
b) Purification des oocystes	53
La purification par gradient de densité ou flottation	53
La purification par cytométrie de flux	54
FCCS (Flow Cytometry and Cell Sorting)	54
c) Détection	54
Techniques Immunologiques de type ELISA	54
Cytométrie à balayage de type Chemsan® RDI	55
3.2.2. Méthodes ciblant la « viabilité »	55
a) Coloration au DAPI-PI	56
b) L'excystation in vitro	56
3.2.3. Méthodes ciblant le caractère infectieux	57
a) L'inféctiosité chez l'animal	57
b) La culture cellulaire	57
3.3. Méthodes moléculaires	60
3.3.1. Détection moléculaire	60
a) Détection de type présence/absence	60
b) Génotypage	61
c) Quantification	61
La PCR compétitive et comparative	61
La PCR en temps réel	62
3.3.2. Méthodes moléculaires et « viabilité »	64
a) Fluorescent Hybridation In Situ (FISH)	64
b) Reverse Transcription PCR (RT-PCR)	65
c) In vitro excystation PCR / RT-PCR	65
3.3.3. Méthodes moléculaires et caractère infectieux	65

CHAPITRE II. LA PCR EN TEMPS RÉEL, UN OUTIL QUANTITATIF POUR L'ANALYSE SPÉCIFIQUE DE C. PARVUM 68

1. INTRODUCTION	68
2. MATÉRIEL ET MÉTHODES	72
2.1. Le principe TaqMan	72
2.2. Notion de cycle seuil ou threshold cycle (Ct)	74
2.3. Choix de la séquence cible	75
2.4. Choix des sondes et des amorces	75
2.5. Production de plasmides recombinants contenant la séquence Laxer	77
2.6. Application du test à des oocystes de <i>Cryptosporidium</i>	80
2.6.1. Solutions stocks d'oocystes et d'ADN de <i>Cryptosporidium</i>	80
2.6.2. Détermination de la concentration en oocystes	80
2.6.3. Extraction d'ADN à partir d'une suspension d'oocystes	81
2.7. Conditions d'amplification en PCR classique	81

2.7.1. Préparation du mélange réactionnel	81
2.7.2. Conditions d'amplification	82
2.7.3. Analyse des résultats	82
2.8. Conditions d'amplification en TaqMan PCR	83
2.8.1. Préparation du mélange réactionnel	83
2.8.2. Conditions d'amplification	83
2.8.3. Analyse des données	84
3. RÉSULTATS	85
3.1. Choix des amorces et de la sonde TaqMan	85
3.2. Optimisation de l'amplification	88
3.3. Spécificité des amorces et de la sonde utilisées	93
3.4. Sensibilité et linéarité du test TaqMan PCR	94
3.5. Adaptation du test TaqMan PCR à des suspensions d'oocystes purifiés	96
3.6. Optimisation de la lyse des oocystes	100
3.7. Réalisation d'une gamme étalon à partir de lysats d'oocystes purifiés	101
4. DISCUSSION-CONCLUSION	103

CHAPITRE III. LE TEST TAQMAN PCR ADAPTÉ À DES ÉCHANTILLONS D'EAU. 108

1. INTRODUCTION	108
2. MATÉRIEL ET MÉTHODES	110
2.1. Quantification des oocystes	110
2.2. Filtration et concentration d'échantillons d'eau dopés	110
2.3. Lyse et purification d'ADN issus de concentrats d'eaux traitées ou d'eaux de surface	113
2.3.1. Les colonnes échangeuses d'ions	113
2.3.2. Les billes magnétiques de purification d'ADN génomique	114
2.4. Séparation immuno-magnétique des oocystes issus de concentrats d'eaux, extraction et purification d'ADN	115
2.4.1. Séparation Immuno-Magnétique (IMS)	115
2.4.2. Lyse thermique des oocystes	116
2.4.3. Purification du lysat par filtration sur colonne Nanosep®	116
2.5. Gamme d'étalonnage	117
2.6. Conditions d'amplification en TaqMan PCR	117
3. RÉSULTATS	119
3.1. Choix d'une méthode de purification	119
3.1.1. Tests préliminaires par IMS-lyse thermique	119
3.1.2. Les colonnes échangeuses d'ions	119
3.1.3. Les billes magnétiques pour la purification d'ADN génomique	121
3.1.4. IMS, Lyse thermique des oocystes et purification par filtration sur Nanosep®	122
3.2. Détermination d'une gamme étalon pour la quantification d'oocystes de <i>C. parvum</i> contenus dans des échantillons d'eau	123
3.3. Influence de l'addition de l'étape d'IMS au test TaqMan PCR	126
3.4. Analyse par TaqMan PCR d'échantillons d'eau dopés	127
4. DISCUSSION-CONCLUSION	130

CHAPITRE IV. CONSTRUCTION D'UN TEST QUANTITATIF CIBLANT LA VIABILITÉ DES OOCYSTES DE *CRYPTOSPORIDIUM* VIA LES ARNR 18S 136

1. INTRODUCTION.....	136
2. MATÉRIEL ET MÉTHODES.....	139
2.1. Solutions stocks d'oocystes et d'ADN de <i>Cryptosporidium</i>	139
2.2. Alignements de séquences d'ARN ribosomal 18S.....	139
2.3. Choix des amorces et des sondes TaqMan.....	140
2.3.1 Test TaqMan RT-PCR ciblant le genre <i>Cryptosporidium</i>	141
2.3.2. Test TaqMan RT-PCR ciblant l'espèce <i>C. parvum</i>	141
2.4 Préparation de l'échantillon.....	142
2.4.1. Lyse des oocystes et Extraction de l'ARN.....	144
2.4.2. Traitement DNase.....	144
2.4.3. Validation de l'extraction des ARN totaux extraits.....	144
2.5. Test TaqMan RT-PCR.....	145
2.5.1. Transcription inverse.....	145
2.5.2 Amplification des ADNc en TaqMan RT-PCR.....	146
2.6. Adaptation du test à des échantillons d'eau.....	147
2.6.1. Dopages d'échantillons d'eau.....	147
2.6.2. Capture par IMS.....	147
2.6.3. Gamme étalon de référence.....	147
3. RÉSULTATS.....	148
3.1. Alignements des séquences d'ARNr 18S.....	148
3.2. Choix des amorces et des sondes TaqMan.....	152
3.3. Vérification de la spécificité des tests TaqMan RT-PCR sélectionnés.....	153
3.4. Validation de la lyse et de l'extraction des ARN par le kit RNeasy®.....	155
3.5. Sensibilité du test et gamme d'amplification TaqMan RT-PCR.....	156
3.6. Influence de l'addition de l'étape d'IMS au test TaqMan RT-PCR.....	158
3.7. Analyse en TaqMan RT-PCR d'échantillons d'eau dopés.....	160
4. DISCUSSION-CONCLUSION.....	161

CHAPITRE V. ETUDE DE LA STABILITÉ DES ARNR 18S ET DE L'ADNR 18S VIS À VIS DE TRAITEMENTS À LA CHALEUR 168

1. INTRODUCTION.....	168
2. MATÉRIEL ET MÉTHODES.....	170
2.1. Solutions stocks d'oocystes et d'ADN de <i>Cryptosporidium</i>	170
2.2. Lyse et extraction d'ADN.....	170
2.2.1. Lyse.....	170
2.2.2. Purification d'ADN.....	170
2.2. Lyse et extraction d'ARN.....	170
2.3. Transcription inverse des ARN.....	171
2.4. Conditions d'amplification en TaqMan PCR.....	171
2.5 Plan d'expérience.....	172
2.5.1. Analyse d'ADNr et d'ARNr 18S après traitements d'oocystes de <i>C. parvum</i> à la chaleur.....	174
2.5.2. Analyse d'ADNr et d'ARNr 18S à différentes températures après lyse des oocystes de <i>C. parvum</i> par chocs thermiques.....	175
2.5.3. Analyse d'ADNr et d'ARNr 18S après traitement par autoclave d'oocystes de <i>C. parvum</i>	175
3. RÉSULTATS.....	177

<i>3.1. Etude de la stabilité des ADNr et ARNr 18S issus d'oocystes traités à la chaleur</i>	177
<i>3.2. Evaluation de la stabilité des ARNr 18S et ADNr 18S issus d'oocystes lysés par chocs thermiques</i>	179
<i>3.3. Etude de la dégradation des ADNr et des ARNr18S après traitement des oocystes par autoclave</i>	183
<u>4. DISCUSSION-CONCLUSION</u>	185
 <u>CONCLUSION ET PERSPECTIVES</u>	 190
 <u>RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES</u>	 198
 <u>ANNEXES</u>	 216
<u>COMPOSITION DES MILIEUX</u>	216
<u>PROTOCOLE DE SÉPARATION IMMUNO-MAGNÉTIQUE (IMS)</u>	219
<u>PUBLICATIONS</u>	221

Liste des Figures

- Figure 1** : Classification phylogénique de *Cryptosporidium* (d'après Levine, 1984)
- Figure 2** : Diagramme illustrant la transmission potentielle des géotypes majeurs et des espèces de *Cryptosporidium* (d'après un dessin de Marshall et LaMont, 1997).
- Figure 3** : Cycle évolutif de *Cryptosporidium* sp chez l'homme (d'après Current et Garcia, 1991).
- Figure 4** : Structure schématique d'un oocyste de *Cryptosporidium* (Upton et Current, 1985)
- Figure 5** : Degré de risque lié à *Cryptosporidium*
- Figure 6** : Cycle de contamination du milieu hydrique (d'après Schwartzbrod, 1991).
- Figure 7** : Récapitulatif de l'efficacité des UV sur divers micro-organismes (Janex *et al.*, 2001)
- Figure 8** : Echelle de risque en fonction du type d'eau et valeurs indicatives des concentrations en *Cryptosporidium* associées pour 100 l (d'après Charles *et al.*, 2000)
- Figure 9** : Abattement (élimination physique ou inactivation) par procédé de traitement exprimé en nombre de Log (d'après Charles *et al.*, 2000)
- Figure 10** : Diagramme de risque (d'après Charles *et al.*, 2000)
- Figure 11** : Principe général de la Séparation Immuno Magnétique (IMS) (Dynal, France).
- Figure 12** : Cinétiques d'amplifications obtenues en TaqMan PCR sur 96 répliques initialement identiques.
- Figure 13** : Courbes théorique et expérimentale de l'amplification par PCR
- Figure 14** : Principe de la PCR en temps réel (Applied Biosystems) et schéma d'une sonde nucléotidique TaqMan®.
- Figure 15** : Courbe d'amplification type (en bleu : témoin négatif d'amplification).
- Figure 16** : Schématisation des étapes pour le clonage du fragment génomique « Laxer ».
- Figure 17** : Protocole d'extraction et de purification plasmidique GFX™
- Figure 18** : Optimisation du test TaqMan PCR à partir d'ADN plasmidique (Plax) en fonction de la concentration en $MgCl_2$, (n=3).
- Figure 19** : Optimisation du test TaqMan PCR à partir d'ADN plasmidique (Plax) en fonction de la concentration en amorces.
- Figure 20** : Optimisation du test TaqMan PCR à partir d'ADN plasmidique (Plax) en fonction de la concentration en sonde.

- Figure 21** : Spécificité du test TaqMan PCR vis-à-vis de différentes espèces de *Cryptosporidium* (*C. meleagridis*, *C. baileyi*, *C. felis*, *C. muris*)
- Figure 22** : Spécificité du test TaqMan PCR vis-à-vis de différentes espèces de *Cryptosporidium* (*C. serpentis*, *C. wrairi*, *C. muris*).
- Figure 23** : Courbes d'amplification obtenues pour des solutions contenant de 6.10⁹ à 6 copies de plasmide PLax.
- Figure 24** : Gamme étalon résultante des Ct obtenus en Figure 23.
- Figure 25** : Optimisation du test TaqMan PCR sur des lysats d'oocystes. Amplifications en présence (courbes vertes) ou en absence (courbes rouges) d'HCl 0.1N; n=3.
- Figure 26** : Optimisation du test TaqMan PCR sur des lysats d'oocystes de *C. parvum* en fonction de la concentration en amorces.
- Figure 27** : Optimisation du test TaqMan PCR sur des lysats d'oocystes de *C. parvum* en fonction de la concentration en MgCl₂.
- Figure 28** : Effet du Chelex-100 additionné avant la lyse de 105 oocystes de *C. parvum* par chocs thermiques. a : amplifications avec l'addition de Chelex-100 avant la lyse. b : amplifications sans Chelex-100 ; NTC : contrôle négatif ; n=5.
- Figure 29** : Amplification d'une gamme d'oocystes de *C. parvum* lysés par chocs thermiques en présence de Chelex-100 (25%) (n=5). Génération d'une gamme étalon à partir des Ct obtenus.
- Figure 30** : Représentations schématiques des protocoles de filtration. A : filtration d'eau de réseau (eau potable); B : filtration d'eau de surface (eau de Seine).
- Figure 31** : Purification d'ADN génomique par QIAamp DNA stool mini kit
- Figure 32** : Purification d'ADN génomique total par capture magnétique (Dynabeads® DNA DIRECT™ Universal)
- Figure 33** : Volumes d'élution utilisés lors de l'étape finale de la purification, facteurs de dilution associés.
- Figure 34** : Quantité d'oocystes récupérés (corrigée par le facteur de dilution) pour chaque volume d'élution testé (n = 3 ou 4).
- Figure 35** : Construction d'une nouvelle gamme étalon obtenue après lyse thermique des oocystes et purification des ADN sur colonne Nanosep®
- Figure 36** : Gamme obtenue après addition de l'étape de purification par IMS avant lyse thermique des oocystes et purification des ADN sur colonne Nanosep®
- Figure 37** : Comparaison des pourcentages de récupération en oocystes de *C. parvum* obtenus avec différentes quantités de dopage pour différents types d'échantillons.
- Figure 38** : Relation phylogénique, par l'algorithme du Neighbour Joining, entre les différentes espèces et « génotypes » de *Cryptosporidium* basée sur l'analyse de la séquence complète d'ADNr 18S. La barre d'échelle indique

le nombre de substitutions par site (Egyed *et al.*, 2003).

- Figure 39** : Schématisation d'une sonde TaqMan-MGB (Applied Biosystems). R : fluorochrome émetteur ou Reporter, Q-NFQ : molécule « suppresser » (Quencher) Non-Fluorescente.
- Figure 40** : Extraction et purification d'ARN à l'aide du kit de purification d'ARN total RNeasy® (Qiagen S.A., Courtaboeuf, France).
- Figure 41** : Définition du couple d'amorces et de la sonde TaqMan spécifiques au genre *Cryptosporidium*.
- Figure 42** : Définition du couple d'amorces et de la sonde TaqMan spécifiques de l'espèce *C. parvum*.
- Figure 43** : Amplifications obtenues sur différentes espèces de *Cryptosporidium* pour le test TaqMan RT-PCR « *Cryptosporidium* Genre ».
- Figure 44** : Spécificité du test TaqMan RT-PCR pour l'amplification de différentes espèces de *Cryptosporidium*.
- Figure 45** : Amplification d'une gamme d'oocystes de *C. parvum* correspondant à des dilutions au dixième de 8.4×10^3 à 5 oocystes. Pour chaque dilution, quatre répétitions ont été effectuées ($n=4$; $r^2=0.98$).
- Figure 46** : Gamme étalon résultant des amplifications par TaqMan RT-PCR
- Figure 47** : Gammes d'amplification obtenues
- Figure 48** : Résumé du plan d'expérience pour les tests par traitements thermiques
- Figure 49** : Ct obtenus résultant d'amplifications en TaqMan PCR. Les oocystes en suspension ont été chauffés à 95°C puis traités immédiatement ou après 30 ou 60 minutes par une lyse-extraction d'ADN ou d'ARN.
- Figure 50** : Comparaison des valeurs de Ct obtenus après amplification en TaqMan RT-PCR de suspensions d'oocystes chauffées à 95°C ou 65°C.
- Figure 51** : Comparaison des valeurs de Ct (moyennes) obtenues par RT-TaqMan PCR pour des oocystes de *C. parvum* lysés préalablement par chocs thermiques en absence de Chelex-100.
- Figure 52** : Comparaison des valeurs de Ct (moyennes) obtenues par RT-TaqMan PCR pour des oocystes de *C. parvum* lysés préalablement par chocs thermiques en présence de Chelex-100.
- Figure 53** : Moyenne des Ct obtenus pour chaque essai sur des oocystes traités à l'autoclave. Chaque point représente la moyenne de 5 répliques.
- Figure 54** : Récapitulatif de la méthode TaqMan PCR

Liste des Tableaux

Tableau I	: Exemples de concentration en <i>Cryptosporidium</i> dans différentes eaux (d'après Amar et Dumoutier, 1992, Lesné, 2001)
Tableau II	: Les épidémies hydriques à <i>Cryptosporidium</i> , un bref historique
Tableau III	: Efficacité, exprimée en réduction logarithmique décimale, des étapes de traitement de l'eau concernant l'élimination de <i>Cryptosporidium</i> sp., en fonction de la turbidité en sortie d'étape de traitement (d'après Baudin <i>et al.</i> 2001, rapport interne).
Tableau IV	: Efficacité de traitements chimiques des eaux au regard des <i>Cryptosporidium</i> (Baudin <i>et al.</i> 2001)
Tableau V	: Rendement de récupération d'oocystes de <i>Cryptosporidium</i> en fonction du volume de culot (eau de Seine dopée), (Lorthioy et Dumoutier, 1999)
Tableau VI	: Récapitulatif des trois méthodes normalisées (américaine USEPA 1622, anglaise DWI et française NFT 90-455)
Tableau VII	: Récapitulatif des méthodes de détection non moléculaires adaptées à <i>Cryptosporidium</i>
Tableau VIII	: Récapitulatif des méthodes de détection moléculaires adaptées à <i>Cryptosporidium</i>
Tableau IX	: Amorces d'amplification de PCR de la séquence « Laxer » spécifique de <i>C. parvum</i> .
Tableau X	: Composition des Mix de PCR (volume final de 50 µl).
Tableau XI	: Conditions d'amplification en PCR
Tableau XII	: Composition des Mix de TaqMan PCR (Volume final de 50 µl).
Tableau XIII	: Conditions d'amplification en TaqMan PCR.
Tableau XIV	: Séquences des sondes TaqMan PCR sélectionnées
Tableau XV	: Séquences des couples d'amorces sélectionnés
Tableau XVI	: Obtention (+) ou non (-) d'une amplification (n=3).
Tableau XVII	: Récapitulatif sur le couple d'amorces et de la sonde TaqMan sélectionnés.
Tableau XVIII	: Nomenclature des combinaisons en concentrations d'amorces testées. R : amorce R171, F : amorce F34.
Tableau XIX	: Nomenclature des combinaisons en concentrations d'amorces testées. R : amorce anti-sens (Reverse), F : amorce sens (Forward).

Tableau XX	: Récapitulatif des concentrations finales en composants optimisées pour l'amplification de solutions d'oocystes de <i>C. parvum</i> lysés (volume final 50 µl).
Tableau XXI	: Caractéristiques de la cartouche Envirochek®
Tableau XXII	: Gamme de colonnes à centrifuger Nanosep®
Tableau XXIII	: Mix réactionnel d'amplification (volume final = 50 µl)
Tableau XXIV	: Conditions d'amplification en TaqMan PCR.
Tableau XXV	: Test de la répétabilité et de la reproductibilité des gammes étalon obtenues à partir de gammes de dilutions en oocystes.
Tableau XXVI	: Quantités d'oocystes de <i>C. parvum</i> récupérées après dopages d'eau du robinet et d'eau de surface
Tableau XXVII	: Composition des Mix de transcription inverse
Tableau XXVIII	: Conditions d'amplification en TaqMan PCR.
Tableau XXIX	: Mix réactionnel d'amplification
Tableau XXX	: Conditions d'amplification en TaqMan PCR.
Tableau XXXI	: Légende des Figure 41 et Figure 42
Tableau XXXII	: Sondes et amorces retenues pour le test TaqMan RT-PCR spécifique au genre <i>Cryptosporidium</i> .
Tableau XXXIII	: Récapitulatif des amorces et sondes retenues.
Tableau XXXIV	: Amplifications obtenues après extraction des ARN. Le traitement DNase est systématiquement intégré dans l'extraction par RNeasy®. Le traitement RNase a été ajouté avant l'amplification.
Tableau XXXV	: Quantités d'oocystes de <i>C. parvum</i> récupérées après dopages d'eau du robinet (20l)
Tableau XXXVI	: Mix réactionnel d'amplification (Volume final de 50µl).
Tableau XXXVII	: Conditions d'amplification en TaqMan PCR.

Liste des Photos

- Photo 1** : Oocyste de *Cryptosporidium* vu en microscopie électronique à balayage (d'après Miegeville, CHU Nantes)
- Photo 2** : Oocystes de *Cryptosporidium* colorés par la méthode de Ziehl-Nielsen modifiée
- Photo 3** : Cartouche Envirochek (Pall, France)
- Photo 4** : Agitateur pour cartouches
- Photo 5** : Oocyste de *Cryptosporidium* (à gauche) lié à une bille magnétique (à droite) par interactions antigène-anticorps. Vue en microscopie électronique à balayage (Miegeville M., CHU de Nantes).
- Photo 6** : Oocystes de *Cryptosporidium* marqués par immunofluorescence et visualisés sous microscope optique (CIRSEE, Suez-Environnement) (x400).
- Photo 7** : Oocystes de *Cryptosporidium* visualisés sous microscope (CIRSEE, Suez-Environnement).
- Photo 8** : ABI Prism™ 7700 sequence detection systems (Applied Biosystems)
- Photo 9** : Résultats des amplifications obtenues avec les différents couples d'amorces en PCR classique.

Liste des Abréviations

A	Absorbance
Ac	anticorps
ADN	acide désoxyribonucléique
ADNr 18S	gène codant pour la sous-unité 18S de l'acide ribonucléique
AFNOR	Agence Française de Normalisation
Ag	antigène
ARNr 18S	sous unité 18S de l'acide ribonucléique
β-Gal	β-galactosidase
CIRSEE	Centre International de Recherche sur l'Eau et l'Environnement
Ct	threshold cycle
CV	Coefficient de Variation
dATP	desoxyriboadénosine triphosphate
dCTP	desoxyribocytosine triphosphate
dGTP	desoxyriboguanidine triphosphate
dNTP	desoxyribonucleotide triphosphate
DO	densité optique
dTTP	deoxyribothymidine triphosphate
DWI	Drinking Water Inspectorate
EPA	Environment Protection Agency
FAM	6-carboxyfluoresceine
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
HSP	protéine de chocs thermiques
IFA	Immunofluorescence Assay
IMS	séparation immuno-magnétique
MGB	Minor Groove Binder
moy	moyenne
NF	Norme Française
NFQ	Non Fluorescent Quencher
NTC	Non Template Control
NTU	Nephelometric Turbidity Unit
pb	paire de base
PBS	Phosphate Buffered Saline
PCR	Polymerase Chain Reaction
PLax	plasmide recombinant contenant la séquence Laxer
p/v	poids sur volume
RT	Reverse Transcription
RFLP	Restriction Fragment Length Polymorphism
TAMRA	6-carboxy-tetramethyl-rhodamine
Tm	température de dissociation
UNG	Uracil N-glycosidase
USEPA	United States Environmental Protection Agency
UV	Ultra violet
X-Gal	5-bromo-4-chloro-3-indolyl-beta-D-galatoside

Introduction Générale

Lorsque les microbiologistes se sont intéressés à la recherche des pathogènes dans les eaux, plusieurs difficultés sont apparues du fait principalement de la diversité des micro-organismes, des grands volumes d'eau nécessaires aux analyses et des procédures analytiques complexes devant être mises en œuvre. Afin d'éviter une recherche complète de tous les micro-organismes pathogènes, il a été décidé de se limiter à l'analyse d'organismes « indicateurs » de contamination fécale et/ou d'efficacité de traitement. Cependant, la survenue d'épidémies d'origine hydrique avec des eaux tout à fait conformes à la législation en vigueur a relancé la recherche spécifique de pathogènes ayant des comportements différents des organismes « indicateurs ». C'est le cas par exemple des parasites et en particulier de *Cryptosporidium*.

Cryptosporidium est un protozoaire parasite et cosmopolite responsable de symptômes bénins de type diarrhées, vomissements, fièvre et douleurs abdominales évoluant spontanément vers une guérison chez les sujets immunocompétents. Par contre, chez les personnes immunodéprimées, une déshydratation sévère consécutive à l'amplification des symptômes peut entraîner la mort sachant qu'il n'existe pas à ce jour de traitement antimicrobien efficace contre ce parasite (Current et Garcia, 1991). Parmi les différentes espèces du genre *Cryptosporidium* répertoriées à ce jour, *C. parvum* est généralement considéré comme l'espèce pathogène de l'homme (Fayer *et al.*, 2000). Ce parasite possède une DMI (Dose Minimale Infectieuse) pouvant être très faible (<10) et variant selon la sensibilité de l'hôte et/ou la souche (Dupont *et al.*, 1995; Okhuysen *et al.*, 1999). La dissémination fécale dans l'environnement de la forme enkystée de ce parasite, dénommée oocyste, est la principale source de contamination. Ces oocystes, forme de résistance du parasite, possèdent une survie estimée à 6 mois environ dans l'eau (Robertson *et al.*, 1992) et une grande résistance face aux traitements classiques de désinfection des eaux (en particulier à la chloration) (Korich *et al.*, 1990).

La présence de *Cryptosporidium* dans les eaux constitue à l'heure actuelle un problème sanitaire majeur auquel sont confrontés les industriels de l'eau et les autorités

sanitaires. D'une part, ce parasite intestinal est responsable de nombreuses épidémies de gastro-entérites d'origine hydrique. Parmi ces épidémies, celle de Milwaukee (USA, avril 1993) a été la plus spectaculaire puisque plus de 400 000 cas de cryptosporidioses, entraînant une centaine de morts, ont été répertoriés (Mac Kenzie *et al.* 1994). D'autre part, l'augmentation importante du nombre de personnes à risque principalement due à l'extension du SIDA font de ce parasite un sujet majeur de préoccupation dans le domaine de l'eau. Aussi, de nombreux efforts ont été déployés ces dernières années pour mettre au point des méthodes de quantification de plus en plus performantes et prendre en compte ce parasite dans la réglementation. Pour exemple, l'Angleterre a été le premier pays à légiférer spécifiquement sur ce parasite en imposant, depuis 1999, l'utilisation d'une méthode normalisée pour un suivi strict des eaux associé à un seuil limite sévère de 1 oocyste pour 10 litres.

Les méthodes classiques de quantification des oocystes de *Cryptosporidium* sont basées sur un marquage immuno-fluorescent et une détection du parasite sous microscope optique. Compte-tenu de la faible concentration du parasite dans l'eau, des étapes de concentration des échantillons et de purification des oocystes sont effectuées au préalable. Ce type de méthode est à ce jour le plus utilisé pour l'analyse de *Cryptosporidium* et est déjà normalisé dans 3 pays (USEPA, 1998; DWI, 1999; AFNOR, 2001). Cependant, cette technique, bien que quantitative, présente l'inconvénient majeur d'être non-spécifique de l'espèce pathogène *C. parvum*. De plus, elle s'avère fastidieuse, non-automatisable et l'observation microscopique reste très subjective. Aujourd'hui, le développement des outils de biologie moléculaire ouvre de nouvelles possibilités de méthodes de détection de *Cryptosporidium* hautement spécifiques, sensibles et rapides pouvant répondre aux besoins des industriels de l'eau et de la santé publique.

Au démarrage de cette étude, le CIRSEE venait de finaliser la mise au point d'une méthode de PCR ciblant spécifiquement l'espèce *C. parvum* et adaptée à la détection de ce parasite dans des échantillons d'eaux (Hallier-Soulier et Guillot, 1999; 2000). Cette technique de PCR s'est révélée extrêmement performante pour détecter avec rapidité, sensibilité et fiabilité les oocystes de *C. parvum* et a vite séduit une entreprise de l'eau telle que Suez Environnement-Lyonnaise des Eaux en terme d'évaluation du risque sanitaire. Cette nouvelle technique de PCR restant malheureusement qualitative, l'entreprise a rapidement souhaité disposer d'un test de biologie moléculaire quantitatif

pour la détection de *C. parvum* afin de réunir, en une seule méthode analytique, les différents avantages des techniques déjà existantes au laboratoire.

Parmi les techniques de pointe de la biologie moléculaire, le développement de la TaqMan PCR ou PCR quantitative en temps réel avait les capacités à résoudre cette problématique. Le laboratoire a donc investi dans un appareil «ABIprism 7700» (Applied Biosystems). Cet appareil, composé d'un thermocycleur couplé à un système de détection d'intensité de fluorescence, permet d'évaluer en temps réel la quantité de fragments d'ADN amplifiés et accumulés durant une PCR par l'utilisation de la chimie TaqMan. Celle-ci est basée sur la reconnaissance spécifique entre une sonde fluorescente et le brin d'ADN amplifié (Heid *et al.*, 1996; Livak *et al.* 1995). Cette technologie présente l'avantage de quantifier, de façon reproductible, un micro-organisme cible sur une large gamme dynamique. De plus, cette méthode est moins laborieuse et permet de travailler en tubes fermés diminuant ainsi les risques de contamination provoqués généralement par les manipulations post PCR.

Le présent travail a eu pour premier objectif de développer un test moléculaire quantitatif pour la détection spécifique des oocystes de *C. parvum* dans des échantillons d'eau en utilisant l'approche TaqMan PCR. Ce test devait comporter une étape de préparation de l'échantillon par la concentration des échantillons d'eau suivie d'une purification et d'une quantification de *C. parvum* par TaqMan PCR. Il devait, de plus, respecter des critères de performance (rendement, reproductibilité, sensibilité...) en comparaison avec les méthodes existantes et répondre aux exigences d'une utilisation future en travail de routine en terme de praticabilité (facilité de mise en œuvre, délai de réponse...).

Dans un deuxième temps, nous avons eu pour objectif de développer un test « viabilité » visant à différencier les parasites morts des vivants, de manière à mieux apprécier le risque sanitaire réel posé par la présence de ces parasites. Les approches traditionnelles déjà existantes présentent en effet de nombreux inconvénients, en particulier, d'être peu sensibles ou peu adaptées à une utilisation en routine. Nous avons donc choisi de construire un test TaqMan RT-PCR où nous avons ciblé les ARNr 18S comme marqueurs de viabilité pour leurs nombreux avantages en terme de quantité, synthèse endogène et taxonomie bien référencée.

Ces 2 méthodes pourront participer activement à une meilleure connaissance du parasite *Cryptosporidium* et améliorer ainsi la protection du consommateur et particulièrement les populations sensibles en permettant notamment d' :

- optimiser et fiabiliser le contrôle sanitaire de l'eau,
- analyser la qualité des ressources et identifier les ressources à risques,
- optimiser l'efficacité des traitements de désinfection (chloration, traitements UV, ozonation...).

Nous avons débuté ce mémoire par une étude bibliographique nous permettant de décrire ce parasite et sa problématique dans l'eau puis de faire un bilan sur la multitude de méthodes adaptées à sa détection.

Les travaux développés s'articulent autour de deux approches (TaqMan PCR et TaqMan RT-PCR) faisant l'objet de quatre chapitres :

- la mise au point d'un test quantitatif TaqMan spécifique et adapté à la quantification des oocystes de *C. parvum*,
- l'adaptation de ce test TaqMan PCR à des échantillons d'eaux traitées et d'eaux brutes en ajoutant des étapes de purification efficaces et compatibles avec la technologie TaqMan. L'ensemble de la méthode a ensuite été évaluée par dopage d'eau de réseau (eau du robinet) ou d'eau de surface (eau de Seine) avec des quantités connues d'oocystes de *C. parvum*,
- la mise au point d'un test quantitatif « viabilité » TaqMan RT-PCR ciblant les ARNr 18S des oocystes de l'ensemble du genre *Cryptosporidium* ou spécifiquement de l'espèce *Cryptosporidium parvum*. L'ensemble a ensuite été adapté à l'analyse d'échantillons d'eau,
- l'évaluation de la persistance des ARNr 18S et des ADNr 18S face à des traitements de type traitements thermiques par l'utilisation du test TaqMan RT-PCR développé précédemment.

La conclusion générale permettra de rappeler l'ensemble des résultats obtenus et ouvrira sur des perspectives à plus ou moins long terme concernant les expériences à mener au stade laboratoire ainsi que les possibilités de mise en œuvre de l'outil développé à plus grande échelle.

Ce travail de thèse a fait l'objet de trois publications :

- Fontaine, M. and Guillot, E., (2002). *Development of a TaqMan quantitative PCR assay specific for Cryptosporidium parvum*. *FEMS Microbiol Lett.* 214, 13.
- Fontaine, M. and Guillot, E., (2003). *An ImmunoMagnetic Separation- Real-Time PCR method for quantification of Cryptosporidium parvum in water samples*. *J. of Microbiological Methods* vol.54 issue 1, 29-36.
- Fontaine, M. and Guillot, E., (2003). *Study of the decay of 18S rRNA and DNA measured by real-time RT-PCR from heat inactivated Cryptosporidium parvum oocysts*. *FEMS Microbiol Lett*, accepté pour publication le 3/7 2003, sous presse.

ainsi que de trois communications orales à comité de lecture et un poster :

- Fontaine, M. and Guillot, E. (2001). *Molecular detection and quantitation of Cryptosporidium parvum parasites in water using ImmunoMagnetic Separation -PCR and Real-time quantitative PCR*. *IWA 2nd World Water Congress*, Berlin.
- Fontaine M. and Guillot E. (2001). *Development of a quantitative Real-time PCR assay for Cryptosporidium parvum in water samples*. *American Water Works Association, WQTC meeting*, Nashville.
- Guillot E., Courtois S., Castel N., Fontaine M., Lainé JM., (2003). *New molecular biology tools for safe drinking water : application to waterborne parasites, Cryptosporidium and Microsporidia*. *IWA Drinking Water and Wastewater Congress*, Noordwijk/Amsterdam.
- Fontaine, M. Miegerville, M. et Guillot, E. (2002). *Développement d'un test quantitatif basé sur la PCR en temps réel pour la détection de Cryptosporidium parvum dans l'eau*, *Forum des doctorants*, Nantes.

Chapitre I. Synthèse Bibliographique

1. Le genre *Cryptosporidium*

1.1. Historique

Identifié pour la première fois en 1907 par Tyzzer chez la souris (Tyzzer, 1907), *Cryptosporidium* ne fut reconnu comme une cause potentielle de diarrhées chez l'oie qu'en 1955 (Slavin, 1955) puis chez le cochon en 1971 (Vetterling *et al.*, 1971) et le veau en 1974 (Meuten *et al.*, 1974). Ce n'est qu'en 1976 que les deux premiers cas humains de cryptosporidioses ont été décrits, l'un chez un sujet normal, l'autre chez un sujet immunodéprimé (Meisel *et al.*, 1976; Nime *et al.*, 1976). Le réel danger de ce parasite ne fut pris en compte qu'à partir des années 80 où l'apparition de personnes atteintes du SIDA révèle *Cryptosporidium* comme un parasite émergent, mortel pour cette population. Les études de cette époque, initialement menées pour associer *Cryptosporidium* et SIDA, ont permis d'incriminer ce parasite dans des cas de diarrhées chez l'enfant mais aussi chez des adultes sains (Current *et al.*, 1983; Forgacs *et al.*, 1983; Jokipii *et al.*, 1983; Ma et Soave, 1983; Tzipori *et al.*, 1983).

En 1993, *Cryptosporidium* atteint le domaine public et médiatique en étant responsable d'une grave et spectaculaire épidémie de type gastro-entérite d'origine hydrique à Milwaukee (USA). Plus de 403 000 cas de cryptosporidioses dont une centaine de cas mortels ont été répertoriés (MacKenzie *et al.*, 1994). Depuis, *Cryptosporidium* fut associé à d'autres épidémies moins spectaculaires mais tout aussi dangereuses pour des personnes à risques. *Cryptosporidium* est aujourd'hui reconnu comme un danger sérieux et l'intérêt porté pour ce parasite a beaucoup augmenté ces dernières années. Ainsi, la base de données Medline (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) qui référençait en 1980 un total de 21 publications sur *Cryptosporidium* possède aujourd'hui plus de 3300 titres.

1.2. Taxonomie

Au niveau taxonomique, *Cryptosporidium* est un protozoaire appartenant au phylum des *Apicomplexa*, à la classe des *Sporozoasida*, à la sous-classe des *Coccidiasina*, à l'ordre des *Eucoccidiorida*, au sous-ordre des *Eimeriorina* et enfin, à la famille des *Cryptosporidiidae* (Levine, 1984).

La Figure 1 schématise la classification phylogénique de *Cryptosporidium*.

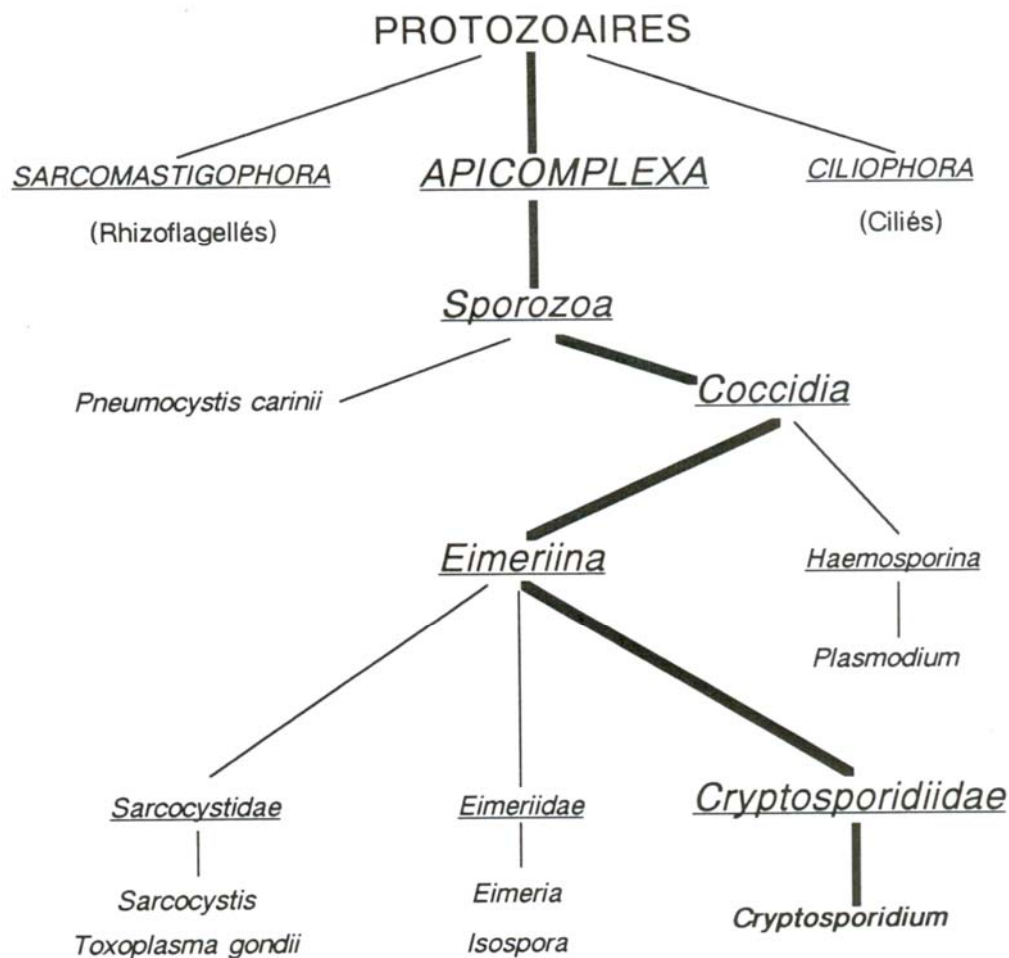


Figure 1 : Classification phylogénique de *Cryptosporidium* (d'après Levine, 1984)

La famille des *Cryptosporidiidae* ne contient qu'un seul genre : *Cryptosporidium*. Au sein de ce genre, l'identification claire des espèces a fait l'objet de nombreuses controverses. Les difficultés majeures pour leur étude sont principalement dues à leurs

morphologies identiques entre espèces et à une incapacité à se multiplier *in vitro*. De plus, on ne peut les conserver indéfiniment.

A l'origine, jusqu'à 23 espèces différentes dans le genre *Cryptosporidium* ont été citées en fonction de leur spécificité d'hôte ou de site (O'Donoghue, 1995). Depuis, ce nombre d'espèces est toujours aussi imprécis même si les progrès biochimiques, immunologiques et moléculaires ont permis de mieux clarifier la taxonomie de ce parasite et de n'en retenir que 8 (Fayer, 1997). Depuis 1997, deux autres espèces ont été identifiées, dix espèces sont donc aujourd'hui proposées. Celles-ci sont : *C. muris* trouvé chez les rongeurs et les ruminants, *C. wrairi* chez le cobaye, *C. felis* chez le chat, *C. meleagridis* et *C. baileyi* chez les oiseaux, *C. serpentis* chez les reptiles, *C. nasorum* chez les poissons et *C. parvum* chez l'homme et les mammifères. Les deux nouvelles espèces récemment identifiées sont : *C. saurophilum* chez le lézard (Koudela et Modry, 1998) et *C. andersoni* chez le chat (Lindsay *et al.*, 2000 ; Fayer *et al.*, 2000).

La Figure 2 illustre ces différentes espèces.

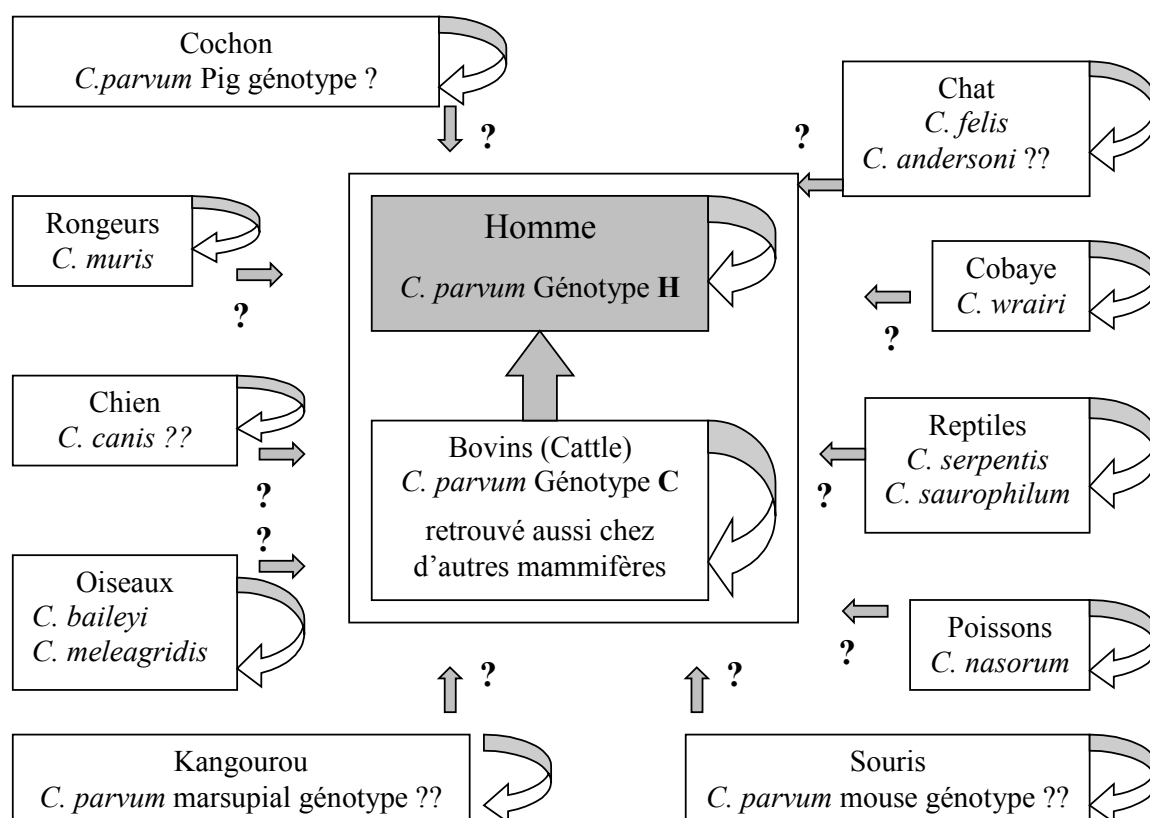


Figure 2 : Diagramme illustrant la transmission potentielle des géotypes majeurs et des espèces de *Cryptosporidium* (d'après un dessin de Marshall et LaMont, 1997).

Aujourd'hui, les nouveaux outils moléculaires permettent de mieux détecter et différencier les espèces de *Cryptosporidium*. En particulier, les techniques de RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) permettent de caractériser génétiquement chaque isolat, en particulier, au niveau des gènes codant pour les ARNr 18S, l'acetyl-co-A synthétase et les HSP 70 ou ceux codant pour des protéines d'adhésion (Spano *et al.*, 1998; Sulaiman *et al.*, 1999; Xiao *et al.*, 1999a; Xiao *et al.*, 1999c)

Détecté sur les cinq continents, aussi bien dans les pays développés que dans les pays en voie de développement, *C. parvum* a été trouvé chez plus de 152 espèces de mammifères incluant l'homme (Fayer et Ungar, 1986). Des petites différences ont été trouvées au niveau des caractères morphologiques et des cycles de développement des parasites classés sous l'espèce *C. parvum* qui n'est donc pas une espèce uniforme. En fonction de l'hôte, il a été aussi observé des différences génotypiques et antigéniques mais aussi de virulence, de pathogénicité, de sensibilité vis-à-vis des médicaments (Sulaiman *et al.*, 1998; Morgan *et al.*, 1999a; Morgan *et al.*, 1999b; Morgan et Thompson, 1999; Xiao *et al.*, 1999b).

Génétiquement, des études ont montré, à partir d'isolats de *C. parvum* issus d'épidémies humaines ou bovines, que l'espèce est caractérisée par 2 génotypes distincts (Peng *et al.*, 1997) :

- le génotype de type I « humain » (ou génotype H, Human) principalement infectieux chez l'Homme mais aussi chez certaines espèces de singes (Spano *et al.*, 1997),
- le génotype de type II « bovin » (ou génotype C, Cattle) retrouvé essentiellement chez différentes espèces bovines, ovines ou caprines et quelquefois chez l'homme.

Il semble exister deux types majeurs de transmission du parasite *C. parvum* : de l'homme à l'homme et de l'animal à l'homme. La distinction entre ces deux génotypes a été confirmée par l'analyse des gènes de l'ADN ribosomique 18S, des ITS1 et ITS2 (Internal Transcribed Spacer) d'ADNr ou de gènes spécifiques tels que celui de l'acetyl-co-enzyme A synthétase (Widmer *et al.*, 1998, Morgan *et al.*, 1999a; 1999b; Xiao *et al.*, 1999a; Morgan *et al.*, 2000). Ainsi, alors que le premier génotype est retrouvé majoritairement chez l'homme, le second est détecté chez d'autres mammifères.

De plus, de nouvelles caractérisations génotypiques d'isolats de *C. parvum* chez d'autres vertébrés ont aussi révélé que ce parasite s'était adapté à son espèce hôte. Ainsi, des sous-génotypes *C. parvum* « souris », « cochon », « kangourou » ou « chien » ont été mis en évidence (Morgan et Thompson, 1998; Morgan *et al.*, 1999a, 1999b; Xiao *et al.*, 1999b; Morgan *et al.*, 2000).

De même, *C. meleagridis* n'est pas toujours une espèce distinguable de *C. parvum* (Champlaud *et al.*, 1998). Certains auteurs considèrent même *C. meleagridis* comme un troisième génotype de *C. parvum* et le définissent comme le génotype T, Turkey. D'autres études (d'après l'ADNr 18S, des loci d'HSP 70 ou de protéines d'adhésion) ont par la suite démontré le contraire chez des isolats de *C. parvum* et *C. meleagridis* bien différenciés (Morgan et Thompson, 1999; Guyot *et al.*, 2002).

D'autres espèces telles que *C. felis*, ou *C. meleagridis* ont été trouvées lors de cas de cryptosporidioses humaines chez des patients HIV positifs (Pieniazek *et al.*, 1999; Morgan *et al.*, 2000). De plus, lors d'épidémies, de multiples génotypes différents peuvent être détectés indiquant ainsi qu'une co-infection par différents génotypes de *Cryptosporidium* est possible (Patel *et al.*, 1998; McLauchlin *et al.*, 1999).

Néanmoins, *C. parvum* est de loin l'espèce pathogène la plus importante en santé publique et pour les industriels de l'eau puisque, actuellement, celle-ci est la seule capable d'infecter des individus immunocompétents (Fayer *et al.*, 1997 ; 2000).

C. parvum est l'espèce pathogène de l'homme immunocompétent
mais d'autres espèces du genre *Cryptosporidium* peuvent être
retrouvées lors de cas de cryptosporidioses.

1.3. Cycle de vie

Cryptosporidium est un parasite monoxène c'est à dire qu'il n'a qu'un seul hôte, à partir duquel il se développe. Le cycle de vie de *Cryptosporidium* débute par l'ingestion d'oocystes. L'oocyste est la forme infestante du parasite. Sous l'action de l'acidité gastrique puis des enzymes intestinales, *Cryptosporidium* prend une forme végétative

dans l'intestin et libère ses 4 sporozoïtes. Les sporozoïtes se transforment rapidement en trophozoïtes.

Ces trophozoïtes se développent habituellement sur l'épithélium gastro-intestinal mais, chez l'homme, de rares localisations bronchiques et biliaires ont été rapportées. Les trophozoïtes forment une zone de liaison avec la membrane de la cellule hôte : le parasite est intracellulaire mais extra-cytoplasmique. Ils initient un cycle de développement asexué et subissent trois divisions nucléaires pour donner un schizonte de première génération contenant 8 mérozoïtes. Ce schizonte éclate et libère les mérozoïtes de première génération qui réinfestent d'autres cellules épithéliales, assurant au protozoaire un développement cyclique dans l'hôte parasite.

Après s'être lié à la cellule hôte, le mérozoïte peut subir à son tour deux divisions nucléaires pour former un schizonte de deuxième génération contenant quatre mérozoïtes. Les 4 mérozoïtes libérés de la seconde génération vont permettre un cycle de développement sexué en se différenciant en micro et macro-gamétocytes. Le macro-gamétocyte se transforme en macro-gamète. Le micro-gamétocyte subit des divisions nucléaires pour donner douze à seize micro-gamètes. La fusion d'un macro-gamète et d'un micro-gamète va donner un zygote qui, après deux divisions asexuées, va se différencier en un oocyste contenant 4 sporozoïtes immédiatement infectants.

Deux types d'oocyste sont libérés :

- les oocystes à paroi fine (20% d'entre eux) déchargeant *in situ* des sporozoïtes et induisant un cycle d'auto infestation (auto-infection endogène). Ce cycle endogène explique la gravité de cette parasitose chez l'immunodéprimé,
- les oocystes à paroi épaisse (80% d'entre eux). Très résistants, ils seront éliminés avec les fèces vers un nouvel hôte.

La Figure 3 décrit le cycle biologique des *Cryptosporidium sp.* chez l'homme d'après Current et Garcia (1991).

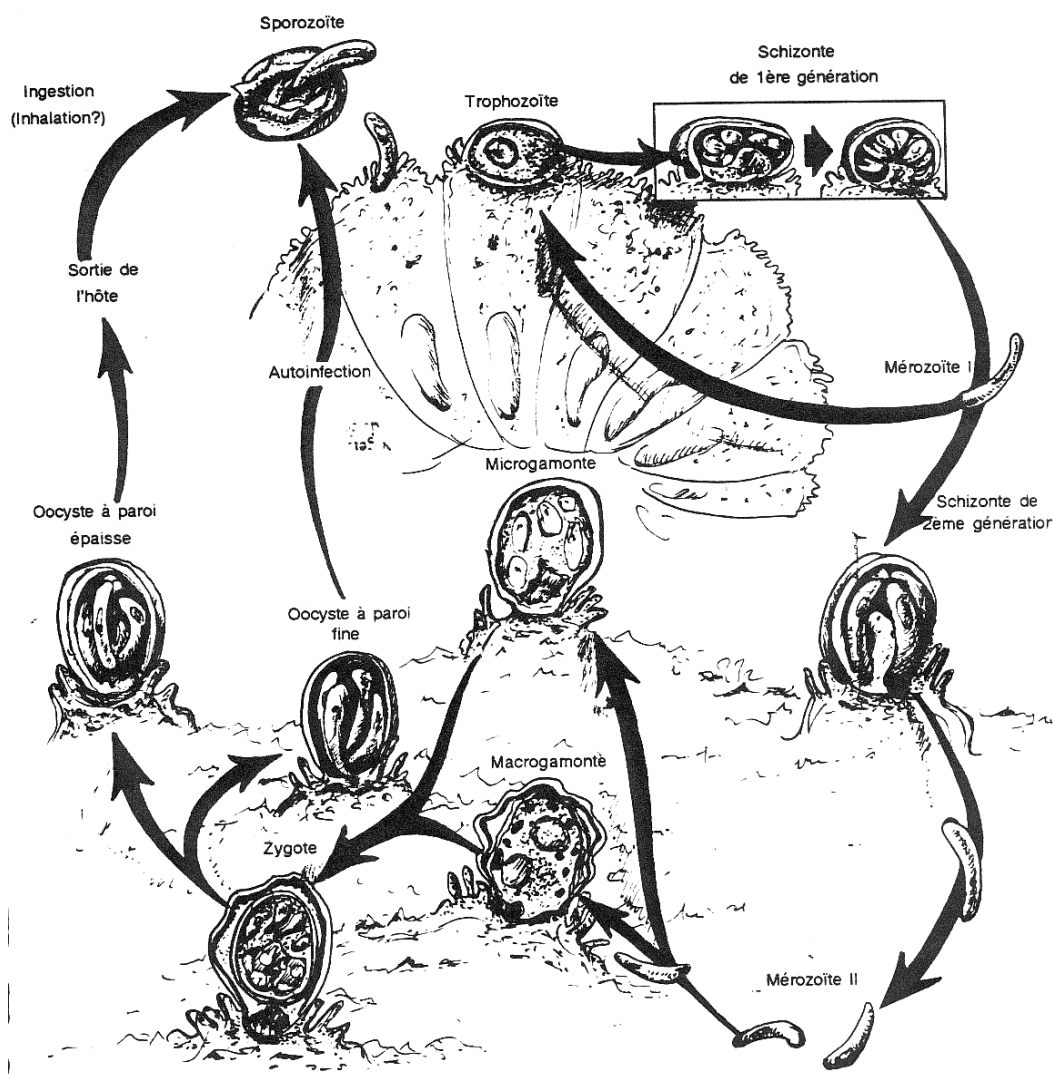


Figure 3 : Cycle évolutif de *Cryptosporidium* sp chez l'homme (d'après Current et Garcia, 1991).

*Le cycle parasitaire confère à *Cryptosporidium* un potentiel reproductif considérable. Leur cycle d'auto-infestation peut expliquer les infections persistantes chez les sujets immunodéprimés.*

1.4. Morphologie

De la morphologie des cryptosporidies, nous ne retiendrons que les oocystes sporulés, formes de dissémination du parasite dans l'environnement recherchées en diagnostic de laboratoire. Ces oocystes sont des éléments globuleux à paroi épaisse ayant

un diamètre variant de 3,5 à 7 μm et contenant 4 sporozoïtes et 1 corps granulaire résiduaire.

La Photo 1 représente un oocyste de *Cryptosporidium* en microscopie électronique à balayage. Une ligne de suture longitudinale peut être visualisée selon l'orientation du parasite.



Photo 1 : Oocyste de *Cryptosporidium* vu en microscopie électronique à balayage (d'après Miegville, CHU Nantes)

La Figure 4 présente la structure schématique d'un oocyste de *Cryptosporidium*.

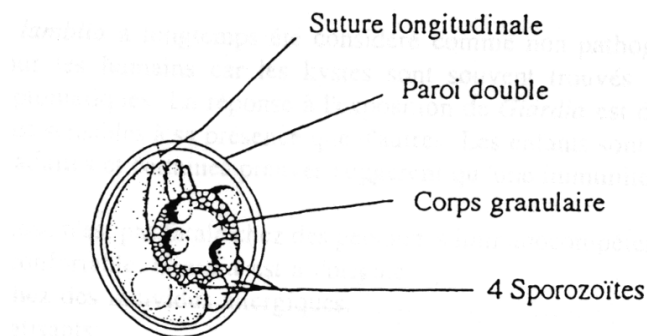


Figure 4 : Structure schématique d'un oocyste de *Cryptosporidium* (Upton et Current, 1985)

L'oocyste (3,5-7 μm) est la forme de résistance et de dissémination contaminant les selles et l'environnement

1.5. Prévalence

La prévalence en cryptosporidiose chez l'homme est difficile à évaluer et dépend surtout des conditions de vie et de l'état immunitaire de la personne. Les populations à risques sont les patients immunodéprimés principalement (en particulier les personnes atteintes du virus du SIDA) mais aussi les personnes âgées et les enfants en bas âge (du nouveau-né jusqu'à 5 ans).

Ce parasite est ubiquitaire et l'infection humaine a été décrite tout autant dans les pays industrialisés que non-industrialisés. Son incidence est supérieure dans les pays en voie de développement et cette différence s'explique principalement par le manque d'eau potable, les mauvaises conditions d'hygiène et les faibles niveaux de vie socio-économiques. La prédominance de cette infection est plus forte dans les zones urbaines surpeuplées que dans les zones rurales.

Dans les pays industrialisés, le taux d'infection par *Cryptosporidium* chez un adulte est très faible. Il est estimé à 2% au Pays de Galles chez des immunocompétents. En Suisse, une prévalence de 0,2% est mise en évidence par une étude portant sur environ 6200 adultes (Baumgartner *et al.*, 2000).

Chez des sujets ayant une gastro-entérite, cette incidence est évaluée entre 1 et 4%. Des pics de cryptosporidiose sont plutôt observés en été et au début de l'automne (Casemore, 1990; Van Asperen *et al.*, 1996).

En Amérique du Nord, une étude sérologique a montré que 80% des adultes participants possèderaient des anticorps témoignant d'une infection antérieure (Nutrition, 1992, révisé en 2003). Le nombre de cas asymptomatiques dans les pays industrialisés est inférieur à 1%.

En revanche, dans les pays non industrialisés, la prévalence en *Cryptosporidium* sur des sujets ayant une gastro-entérite est évaluée entre 3 et 20% en Afrique, Asie, Australie, Amérique du Sud et Amérique Centrale. Le taux de cas asymptomatiques dans ces pays est beaucoup plus important et peut atteindre 30% (Current et Garcia, 1991).

D'importantes prévalences en *Cryptosporidium* sont surtout observées chez les personnes atteintes du SIDA. Des études dans des pays comme l'Inde, la Thaïlande ou la Nouvelle Guinée mais aussi dans les pays industrialisés ont donné des pourcentages en cryptosporidioses variant de 10 à 25% chez des personnes atteintes du SIDA (Current et

Garcia, 1991; Lebbad *et al.*, 2001; Mohandas *et al.*, 2002; Saksirisampant *et al.*, 2002). Chez ces personnes, en l'absence de réponse immunitaire, les cryptosporidioses prennent une forme fulminante voire mortelle. De plus, malgré beaucoup d'efforts, aucun agent thérapeutique efficace n'a été trouvé. Seuls les patients sidéens bénéficiant d'une immunothérapie (anticorps monoclonaux) peuvent temporairement guérir de la cryptosporidiose (Blagburn et Soave, 1997).

Une étude anglaise a suspecté que 19% des patients ayant le SIDA et une cryptosporidiose mouraient de cette dernière infection (Connolly *et al.*, 1990). Ce taux, très proche de la prévalence en cryptosporidiose chez ces personnes, souligne toute l'importance qu'il faut attacher à ce parasite.

En France, une étude de prévalence hors épidémies réalisée en 1997 par Datry *et al.* (2000) dans 22 centres hospitaliers (2511 examens de selles, 622 patients infectés par le VIH, 860 adultes témoins, 1029 enfants de crèches hospitalières) a montré que :

- chez les patients infectés par le VIH, la cryptosporidiose a une prévalence de 3% significativement plus élevée que chez les adultes témoins (0,35%) ou chez les enfants de crèches (0,30%)
- le taux de prévalence pour l'ensemble de la population de l'étude est égal à 1%.

La Figure 5 récapitule le degré de risque lié à *Cryptosporidium* en fonction des populations.

Immunodéprimés		Pays en voie de développement		Pays développés	
SIDA	>>> Personnes âgées > Enfants	Villes	Campagne	Métiers à risques (fermes, crèches...)	Autres

Figure 5 : Degré de risque lié à *Cryptosporidium*

Chez les animaux, les cryptosporidioses sont principalement d'origine bovine. Considéré comme l'agent infectieux majeur dans le syndrome de diarrhée néonatale des espèces bovines, ovines et caprines, *Cryptosporidium* induit des pertes économiques considérables dans les élevages (de Graaf *et al.*, 1999). Dans certaines régions des USA,

C. parvum est présent dans 90% des fermes d'élevage bovin, infectant jusqu'à 50% des veaux (Rose *et al.*, 1997).

La prévalence en cryptosporidiose chez l'homme dépend de la virulence de la souche ainsi que de l'état immunitaire et des conditions de vie de la personne. Les populations les plus sensibles sont les patients immunodéprimés.

1.6. La cryptosporidiose

Les *Cryptosporidium* provoquent au niveau intestinal une atrophie des micro-villosités intestinales entraînant une diminution de la surface d'absorption et, par la suite, une malabsorption. Selon l'état immunitaire de la personne, la cryptosporidiose évolue différemment.

Chez les sujets immunocompétents, *Cryptosporidium* est généralement associé à des diarrhées liquides profuses d'environ 3 litres par jour accompagnées de douleurs abdominales, d'une asthénie, de vomissements et de fièvre faisant suite à une incubation silencieuse moyenne de 7 jours (Navin et Juranek, 1984) . Elle peut aussi être asymptomatique (Navin et Juranek, 1984). La cryptosporidiose évolue généralement vers une guérison spontanée après une à deux semaines.

Chez les sujets immunodéprimés, les personnes âgées ou les très jeunes enfants (de moins de 3 ans), les symptômes sont accentués. Les diarrhées peuvent atteindre 10 à 15 litres par jour. Elles peuvent être mortelles par déshydratation. Chez ces patients immunodéficients, d'autres infections opportunistes (co-infections) se greffent fréquemment comme la pneumocystose, la giardiose, la toxoplasmose et diverses mycoses (Miller *et al.*, 1992; Weber *et al.*, 1993; Viriyavejakul *et al.*, 1999). Il n'y a pas de guérison spontanée de la cryptosporidiose chez ces personnes.

Les cryptosporidioses sont observées sous forme:

- *asymptomatique*
- *de type « gastro-entérite » chez les immunocompétents*
- *fulminante et mortelle chez les immunodéprimés.*

1.7. Diagnostic

Les *Cryptosporidium* sont mis en évidence essentiellement à partir d'examens de matières fécales et éventuellement par des biopsies intestinales. Actuellement, en France, la recherche des *Cryptosporidium* est systématique lors d'examens coprologiques d'immunodéprimés.

Des examens microscopiques sont réalisés par coloration classique (au Ziehl-Nielsen modifiée, Giemsa...) d'une suspension de selles ou d'une biopsie de l'intestin grêle. Cette mise en évidence du parasite peut être précédée d'une étape de concentration par gradient de densité ou par flottation. La méthode de Ziehl-Nielsen modifiée (utilisant de la fuchsine et du vert de malachite) colorant les oocystes en rose vif sur un fond vert, est la plus utilisée (Photo 2).

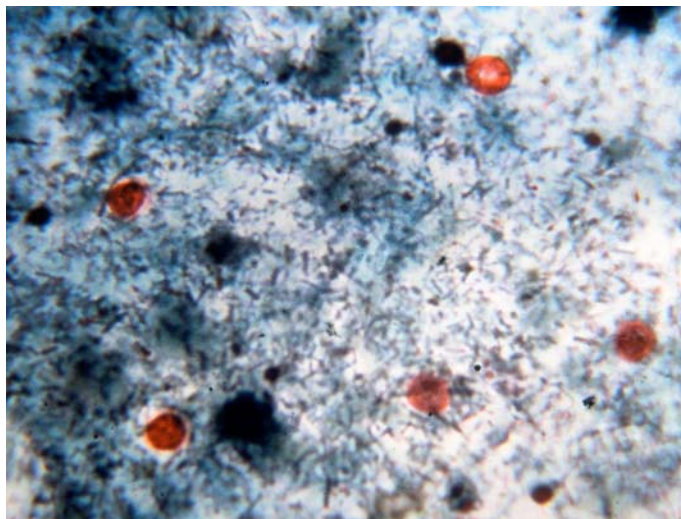


Photo 2 : Oocystes de *Cryptosporidium* colorés par la méthode de Ziehl-Nielsen modifiée

Des examens immunologiques utilisant des anticorps monoclonaux sont aussi pratiqués. Ils présentent l'avantage d'être plus sensibles et plus spécifiques. Différentes techniques sont utilisées : l'immunofluorescence directe, indirecte ou la méthode ELISA (Enzyme Linked ImmunoSorbent Assays) (Weber *et al.*, 1991; MacPherson et McQueen, 1993).

1.8. Traitement

A ce jour, aucun traitement spécifique réellement efficace n'existe. Les agents antidiarrhéiques usuels se sont révélés inutiles. Certaines molécules ont cependant montré une efficacité partielle ou encourageante. C'est le cas de la spiramycine (Weikel *et al.*, 1991), de la paramomycine qui améliore la pathologie chez certains sujets ayant le SIDA (Cirioni *et al.*, 1995; Blanshard *et al.*, 1997), de la roxithromycine (Sprinz *et al.*, 1998; Uip *et al.*, 1998), de la ranalexine, du lasalocide ou de l'azithromycine (Giacometti *et al.*, 2000), etc...

En conséquence, des traitements plutôt symptomatiques sont préconisés en cas de cryptosporidiose : réhydratation, pansements intestinaux, supplémentation minérale et vitaminée. Des mesures d'hygiène générales sont aussi mises en œuvre pour éviter les réinfections et augmenter la résistance des malades.

Malgré quelques guérisons partielles et à court terme, aucun traitement n'est réellement efficace. Aucune guérison spontanée n'est donc possible chez les immunodéprimés.

1.9. Transmission

Les sources de contamination au sein d'une espèce proviennent de malades, de porteurs sains et d'individus d'autres espèces en raison de la faible spécificité de *Cryptosporidium*.

La voie de transmission la plus fréquente est la contamination oro-fécale où les *Cryptosporidium* excrétés dans les selles en grandes quantités sont disséminés dans l'environnement et sont sources de contamination pour l'homme ou l'animal.

Plusieurs types de transmission de la cryptosporidiose existent :

- La transmission de personne à personne au sein des familles ou dans les collectivités comme les crèches, les nurseries ou les hôpitaux. De nombreuses épidémies survenues dans diverses collectivités ont d'ailleurs

bien illustré cette transmission (Fayer et Ungar, 1986; Driscoll *et al.*, 1988; Casemore, 1990; Tangermann *et al.*, 1991)

- La transmission de l'animal à l'homme observée surtout chez les agriculteurs ou les vétérinaires en contact avec du bétail. Les animaux domestiques (chiens, chats) ne présentant pas une source importante d'infection (Casemore, 1993; Glaser *et al.*, 1998).
- La transmission de l'environnement à l'homme par le biais d'eaux consommées contaminées ou d'eaux de baignade (*cf. § 2 du chapitre I « Cryptosporidium dans les eaux »*)
- La transmission via des aliments crus (légumes ou fruits irrigués par des eaux contaminées, cultures maraîchères contaminées...) mais aussi des laitages (lait, crèmes glacées, yaourts...) ou des viandes pouvant être contaminés. (Laberge et Griffiths, 1996; Deng et Cliver, 1999; Slifko *et al.*, 2000). Dans toutes les situations de contaminations rapportées, il est apparu un dysfonctionnement d'origine humaine dans la chaîne de traitement de l'aliment tel qu'une absence ou un défaut de pasteurisation des aliments, une absence de lavage des légumes ou un manque d'hygiène du personnel de cuisine.

*La transmission par voie hydrique est la plus recensée.
Sa fréquence est accrue quand la ressource en eau est mal protégée
contre la contamination par les eaux usées ou les effluents
d'élevages produits en retour par cette population.*

1.10. Pouvoir infectieux

Si un faible nombre d'oocystes semble capable d'induire la maladie chez l'homme, il n'est cependant pas connu avec précision. Des expériences réalisées sur des animaux ont révélé qu'une moyenne de 10 oocystes pourrait induire une cryptosporidiose chez des

primates (Miller et van den Ende, 1986). Chez la souris, une très faible quantité allant jusqu'à un oocyste seulement suffirait.

Chez l'homme, la dose infectante varie avec l'état immunitaire de la population cible et la virulence de la souche source d'infection. Une ingestion de 30 oocystes peut déclencher la maladie chez certains individus sains, révélant ainsi qu'une faible dose peut induire une infection (Dupont *et al.*, 1995). Cette équipe de recherche a aussi démontré que 132 oocystes de *C. parvum* ingérés déclenchent une cryptosporidiose dans 50% des cas : c'est la DI50 (dose infectante 50%). De plus, la totalité de la population est infectée avec 214 oocystes par individu. Cette quantité est très faible sachant que les oocystes excrétés dans les selles lors des cryptosporidioses sont à des concentrations variant de 10^6 à 10^{10} oocystes par jour pendant 12 jours en moyenne (Smith, 1990; Goodgame *et al.*, 1993).

D'autres études sur des volontaires sains aux Etats-Unis ont montré que 10 oocytes suffisaient pour induire une infection (Okhuysen et Chappell, 2002). Leurs auteurs ont montré une différence de pathogénicité et d'infectivité dans l'espèce *C. parvum*. En effet, le sous-groupe taxonomique *C. parvum* de type H est beaucoup plus infectieux. Il est responsable de 59% des cas sporadiques d'infections contre 35% pour *C. parvum* de type C. Ce même génotype H est retrouvé dans 96% des cas cliniques de cryptosporidiose (Okhuysen *et al.*, 1999).

C. parvum possède une dose minimale infectieuse très faible variant selon la souche et le terrain du receveur. Moins de 10 oocystes peuvent déclencher une cryptosporidiose chez des immunodéprimés.

2. *Cryptosporidium* dans les eaux

2.1. La législation concernant la qualité des eaux propres destinées à la consommation

2.1.1. Recommandations de l'O.M.S.

En 1986, à Genève, l'OMS a émis des recommandations concernant la qualité des eaux de boisson. Au niveau des paramètres microbiologiques, seules des valeurs seuils pour des germes indicateurs de contamination fécale (coliformes totaux, coliformes fécaux, entérocoques et Spores Anaérobies de germes Sulfite Réducteurs (SASR) incluant *Clostridium perfringens*) sont mises en place. Aucune recommandation ne concerne directement *C. parvum*.

2.1.2. En Europe

Au sens juridique, la potabilité d'une eau dépend uniquement du respect des normes fixées par les directives et décrets. Cependant, le suivi de tous les micro-organismes constituant un danger potentiel nécessiterait des analyses exhaustives non envisageables. C'est pourquoi, les exigences se restreignent à l'absence de germes « indicateurs » témoignant de l'absence de certains pathogènes.

Concernant les pays européens, hormis l'Angleterre, aucune mesure particulière n'a été prise à ce jour concernant spécifiquement *Cryptosporidium*. La directive européenne (Directive 98/83/CE, 1998) stipule néanmoins dans l'un de ses articles (article 4, Obligations générales) que « *les eaux destinées à la consommation humaine sont salubres et propres si elles ne contiennent pas un nombre ou une concentration de micro-organismes, de parasites ou de toutes autres substances constituant un danger potentiel pour la santé des personnes* ».

L'Union Européenne a pris en compte la problématique concernant *Cryptosporidium* en prévoyant la recherche de ce parasite dans les eaux superficielles ou

eaux souterraines influencées par des eaux superficielles ayant dépassé les valeurs paramétriques (absence dans 100 ml) en *Clostridium perfringens*.

De plus, l'article 7.6 de cette directive précise qu'un « *contrôle supplémentaire soit effectué au cas par cas pour les substances et micro-organismes pour lesquels aucune valeur paramétrique n'a été fixée si il y a des raisons de soupçonner qu'ils peuvent être présents dans l'eau en quantité constituant un danger potentiel pour la santé des personnes* ».

Cette directive a été transposée en décrets pour chaque pays européen selon leur droit respectif.

Le décret français du 20 décembre 2001 (Décret 2001-1220, 2001) est donc la transposition en droit français de cette directive européenne 98/83/CE. La France a renforcé la sévérité de la directive en imposant la recherche de *Cryptosporidium* dans les eaux superficielles ou eaux souterraines dès le dépassement des valeurs paramétriques (absence dans 100 ml) pour l'ensemble des SASR et non plus seulement pour les *Clostridium perfringens*.

Le cas particulier de l'Angleterre :

L'Angleterre a été le premier pays à légiférer spécifiquement sur *Cryptosporidium*. La législation anglaise publiée en 1999 par le « Drinking Water Inspectorate » (DWI, n°1524) est en application obligatoire depuis le 1^{er} octobre 2001.

Cette réglementation est certainement la plus sévère au monde : elle fixe un seuil limite pour les *Cryptosporidium* inférieur ou égal à 1 oocyste (moyenne) par 10 litres d'eau pour les échantillons prélevés en continu sur une période de 24 heures (soit environ 1000 litres prélevés par échantillon).

De plus, lorsqu'un résultat atteint 0,5 *Cryptosporidium* / 10 l d'eau, un contrôle interne par un autre analyste doit être effectué. Lorsque ce résultat est supérieur à 0,7/10 l, un contrôle externe par un autre laboratoire agréé est exigé.

Compte tenu de cette réglementation sévère, le laboratoire effectuant l'analyse doit s'astreindre à une rigueur encore plus importante (surveillance en continu, vérification de l'intégrité des membranes de filtration, etc.).

Ainsi, tous les sites de production sont hiérarchisés selon le risque, en prenant en compte :

- la nature de la ressource (eau de surface, source ...),
- l'environnement des unités de production (présence de pâturages, rejets de stations d'épuration ...),
- les évolutions de la qualité de l'eau (variations de turbidités, bactéries témoins de contamination fécale...),
- l'historique de la présence de *Cryptosporidium*,
- l'état des forages (périmètre de protection...).

Une surveillance des oocystes de *Cryptosporidium* avec prélèvements en continu et analyses journalières est imposée pendant une durée de cinq ans pour les sites classés « à risques ».

2.1.3. Aux Etats-Unis

Les Etats-Unis n'ont pas le même système de législation. Une entreprise de l'eau n'a pas d'obligation de résultats contrairement au système Européen mais elle a des obligations de moyens. Le gouvernement impose donc un nombre de log d'abattement en fonction du micro-organisme : The Water Treatment Rules.

L'United States Environmental Protection Agency (USEPA) mène un large programme de surveillance sur différents types de ressources (Information Collection Rule) visant à évaluer une concentration maximale admise en coliformes et flore totale et une valeur cible nulle pour *Cryptosporidium* (<http://www.epa.gov/>). Cet organisme a aussi proposé un « Long Term 2 Enhanced Surface Water Treatment Rule (LT2ESWTR) » permettant de réduire le risque associé à *Cryptosporidium* et à d'autres micro-organismes pathogènes présents dans l'eau destinée à la consommation.

Ce rapport s'appliquant aux eaux de surface et aux eaux souterraines influencées permet de diminuer les risques liés à *Cryptosporidium* en proposant des méthodes de détection du parasite (EPA Method 1622 et EPA Method 1623) (<http://www.epa.gov/safewater/lt2/index.html>)

En mars 2001, cet organisme a aussi édité un important rapport sur les critères d'analyse et de traitement des eaux destinées à la consommation concernant *Cryptosporidium* (<http://www.epa.gov/waterscience/humanhealth/microbial/crypto.pdf>).

Ainsi, depuis plusieurs années, l'émergence des épidémies à *Cryptosporidium* a obligé les chercheurs à développer des méthodes de détection pour s'assurer de la qualité de l'eau. Selon le type d'eau considéré, les besoins en terme d'efficacité de méthode ne sont pas les mêmes :

- pour les eaux utilisées comme ressource, il est nécessaire d'avoir une idée de la quantité du parasite,
- en revanche, pour les eaux traitées, compte tenu du risque sanitaire existant, il est indispensable d'avoir une idée précise à la fois sur la quantité de *Cryptosporidium* présents et leur état physiologique.

C'est pourquoi les techniques de détection mises au point doivent être les plus fiables, sensibles et reproductibles possibles. Dans ce contexte, il est important que les industriels de l'eau anticipent les réglementations et adaptent au mieux les textes existants et leur fonctionnement pour garantir une haute fiabilité des traitements mis en œuvre.

2.2. Origine des contaminations

La source de *Cryptosporidium* dans les eaux brutes (avant traitement) est représentée principalement par des activités humaines disséminant les oocystes. Les vecteurs sont les matières fécales de personnes malades ou asymptomatiques, d'animaux contaminés ou de nombreux porteurs sains, les effluents agricoles et l'épandage de lisiers et de fumiers non assainis polluant les prairies.

Ainsi, *Cryptosporidium* peut être retrouvé dans tous types d'eaux : eaux usées, de surface, de mer, de consommation, lacs ou réservoirs comme le montre la Figure 6 (Schwartzbrod, 1991).

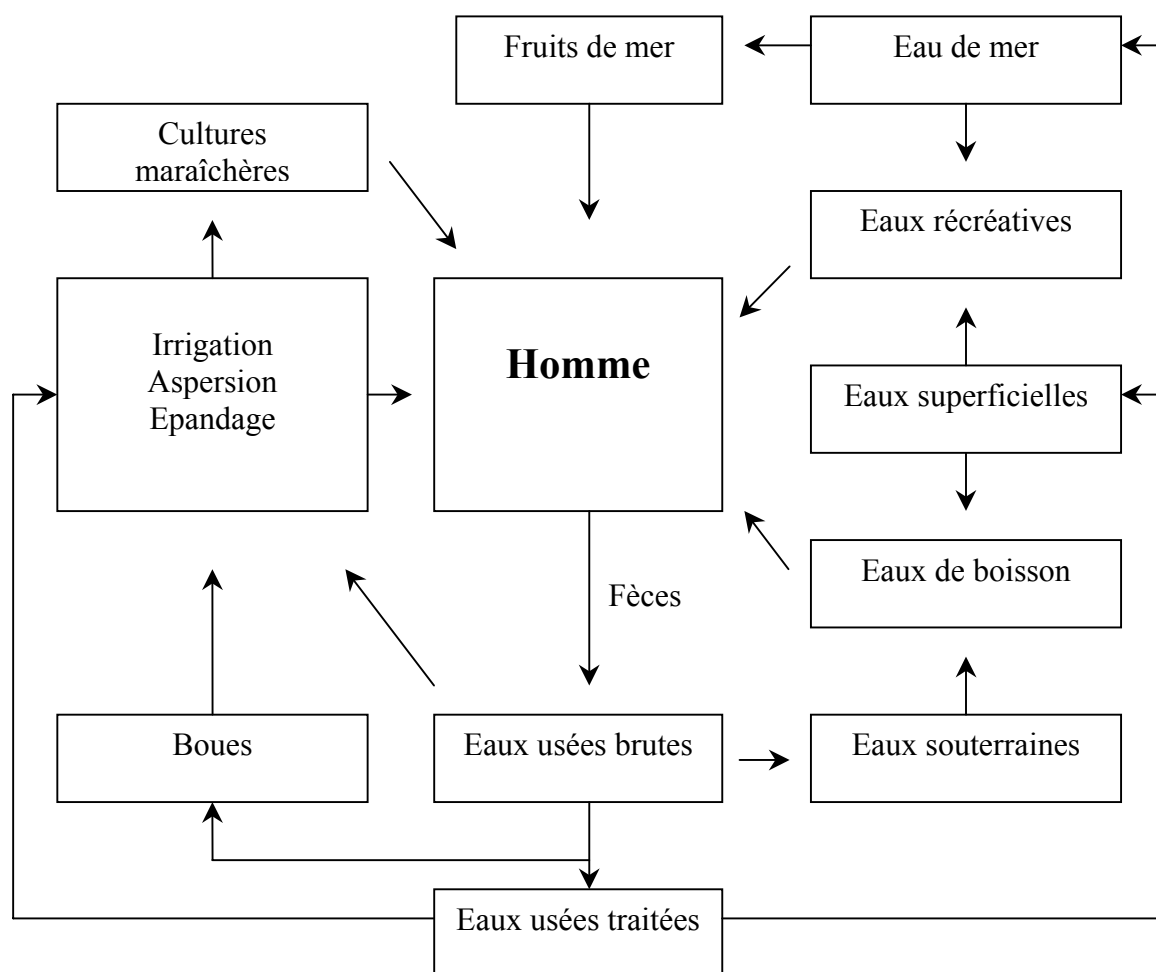


Figure 6 : Cycle de contamination du milieu hydrique (d'après Schwartzbrod, 1991).

2.3. Occurrence

Cryptosporidium est un genre de parasite ubiquiste, que l'on peut retrouver partout dans l'environnement, y compris dans l'eau, mais uniquement sous forme d'oocystes, seule forme capable de survivre en dehors de l'hôte infecté.

Le Tableau I suivant montre des concentrations en *Cryptosporidium* pouvant être retrouvées dans différents types d'eaux

Type d'échantillon		Localisation	Concentration en oocystes (en .l ⁻¹)
Eaux usées brutes		USA	4 à 1580
		France	3000 à 5000
Effluents de boues activées		USA	4 à 1297
Eaux de surface	Recevant des eaux de décharges agricoles ou d'eaux usées	USA	0,58 à 1,2
	Ne recevant pas d'eaux de décharges	France	0,3 à 32,20
Système de refroidissement		UK	154
Eaux récréationnelles		UK	0,66 à 500
		France	50
Eaux souterraines	Sans traitement	UK	0,003
		France	<1
	Avec traitement	France	0
Eau potable	Sans association d'épidémie	UK	0,006 à 0,26
		France	0,01 à 0,25
	Avec épidémies	UK	0.04 à 4.8

Tableau I : Exemples de concentration en *Cryptosporidium* dans différentes eaux (d'après Amar et Dumoutier, 1992, Lesné, 2001)

Le niveau d'abondance varie selon le type d'eau :

- les eaux usées : le niveau de contamination dans les eaux usées brutes peut être important (3000 à 5000 l⁻¹ en moyenne et jusqu'à 10⁷ l⁻¹). Dans certains prélèvements d'eaux usées épurées, il peut atteindre 1000 l⁻¹.
- les eaux de surface (rivières, lacs...) représentent une ressource à laquelle les industriels de l'eau ont de plus en plus recours pour la fourniture en eau d'alimentation des villes. L'industrialisation croissante et la concentration urbaine occasionnent des rejets d'eaux usées peu ou pas traitées dans les eaux de surface. En zone rurale, l'épandage des effluents agricoles joint au lessivage des sols par les pluies contribuent aussi à la dégradation de la qualité microbiologique des eaux. Les valeurs rapportées en concentration de *Cryptosporidium* dans les eaux de surface sont variables mais le plus souvent inférieures à 10 oocystes l⁻¹.

- les eaux souterraines : ces eaux ne sont généralement pas contaminées mais la concentration varie si elles sont influencées ou selon leur profondeur...
- les eaux de piscine ont des concentrations allant jusqu'à 50 oocystes /l. Les valeurs de chlore libre actif retrouvées normalement au niveau des bassins sont inefficaces.
- les effluents non traités d'élevages intensifs contiennent jusqu'à 14 000 oocystes vivants par litre et jusqu'à 150 000 oocystes par litre pour les effluents d'abattoirs (Smith et Rose, 1990). Ces effluents agricoles seraient donc la source prépondérante de contamination dans certaines régions.

2.4. Survie dans l'environnement

Les oocystes demeurent viables pendant 4 à 12 mois sur les sols humides et dans l'eau entre 4°C et 20 °C (Smith, 1990).

Cette résistance est augmentée par les matières fécales protégeant les oocystes de la dessiccation et renforçant l'imperméabilité de leur paroi face aux facteurs létaux de l'environnement (Robertson *et al.*, 1992). Ces données suggèrent la possibilité d'une survie prolongée des oocystes avant l'ingestion par un hôte potentiel.

La végétation exerce sur les oocystes un effet protecteur vis-à-vis des variations de température et d'humidité. Le sol les protège jusqu'à ce qu'un processus d'érosion (pluie, piétinement, fortes précipitations) les découvre ou désagrège les matières fécales. Ainsi, dans la nature, les eaux de ruissellement peuvent polluer les nappes superficielles ou les eaux souterraines.

Cette résistance est par contre altérée par des paramètres physico-chimiques tels que la dessiccation, de hautes températures ou l'effet du froid. En effet, différentes études ont montré une perte de viabilité des oocystes après 30 minutes à 60°C ou en moins de 5 minutes à 65°C (Fayer *et al.*, 1996; Tzipori et Ward, 2002), en 7 jours à -10°C ou 1 jour à -15°C (Fayer et Nerad, 1996). La congélation brutale les détruit.

Entraînés par les effluents, les oocystes peuvent aussi survivre et rester infectieux dans l'eau de mer durant 8 à 12 semaines (eau de salinité entre 10 et 30 à 20°C ou eau de

salinité de 10 à 20°C). Cette survie est à considérer quand on sait que les huîtres et autres mollusques aquatiques peuvent être vecteurs éventuels de l'infection (Robertson *et al.*, 1992; Fayer, 1998 Casemore, 1998; Tamburrini et Pozio, 1999; Gomez-Bautista *et al.*, 2000).

Les oocystes sont résistants et demeurent viables dans l'eau plusieurs mois en conditions environnementales tempérées.

2.5. Les épidémies hydriques à *Cryptosporidium*

2.5.1. Historique

Du milieu des années 80 jusqu'à 1996, 502 épidémies à *Cryptosporidium* ont été recensées aux USA (Kramer *et al.*, 1996). La plus importante des épidémies de cryptosporidiose est survenue en 1993 à Milwaukee (USA) et a donné plus de 403 000 cas dont une centaine de décès parmi des patients immunodéprimés et des personnes âgées (MacKenzie *et al.*, 1995). Cette épidémie a vraiment permis de rendre compte de l'importance du « problème *Cryptosporidium* » en santé publique.

Les cas d'épidémies de *Cryptosporidium* ont trois origines majeures :

- une augmentation de la contamination de la ressource,
- un dysfonctionnement ou une insuffisance dans le traitement de l'eau (décantation, ozonation...),
- un problème du réseau de distribution d'eau (infiltration...).

Les piscines et parcs aquatiques ont été à l'origine de plusieurs contaminations groupées de baigneurs, mais ces épidémies impliquent un nombre de personnes plus limité et sont rarement rapportées. Elles peuvent avoir une durée relativement longue (de l'ordre de plusieurs semaines).

Le Tableau II reporte les principales épidémies à *Cryptosporidium* et leur attribution aux eaux de réseau, de récréation, à la nourriture...

Localisation et date	Nombre de personnes exposées	Nombre de personnes infectées	Type d'eau	Type de traitement	Cause supposée	Référence
Cobham, UK 1983 & 1985	ND	16 (1983) 50 (1985)	surface	chloration	ND	Lisle et Rose, 1995
Braun Stn, Texas, 1985	5900	2006	souterraine	chloration	contamination par eaux usées	D'Antonio, 1985
Sheffield, UK 1986	ND	84	surface	ND	selles de bétail	Lisle et Rose, 1995
Carrolton, Georgie, 1987	32400	12960	surface	conventionnel	défaillance floculation	Hayes <i>et al.</i> , 1989
Ayrshire, UK 1988	24000	27	ND	chloration et filtration	problèmes de réseau ; selles de bétail	Smith <i>et al.</i> , 1989
Los Angeles, 1988, USA	60	44	piscine	ND	piscine contaminée	Sorvillo <i>et al.</i> , 1992
Swindon, UK 1989	741092	516	surface	conventionnel	eaux de rétrolavage, défaillance traitement	Richardson <i>et al.</i> , 1991
Loch Lomond, UK 1990-91	ND	147	surface	ND	ND	Lisle et Rose, 1995
Isle of Thanet, UK 1990-91	177300	47	surface	conventionnel	défaillance du traitement	Joseph <i>et al.</i> , 1991
Pennsylvanie, USA 1991	ND	551	souterraine	chloration	défaillance du traitement	Moore <i>et al.</i> , 1993
Jackson, USA 1992	160000	15000	Surface/ source	filtration/ chloration	défaillance du traitement	Frost <i>et al.</i> , 1998
Milwaukee, USA, 1993	1600000	403000	surface	Conventionnel pré- et post-chloration	défaillance du traitement	MacKenzie, 1995
Kanagawa, Japon, 1994	736	461	ND	ND	eau traitée contaminée	Kuroki <i>et al.</i> , 1996

Localisation et date	Nombre de personnes exposées	Nombre de personnes infectées	Type d'eau	Type de traitement	Cause supposée	Référence
Ogose, Japon, 1996	12345	9140	source/forage	coagulation sédimentation	eau traitée contaminée	Yamamoto <i>et al.</i> , 2000
Bilan UK-Ecosse, 1997	ND	4321	ND	ND	épidémies multiples	CCN, 1998, 3(6)6
Brisbane, UK, 1998	ND	52	piscine	ND	3 piscines contaminées	Stafford <i>et al.</i> , 2000
New South Wales Australia, dec 97-avril 98	ND	1060	piscine ou lac	ND	contamination	Puech <i>et al.</i> , 2001
Nouvelle Zélande, 1997- 98	ND	300	piscine	ND	piscine contaminée	CCN, 1998, 3(8)6
USA 1997-1998	ND	2128 (sur les 2 ans)	piscine ou lac	ND	eaux récréationnelles contaminées	Barwick <i>et al.</i> , 2000
Sète, France 1998	ND	150 au minimum	forage	ND	rivière contaminée en crue	Guyonnet et Claudet, 2002
Floride, USA, 1999	ND	5	piscine / fontaine	ND	contamination	CDC, 2000
Ohio et Nebraska, USA, 2000	ND	1000	piscines	ND	piscines contaminées	CDC, 2001
Belfast, Irlande, 2000	ND	70	ND	ND	défaillance du traitement	Glaberman <i>et al.</i> , 2002
Clitheroe, UK, 2000	ND	50	réseau	ND	défaillance du traitement	Howe <i>et al.</i> , 2002

ND : données non disponibles

Tableau II : Les épidémies hydriques à *Cryptosporidium*, un bref historique

2.5.2. L'exemple de la crise de Sydney de 1998

La crise de Sydney est la dernière crise à *Cryptosporidium* en date ayant eu un important impact médiatique et scientifique. De juillet à septembre 1998, d'importantes concentrations en *Cryptosporidium* et en *Giardia* ont été détectées épisodiquement dans des eaux traitées et des eaux destinées à la consommation de la ville de Sydney en Australie.

Cette crise a engendré la publication dans la presse locale de trois recommandations consécutives demandant à la population de faire bouillir l'eau avant consommation (« boil-water advisories ») et, au final, des recommandations gouvernementales sur le management de l'eau. Alors que plus de 4 millions de consommateurs ont été exposés à cet événement, il est important de noter qu'aucune augmentation du nombre de maladies liées à *Cryptosporidium* n'a été observée alors que la surveillance épidémiologique avait été renforcée.

Bien que la réglementation australienne ne recommande pas la surveillance des oocystes de *Cryptosporidium*, le « New South Wales Comitee » (SWC), chargé de gérer l'eau potable de la ville, décide d'inclure un test spécifique de détection des parasites *Cryptosporidium* et *Giardia* dans leurs tests d'analyses de routine de l'eau.

En juillet 1998, le SWC détecte à plusieurs reprises de hautes concentrations en oocystes de *Cryptosporidium* et kystes de *Giardia* : de l'ordre de plusieurs centaines pour 100 l d'eau du système de distribution. Les analyses de routine ont alors été multipliées en fréquence et en intensité même si aucune augmentation en cryptosporidiose n'a été observée. Plusieurs études sur l'eau brute et sur l'usine de traitement ainsi que plusieurs audits du laboratoire ont été effectués afin de mieux comprendre les résultats obtenus.

Les causes précises de cette crise n'ont pas et ne seront probablement jamais identifiées. Le scénario suivant est généralement évoqué :

- une augmentation importante de la concentration d'oocystes dans l'eau brute due à d'importantes chutes de pluie après plusieurs jours de temps sec,
- une réduction de l'efficacité de filtration par l'usine (due à la variation de qualité de l'eau brute) amenant des oocystes à passer dans l'eau traitée,

- la quantité faible d'oocystes viables ingérée par les consommateurs n'a pas engendré d'épidémie.

Les audits du laboratoire ont aussi montré un manque d'expérience du personnel ainsi qu'une mauvaise utilisation de la méthode de détection. La méthode utilisée était un comptage des oocystes par cytomètre de flux. Cependant, l'absence de confirmation au microscope a pu entraîner une numération de nombreux faux-positifs de type algues.

Malgré le fait qu'aucune épidémie n'ait fait suite à la détection d'un nombre important de *Cryptosporidium* dans l'eau, la crise de Sydney a fait réagir les industriels et les autorités non seulement en Australie mais aussi dans le monde entier en soulignant l'importance d'une surveillance accrue de *Cryptosporidium*.

Une des conséquences principales de cette crise a été la remise en cause des méthodes de détection de *Cryptosporidium* dans l'eau, en particulier sur le caractère viable et/ou infectieux de l'oocyste détecté. Des stratégies et des plans d'urgence préventifs, de nouvelles organisations de surveillance et des processus de management du risque ont aussi été mis en place afin de pouvoir diminuer le risque de futures crises et de mieux réagir face à celles-ci (Cox *et al.*, 2003).

2.6. Traitements des eaux vis-à-vis de l'élimination des oocystes de *Cryptosporidium*

Suite aux récentes contaminations par l'eau potable aux Etats-Unis et au Royaume Uni, des mesures plus drastiques concernant le risque sanitaire lié à *Cryptosporidium* ont été prises par les industriels de l'eau. Le cas de l'épidémie de Milwaukee avec 403 000 personnes infectées a été estimé à un coût global de 53 millions de dollars. Or, si la France n'a pas encore eu de grandes épidémies liées à l'eau du robinet, elle n'est pas plus à l'abri. Les acteurs de l'eau ont donc réagi face à la problématique *Cryptosporidium* afin de mieux maîtriser les risques infectieux liés à l'eau potable et optimiser les traitements des eaux.

2.6.1. Rappels sur le traitement des eaux de consommation

Une installation de traitement d'eau destinée à la consommation est conditionnée par les caractéristiques des eaux de la ressource et doit produire une eau répondant aux normes fixées par le pays. D'une manière générale, il convient de bien connaître le niveau de contamination initial d'une eau afin de bien adapter le niveau de traitement à la qualité de la ressource. Ainsi, le traitement de l'eau joue un rôle prépondérant dans la prévention des maladies à transmission hydrique.

Une eau potable est produite à partir d'eaux souterraines et/ou d'eaux superficielles traitées schématiquement en 2 étapes : une clarification suivie d'une désinfection.

Les eaux souterraines sont le plus souvent uniquement désinfectées puisqu'elles sont filtrées naturellement à travers le sol avant de rejoindre la nappe phréatique.

Les eaux superficielles subissent un pré-traitement avant l'étape de désinfection finale. Plusieurs étapes et procédés peuvent ainsi être utilisés en fonction de la qualité de la ressource :

- pré-traitement physique tel que le dégrillage et le tamisage débarrassant l'eau des plus gros débris,
- coagulation/floculation/sédimentation permettant une décantation des particules et réduisant la turbidité de l'eau,
- filtration sur sable, anthracite, charbon activé ou sur une combinaison de ces éléments,
- affinage par ozonation ou par adsorption sur charbon actif,
- désinfection par action du chlore, dioxyde de chlore, monochloramine, ozone, ultraviolets...
- des traitements membranaires permettent aussi de retenir les micro-organismes par des techniques de filtration telles que la microfiltration, l'ultrafiltration, la nanofiltration et l'osmose inverse.

2.6.2. Evaluation des traitements usuels sur *Cryptosporidium*

a) Les traitements physiques

Le Tableau III décrit l'efficacité de différents types de traitement physique appliqué à l'eau concernant l'élimination de *Cryptosporidium*.

Etape de traitement	Niveau de turbidité	Elimination de <i>Cryptosporidium</i> (en log)
Sédimentation simple	<1	< 0,5
Filtration simple	<0,5	0,5 à 1
Coagulation/floculation/décantation	<2	0,5
Décantation lamellaire	<1,5	0,5 à 1
Coagulation sur filtre	<0,5	2
Décantation (lit de boue pulsion)	<1	1,5 à 2
Décantation / floc lesté	<1	1,5 à 2
Flottation	<0,5	2 à 3
Coagulation/floculation/ Séparation/filtration	<0,1	3 à 4
Filtration lente biologique	<0,1	4
Filtration terre de diatomée	<0,1	4 à 5
Floculation/décantation/ filtration lente	<0,1	4 à 5
Microfiltration 0,5µm	<0,1	> 5
Ultrafiltration	<0,1	> 5

Tableau III : Efficacité, exprimée en réduction logarithmique décimale, des étapes de traitement de l'eau concernant l'élimination de *Cryptosporidium* sp., en fonction de la turbidité en sortie d'étape de traitement (d'après Baudin *et al.* 2001, rapport interne).

Concernant l'utilisation finale des ultraviolets (UV), plusieurs résultats d'études parus depuis 1998 ont montré l'efficacité du rayonnement UV pour la désinfection de *Cryptosporidium*, entraînant un vif regain d'intérêt pour ce procédé (Clancy *et al.*, 1998; Craik *et al.*, 2001; Drescher *et al.*, 2001). De nouvelles technologies de lampes plus efficaces se sont développées, rendant le procédé de plus en plus rentable. Il s'agit principalement des lampes à « moyenne pression » et « basse pression haute intensité ».

La Figure 7 récapitule l'efficacité du traitement UV pour l'inactivation de divers micro-organismes en conditions contrôlées d'intensité et de temps d'exposition. Tandis que les méthodes d'excystation mettent en évidence une résistance élevée des oocystes aux UV, les méthodes plus récentes d'infectiosité animale et de culture cellulaire montrent une efficacité élevée des UV. Ces deux dernières techniques sont considérées comme les plus représentatives du caractère infectieux des oocystes.

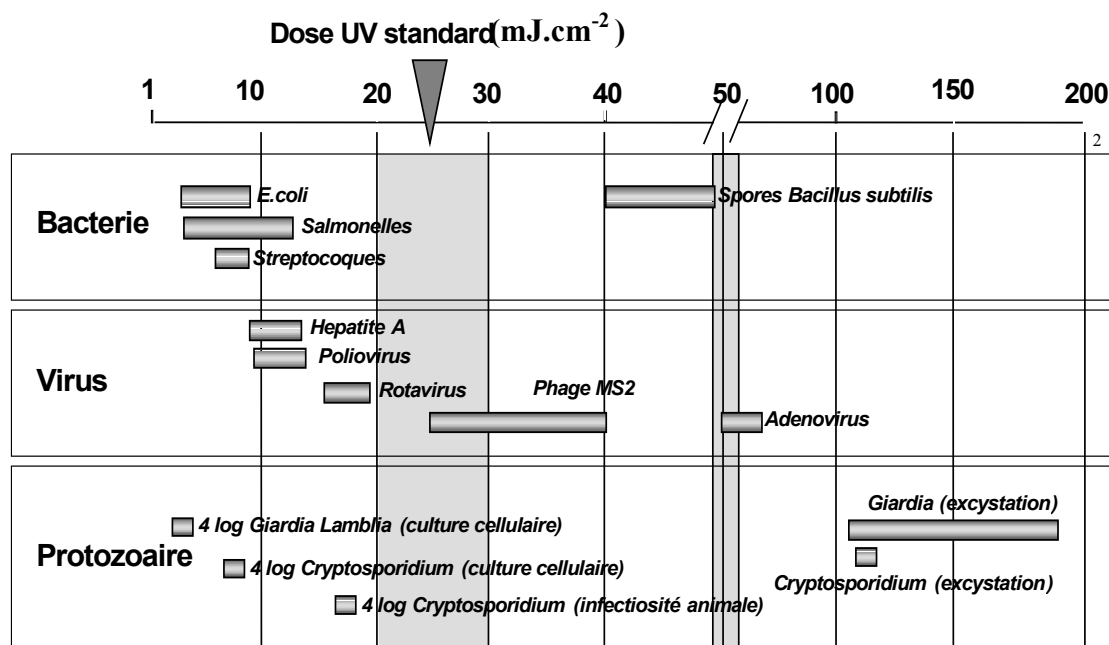


Figure 7 : Récapitulatif de l'efficacité des UV sur divers micro-organismes (Janex *et al.*, 2001)

Les UV ont un potentiel inactivant important vis-à-vis des *Cryptosporidium* mais sont difficilement extrapolables, en pratique, à l'ensemble d'un réacteur. Dans la

pratique, une dose de 25 à 40 mJ.cm² permettrait d'obtenir un abattement de 2 à 3 log pour une turbidité très faible.

b) Les traitements chimiques

L'efficacité d'un traitement chimique vis-à-vis de l'élimination des micro-organismes dépend principalement de la concentration [C] du désinfectant utilisé et du temps [T] de contact. Pour un micro-organisme donné, le produit de ces deux valeurs est voisin d'une constante (CT), exprimée en mg.l⁻¹.min.

Le Tableau IV présente d'une part, pour un traitement effectué aux doses et temps de contact habituellement pratiqués dans les installations, l'importance de l'abattement possible en oocystes de *Cryptosporidium* et, d'autre part, les valeurs des CT correspondant à 1 et 2 logarithmes d'abattement. Ce tableau montre qu'en conditions réelles, les traitements de chloration vis-à-vis de *Cryptosporidium* sont inefficaces.

Procédés de traitement	Valeurs de « CT » et de l'abattement correspondant en traitement habituel		Valeurs de « CT » pour un abattement de :	
	CT (mg.l ⁻¹ .min)	Log	1 log CT (mg.l ⁻¹ .min)	2 log CT (mg.l ⁻¹ .min)
Ozone	1,6	0,5	2,9	5,3
ClO ₂	12	0	52 à 200	140 à 520
Cl ₂	15	0	7000	-
NH ₂ Cl, KMnO ₄ , H ₂ O ₂	Aucun effet		-	-

Tableau IV : Efficacité de traitements chimiques des eaux au regard des *Cryptosporidium* (Baudin et al. 2001)

L'effet de certains agents désinfectants en très fortes concentrations (formol à 10%, ammoniaque à 10%, eau de Javel à 70% ou glutaraldehyde à 3%) les détruit. La concentration en chlore libre nécessaire à l'éradication des *Cryptosporidium* présents serait tout à fait incompatible avec la consommation humaine de l'eau. Ainsi, lorsqu'une eau à 10°C est traitée par chloration (11-12 mg de chlore résiduel par litre), le pouvoir infectant des oocystes peut persister de 4 à 8 semaines.

C'est ainsi que, dans l'ensemble des eaux de distribution publique ayant causé des épidémies de cryptosporidioses, nombreuses étaient celles présentant dans le réseau un taux résiduel de chlore satisfaisant.

2.6.3. Estimation du risque potentiel dû à la présence d'oocystes de *Cryptosporidium* dans l'eau

L'estimation du risque lié à la présence de *Cryptosporidium* dans les eaux potables permet de classer les sites de production et d'identifier les sites les plus sensibles.

Une approche du risque a été développée au CIRSEE par l'équipe de recherche du « Pôle Eau potable » de l'entreprise et est appliquée sur différentes usines françaises mais aussi internationales.

Les risques liés à *Cryptosporidium* sont fonction du type d'eau. La Figure 8 représente le degré de risque lié à *Cryptosporidium* vis-à-vis du type d'eau. Les concentrations en oocystes sont des valeurs indicatives.

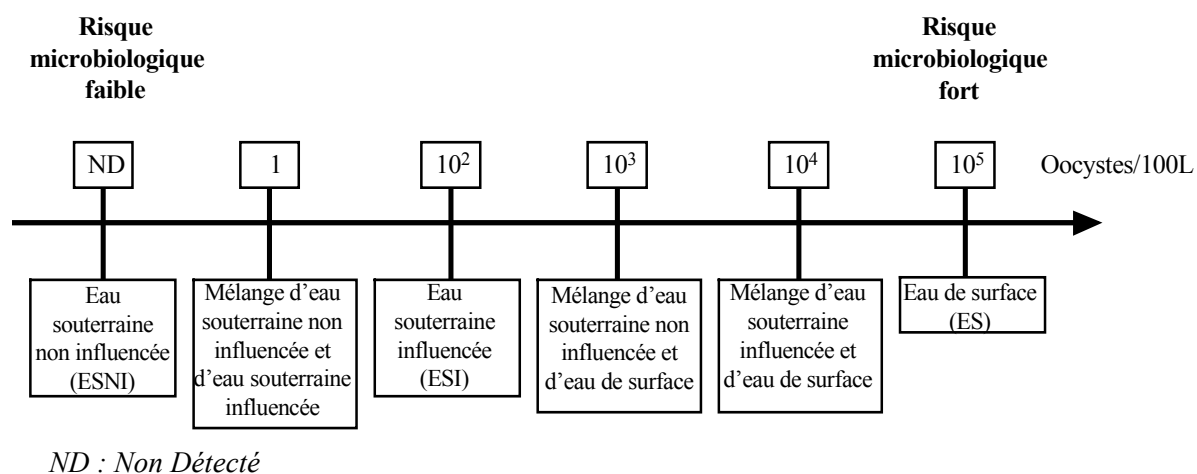


Figure 8 : Echelle de risque en fonction du type d'eau et valeurs indicatives des concentrations en *Cryptosporidium* associées pour 100 l (d'après Charles et al., 2000)

Ces risques liés à *Cryptosporidium* sont aussi fonction des procédés de traitement appliqués. La Figure 9 représente l'échelle d'abattement en *Cryptosporidium* obtenue selon le traitement appliqué au parasite.

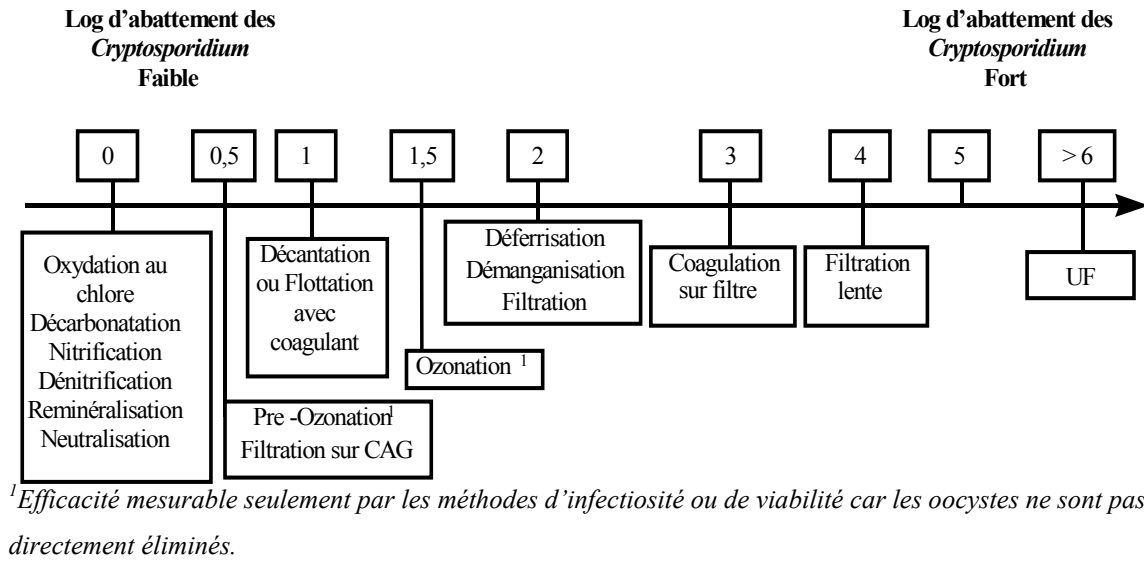


Figure 9 : Abattement (élimination physique ou inactivation) par procédé de traitement exprimé en nombre de Log (d'après Charles *et al.*, 2000)

L'approche développée par le CIRSEE pour estimer le risque potentiel lié à la présence d'oocystes dans les eaux traitées est basée sur le modèle déjà développé par l'USEPA, elle-même déjà basée sur les travaux de Dupont *et al.* (1995). Cette fonction donne la corrélation entre la proportion estimée de sujets infectés et la dose moyenne d'oocystes ingérés. Ce modèle a été validé avec les données de l'épidémie qui a eu lieu en 1993 à Milwaukee (Haas, 1994).

Cette fonction s'écrit sous la forme générale suivante, pour un risque infectieux exprimé sur un an et une concentration en oocystes mesurée dans l'eau brute :

$$P = 1 - \exp\left(-\frac{365 * R * V * C}{1 / p * A}\right)$$

avec,

P : proportion de personnes infestées ;

R : rendement de la méthode analytique ;

V : volume d'eau ingéré par jour ;

C : concentration en oocystes mesurée dans l'eau brute ;

p : probabilité de survie des oocystes dans le corps humain ;

A : taux d'abattement moyen de la filière de traitement.

D'après Haas *et al.* (1994), la valeur la plus probable de p est de $4,673 \cdot 10^{-3}$. D'après une étude bibliographique faite par Nahrstedt et Gimbel (Nahrstedt et Gimbel, 1996), la valeur du rendement de la méthode analytique la plus probable est de 25%. Dans la suite des calculs, la valeur de V est fixée à 2 litres par personne et par jour.

L'approche développée par le CIRSEE (Charles *et al.*, 2000) consiste à utiliser l'équation précédente pour définir 3 domaines de risque (faible, moyen et fort) sur un diagramme où sont reportées en abscisse la concentration potentielle en oocystes dans la ressource (C) et, en ordonnée, l'efficacité d'élimination de la chaîne de traitement associée (A). On tire de l'équation précédente :

$$A = -\frac{365 * V * R}{1 / p * \ln(1 - P)} * C$$

- La droite de risque constant qui correspond au **risque faible** est basée sur la valeur maximum du risque admise par l'USEPA, soit $P = 10^{-4}$ (1 personne infestée sur 10 000/an).
- La droite de risque constant qui correspond au **risque moyen** est basée sur la limite de détection en eau traitée basée à 1 oocyste/100L. La valeur de risque correspondante est $P = 1275 \cdot 10^{-4}$ (1275 personnes infestées sur 10 000/an).
- La droite de risque constant qui correspond au **risque fort** est basée sur le seuil d'alarme proposé par le Drinking Water Inspectorate en Grande Bretagne, soit 10 oocystes pour 100 l d'eau traitée. La valeur de risque associée est $P = 7445 \cdot 10^{-4}$ (7445 personnes infestées sur 10 000 par an). Ce chiffre est à l'évidence très élevé. Il s'agit d'un risque maximum pour une population de sujets particulièrement sensibles (immunodéprimés).

Ainsi la Figure 10 représente le diagramme à deux dimensions construit à partir de ces données.

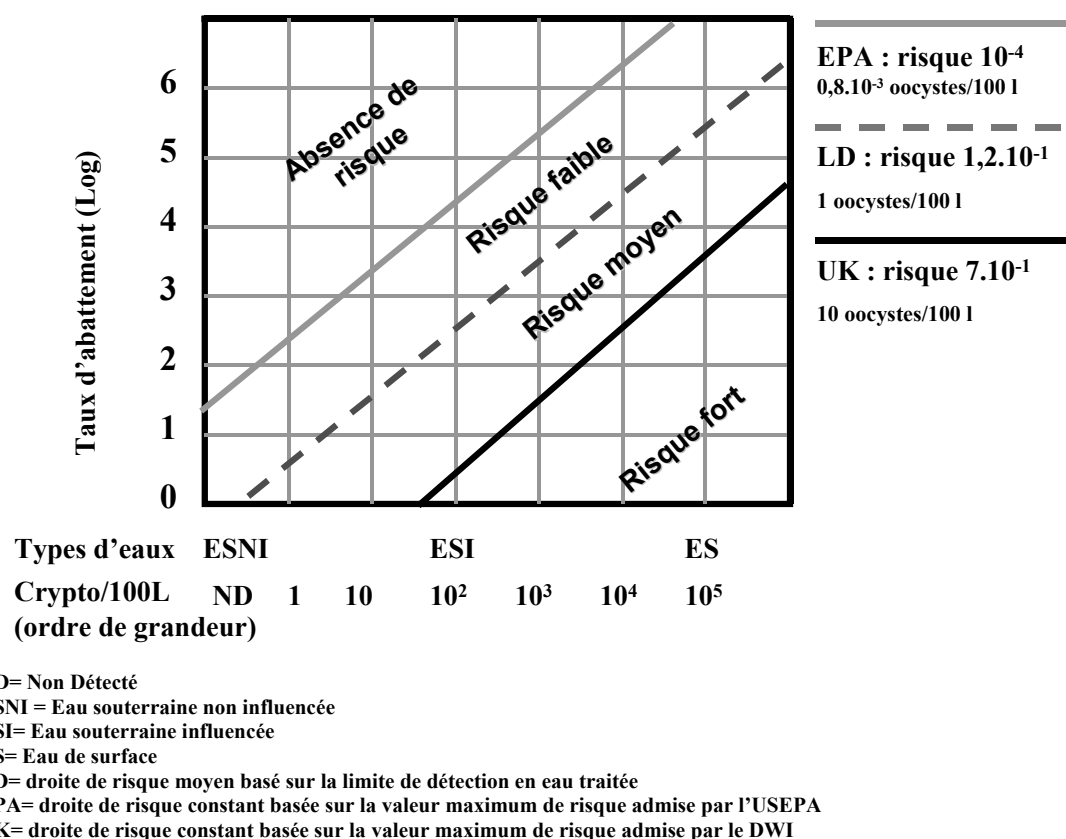


Figure 10 : Diagramme de risque (d'après Charles *et al.*, 2000)

Les sites de production en eau potable sont alors placés sur le diagramme de risque qui relie la concentration en oocystes dans l'eau brute, qui est fonction du type de ressource, à l'efficacité d'élimination des procédés mis en place sur la chaîne de traitement associée.

Cette approche permet d'obtenir une répartition graphique des sites de production en deux dimensions et d'apprécier rapidement la sensibilité d'un site à une éventuelle contamination.

Lorsque des échantillons positifs à *Cryptosporidium* sont détectés et après confirmation de ces résultats analytiques, le site de production d'eau potable est identifié et un plan d'action est décidé en étroite concertation avec la collectivité locale et les autorités sanitaires. Une ressource alternative est recherchée ou un plan d'investissements prioritaires permet de renforcer les moyens de traitement de la ressource concernée.

2.7. Difficultés liées à la détection des *Cryptosporidium* dans l'eau

Une prophylaxie offensive pour les professionnels de l'eau et de la santé publique serait de développer un contrôle très strict des stations d'épuration, des nappes phréatiques, des systèmes de distribution des eaux de consommation et des piscines publiques. Or, l'inactivation des parasites n'est pas toujours fiable vue leur résistance aux agents de destruction chimiques et physiques.

Des techniques de détection et numération des oocystes doivent plutôt être adaptées et, actuellement, la recherche des oocystes de *Cryptosporidium* dans l'eau pose de nombreux problèmes. D'une part, les oocystes sont fortement dilués en milieu hydrique et sont présents parmi de nombreuses matières en suspension interférant sur leur détection. D'autre part, les techniques de détection doivent être très sensibles vu les valeurs faibles en dose minimale infectieuse observées pour ce parasite.

Une étape de concentration de grands volumes d'eau suivie d'une étape de concentration et de purification des oocystes vis-à-vis des interférents doivent donc précéder leur analyse. De plus, une simple analyse microscopique ne permet ni de déterminer spécifiquement l'espèce parvum, ni de déterminer la viabilité ou le caractère infectieux du parasite.

3. Les différentes approches de détection de *Cryptosporidium* dans l'environnement

La recherche en micro-organismes indicateurs de routine ne peut être adaptée à *Cryptosporidium*. En effet, du fait de leur forte résistance dans l'environnement et vis-à-vis des traitements usuels de désinfection, l'absence d'indicateurs bactériens ne peut pas être liée à l'absence d'oocystes viables et potentiellement infectieux.

De plus, ce parasite est très difficilement cultivable in vitro. La méthode la plus adéquate est donc l'examen microscopique des oocystes isolés à partir d'échantillons d'eau et ce, malgré les problèmes de forte dilution des oocystes dans l'eau, la présence de matières en suspension et leur faible dose minimale infectieuse.

3.1. Les méthodes conventionnelles

Actuellement, la technique conventionnelle la plus couramment utilisée pour l'analyse de *Cryptosporidium* est basée sur un marquage par immuno-fluorescence suivi d'une observation du parasite au microscope optique à épifluorescence après concentration initiale des oocystes. Ces méthodes sont normalisées par :

- l'EPA (Environmental Protection Agency) aux USA (USEPA 1622, 1999),
- le DWI (Drinking Water Inspectorate) au Royaume Uni (DWI, 1998),
- l'AFNOR (Agence Française de Normalisation) en France (AFNOR, 2001).

La détection des oocystes de *Cryptosporidium* s'articule en cinq étapes et, pour chacune de ces étapes, différentes techniques ont été mises au point :

- concentration initiale des oocystes par filtration de grands volumes d'eau,
- élution des filtres et concentration des volumes d'élution,
- purification des oocystes vis-à-vis du concentra,
- coloration par marquage immunofluorescent,
- détection.

3.1.1. La méthode de référence USEPA 1622

a) Concentration initiale des oocystes

La première étape de filtration s'effectue via des capsules de filtration. Disponibles sur le marché en différentes matières (polypropylène bobiné, polypropylène plissé, microfibre de verre...), ces capsules ont pour caractéristique de pouvoir filtrer de grands volumes d'eau (100 à 1 000 l) à la vitesse de 1 à 5 l.min⁻¹. Elles présentent l'avantage de peu se colmater, d'être peu encombrantes et d'être maniables et adaptées à des prélèvements sur le terrain.

Les capsules en polyether-sulfone de porosité 1 µm (type Envirocheck, Pall, France) ont été validées pour la méthode de référence de détection de *Cryptosporidium* dans les eaux (USEPA/AFNOR) et sont aujourd'hui les plus utilisées. La Photo 3 présente une capsule Envirocheck. Les volumes de filtration dépendent de la qualité de l'eau (turbidité). Ainsi, une eau très turbide va rapidement colmater la capsule.



Photo 3 : Cartouche Envirocheck (Pall, France)

Les rendements de récupération en *Cryptosporidium* après filtration par capsules sont très variables selon les sources : 70% de récupération pour des eaux peu chargées selon le Clancy Environmental Consultants (organisme de référence aux Etats-Unis), de

22 à 71% de récupération (Musial *et al.*, 1987), 17% de récupération selon l'équipe de Pezzana (Pezzana *et al.*, 1997) ou de 1 à 30% (Shepherd et Wyn-Jones, 1996). Une étude interne au CIRSEE a montré des rendements de récupération de $89,3\% \pm 28,7\%$ pour la cartouche Envirocheck® (Lorthioy et Dumoutier, 1999).

Ces différences sont vraisemblablement dues à plusieurs facteurs comme la qualité de l'eau filtrée, l'âge des oocystes mais aussi le rendement proprement dit de la méthode de détection.

b) Elution et concentration

Après filtration, les oocystes retenus sont récupérés par agitation mécanique du filtre dans une solution d'élution principalement composée de détergents (Tween 80, Laureth-12...).

La Photo 4 présente le type d'agitateur le plus couramment utilisé.

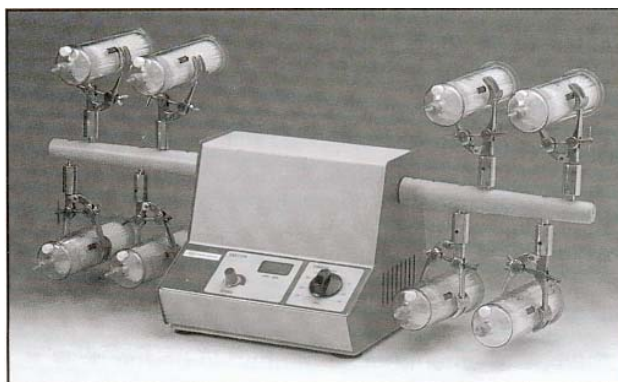


Photo 4 : Agitateur pour cartouches

Une augmentation du nombre de lavages et une optimisation de la formule chimique des éluants ont montré une augmentation des rendements de récupération (LeChevallier *et al.*, 1995; Shepherd et Wyn-Jones, 1996). L'éluat obtenu est concentré par centrifugation sans freinage permettant la formation d'un culot assez compact.

c) Purification des oocystes par séparation immuno-magnétique (IMS)

La séparation immuno-magnétique (IMS) dont le principe est schématisé sur la Figure 11 permet de séparer et de concentrer efficacement des micro-organismes

contenus dans un échantillon par l'utilisation de billes magnétiques sur lesquelles sont fixés des anticorps spécifiques du micro-organisme recherché. Des interactions de type antigène-anticorps fixent donc ces micro-organismes aux billes. Un aimant permet de fixer les billes et purifier et rincer ainsi les billes du concentrat. Les micro-organismes peuvent ensuite être décrochés des billes par altération acide ou être directement visualisés sur celles-ci.

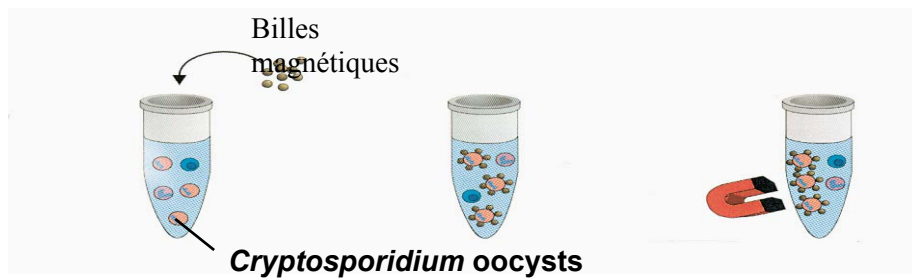


Figure 11 : Principe général de la Séparation Immuno Magnétique (IMS) (DynaL, France).

La Photo 5 montre une vue en microscopie électronique à balayage d'un oocyste fixé à une bille magnétique.



Photo 5 : Oocyste de *Cryptosporidium* (à gauche) lié à une bille magnétique (à droite) par interactions antigène-anticorps. Vue en microscopie électronique à balayage (Miegeville M., CHU de Nantes).

De nombreux laboratoires ont développé des kits IMS et ceux-ci semblent avoir des performances inégales. Le kit Dynal (Dynal, France) est actuellement le plus performant et le plus utilisé. Les rendements de récupération observés pour ce kit sont compris entre 62 et 100% pour des eaux peu turbides (Bukhari *et al.*, 1998; Rochelle *et al.*, 1999). Dernièrement, une étude a montré que 3 kits (Dynal, Genera Purimax™ et Crypto-scan) donnaient des rendements supérieurs à 88% pour des eaux traitées et de 50% à 67 % pour des eaux de surface (Stanfield *et al.*, 2000). Des essais effectués au CIRSEE sur un même culot d'eau de Seine dopé après centrifugation ont montré également une perte de rendement pour les eaux de surface proportionnelle à la taille du culot analysé par IMS (Tableau V).

Volume culot compacté	Nombre théorique de <i>Cryptosporidium</i> présents avant IMS	Nombre de <i>Cryptosporidium</i> lus après IMS	Rendement de récupération en <i>Cryptosporidium</i> après IMS
0,4 ml	127,5	103	80,8 %
0,5 ml	159,0	115	72,3 %
1 ml	319,0	162	50,8 %
2 ml	637,0	262	41,1 %

Tableau V : Rendement de récupération d'oocystes de *Cryptosporidium* en fonction du volume de culot (eau de Seine dopée), (Lorthioy et Dumoutier, 1999)

Cette technique présente l'inconvénient de ne pas être totalement spécifique à une espèce ou un genre puisque les anticorps fixés sur les billes réagissent avec différentes espèces de *Cryptosporidium* mais aussi avec certaines levures ou algues (Rodgers *et al.*, 1995). Cette réaction croisée réduit l'efficacité de l'IMS pour des eaux turbides.

d) Coloration

Les oocystes récupérés sont déposés sur lames à puits et colorés par immunofluorescence (anticorps monoclonal lié à un marqueur fluorescent FITC, Fluorescein Isothiocyanate).

Cette méthode n'est pas strictement spécifique à *Cryptosporidium parvum* mais réagit aussi avec *C.baileyi* et *C. muris* (Garcia *et al.*, 1988). Des résultats faux positifs et faux négatifs sont fréquemment observés (Graczyk *et al.*, 1996). La coloration par immunofluorescence ne permet pas de déterminer pas la viabilité des parasites.

e) Détection - Quantification

Les oocystes colorés par immuno-fluorescence s'observent sous microscope au grossissement x 200 ou x 400 sous une lumière fluorescente de longueur d'onde d'excitation de 490 nm (filtre bleu).

Les critères d'identification sont caractérisés par une fluorescence vert-pomme typique autour de la paroi, une forme sphérique, une taille de 4 à 6 µm de diamètre et une ligne de suture au niveau de la paroi de l'oocyste (visible chez 60% des oocystes frais). La Photo 6 montre un oocyste de *Cryptosporidium* marqué par immunofluorescence tel qu'on peut l'observer.

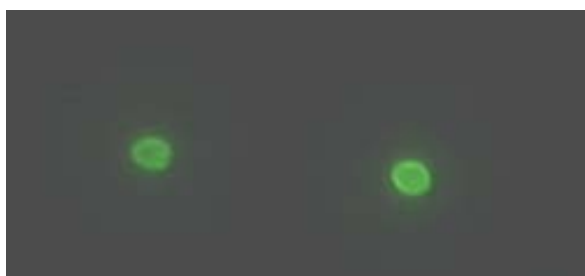


Photo 6 : Oocystes de *Cryptosporidium* marqués par immunofluorescence et visualisés sous microscope optique (CIRSEE, Suez-Environnement) (x400).

Malgré l'étape de purification, l'échantillon d'eau filtré contient souvent des débris et d'autres micro-organismes. La présence d'organismes fluorescents similaires en taille et forme à *Cryptosporidium* augmente la probabilité d'obtenir des faux positifs.

Il est donc préférable d'utiliser des tests complémentaires pour valider l'interprétation. Lorsqu'un oocyste est détecté, une première confirmation sous filtre UV est effectuée pour visualiser les noyaux colorés préalablement au DAPI (4', 6-diamidino-

2-phénylindole). Si nécessaire, une deuxième confirmation par examen en contraste à interférence différentielle (D.I.C. x 1000) peut être pratiquée. Ceci permet de visualiser les organites présents à l'intérieur des oocystes en les mettant en relief.

Néanmoins, un résultat négatif au DAPI et/ou au D.I.C ne permet pas de conclure qu'il ne s'agit pas d'un *Cryptosporidium*. La Photo 7 présente des oocystes de *Cryptosporidium* après immunomarquages en DAPI et en D.I.C.

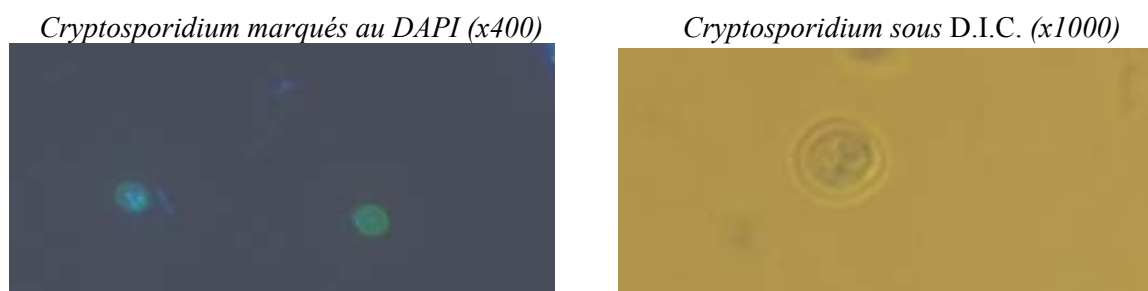


Photo 7 : Oocystes de *Cryptosporidium* visualisés sous microscope (CIRSEE, Suez-Environnement).

3.1.2. La méthode française NF T 90-455

La méthode française NF T 90-455 appliquée à la détection d'oocystes de *Cryptosporidium* dans les eaux potables, les eaux souterraines, les eaux de surface et les eaux résiduaires épurées a pris effet en juillet 2001. Elle est éditée par l'Association Française de Normalisation (AFNOR, 2001).

Cette méthode reprend les étapes de purification des oocystes mises au point par l'USEPA à savoir, une concentration des parasites via une capsule de filtration (Envirocheck® ou équivalent) suivie d'une centrifugation, d'une re-concentration par séparation immuno-magnétique et d'une identification et numération sous microscope à épifluorescence.

Le mode opératoire est donc très proche de celui de l'USEPA même si quelques détails techniques (agitation manuelle possible, protocole de coloration, contrôles qualité...) diffèrent. Cette norme apporte surtout l'avantage de pouvoir utiliser un lecteur automatique de particules fluorescentes (de type cytomètre à balayage) pour la

numération des oocystes à condition de confirmer les résultats obtenus en épifluorescence ou en contraste interférentiel et de contrôler régulièrement l'appareil.

3.1.3. La méthode anglaise du DWI

La méthode anglaise s'applique à la recherche de *Cryptosporidium* dans les eaux traitées. Cette méthode utilise une filtration des eaux traitées via des filtres Filtra-Max™ de mousse compressée puis expansée ayant la capacité de filtrer 1000 litres d'eau en continu. La suite de la méthode consiste, comme les autres méthodes, à re-concentrer les oocystes par une séparation immuno-magnétique puis à les colorer par immuno-fluorescence.

Le Tableau VI compare succinctement les trois méthodes normalisées.

Principe général	Concentration par Filtration -Elution Concentration après centrifugation par IMS (Séparation Immuno-magnétique) Marquage par immunofluorescence FITC et coloration DAPI Dénombrement sous microscope optique		
	USEPA 1622	DWI (UK)	NF T 90-455
Méthode Normalisée Références	Standard Method : <i>Cryptosporidium</i> in water by filtration/IMS/FA. EPA 821-R-99-001. US Environmental Protection Agency	Standard operating protocol for the monitoring of <i>Cryptosporidium</i> oocysts in treated water supplies to satisfy water supply (water quality) regulations. 1998, UK Drinking Water Inspectorate (DWI).	Recherche et dénombrement d'oocystes de <i>Cryptosporidium</i> et de kystes de <i>Giardia</i> . 2001, Association Française de Normalisation AFNOR.
Domaines d'application	Eaux traitées, non – traitées et autres types d'eaux	Eaux traitées	Eaux traitées, Eaux de surfaces et Eaux résiduaires épurées sous certaines conditions.
Volumes prélevés	10 l	1000 l au minimum en continu sous 24 heures	200 L maxi. ou jusqu'à colmatage pour eaux de réseaux, souterraines ou traitées 20 L maxi. ou jusqu'à colmatage pour eaux de surface ou résiduaires
Délai de transport et de conservation des échantillons	Sous 24H	-	< 24H
Filtration	Cartouche Envirochek ou équivalent	Filtre Genera Filtra-Max	Cartouche Envirochek ou équivalent

Support Débit	polyether- sulfone 2 l/min	Mousse compressée puis expansée < 1 l/min	polyether- sulfone < 100l/h
Autres	-	-	Possibilité d'automatisation de la lecture (cytomètre à balayage...)
Commentaires	- Contrôles qualité nécessaires pour valider les résultats - Rendements compris entre 30 et 70% - Méthodes non spécifiques à l'espèce pathogène de l'Homme <i>C. parvum</i> - Pas d'indication sur la viabilité ou le caractère infectieux des oocystes		

Tableau VI : Récapitulatif des trois méthodes normalisées (américaine USEPA 1622, anglaise DWI et française NFT 90-455)

3.1.4. Les limites

Ces méthodes conventionnelles de détection des oocystes de *Cryptosporidium* présentent l'inconvénient majeur d'accumuler les pertes en oocystes à chaque étape de purification. Ainsi, les pourcentages de récupération peuvent varier de 80% à moins d'1% (Nieminski *et al.*, 1995). De plus, l'observation microscopique est une méthode subjective comportant des risques de générer de faux positifs par la présence d'algues auto-fluorescentes ou d'autres organismes. Des techniciens expérimentés à cette technique sont indispensables pour cette détection de *Cryptosporidium* sous microscope.

Enfin, ces méthodes ne sont pas spécifiques de l'espèce pathogène pour l'homme *C. parvum* (anticorps non-spécifiques). Elles ne déterminent pas non plus la viabilité ou le caractère infectieux des parasites détectés et restent assez onéreuses (Rose *et al.* 1988).

3.2. Méthodes alternatives non moléculaires

Compte tenu des limites des méthodes conventionnelles, de nombreux efforts de recherche ont été faits d'une part, pour améliorer le rendement des méthodes et, d'autre part, pour obtenir des informations supplémentaires sur l'état du parasite.

Trois types d'améliorations ont ainsi été envisagés, à savoir :

- des alternatives pour la quantification des oocystes,
- des méthodes visant à déterminer la viabilité du parasite,
- des méthodes déterminant le pouvoir infectieux du parasite.

3.2.1 Alternatives pour la quantification des oocystes

a) Concentration initiale

D'autres méthodes alternatives aux capsules Envirochek® de l'USEPA ou au Filtra-Max™ du DWI permettent de concentrer les oocystes de *Cryptosporidium* à partir de grands volumes d'eau. L'efficacité de ces méthodes alternatives aux cartouches de filtration est très dépendante du type d'eau analysé. Ainsi, en fonction de la qualité de l'eau, des conditions d'échantillonnages ou des moyens du laboratoire, une méthode pourra être choisie par rapport à une autre.

De plus, certains scientifiques préfèrent concentrer un petit volume d'eau et analyser la totalité de cet échantillon, alors que d'autres préfèrent travailler sur un très grand volume et n'analyser qu'une fraction du concentrat final. Les deux approches sont défendables même si les méthodes utilisées pour des petits volumes (10 à 20 litres) sont beaucoup plus faciles et donneraient de meilleurs rendements (Medema, 1999). Il est alors préférable de faire plusieurs répétitions. D'autres facteurs influencent aussi le choix d'une méthode de concentration, à savoir, le site et la distance le séparant du laboratoire.

Les membranes de filtration

La technique de filtration sur membrane est adaptée à des eaux peu chargées. Cette méthode consiste à faire des filtrations d'eau à travers des membranes planes de porosité allant de 5µm à 1µm (Ongerth et Stibbs, 1987). Les oocystes sont élués par vibration et/ou grattage puis concentrés par centrifugation. Les membranes de filtration ont des rendements plus faibles que les capsules de filtration (en particulier pour Envirocheck®) mais restent une bonne alternative pour la détection de oocystes dans les eaux de réseau. Des taux de récupération de 5% à 20% pour des eaux de rivières (20 litres) ont été obtenus avec une sensibilité d'environ 5 oocystes par litres (Ongerth et Stibbs, 1987). Une étude récente comparant différents types de membranes (Stanfield *et al.*, 2000) rapporte des rendements allant de 1% à 96% avec des variabilités importantes principalement dues à l'étape de grattage. Etant donné qu'elles colmatent rapidement, les membranes de filtration ne peuvent être utilisées pour les eaux brutes ou eaux de surface et ne permettent pas de filtrer d'importants volumes d'eau.

La floculation

La floculation repose sur une précipitation par le carbonate de calcium, le chlorure ferrique ou le sulfate d'aluminium par exemple dont les cristaux piègent les particules de taille voisine à celle des oocystes. Ces procédés ont été adaptés à la détection de *Cryptosporidium* dans l'eau grâce aux travaux de Vesey *et al.* (1993b). Cette technique est considérée comme moins abrasive que les méthodes de filtration qui peuvent être responsables de lésions à la surface des oocystes et provoquer une perte d'épitopes nécessaires à la reconnaissance d'anticorps utilisés en coloration par immunofluorescence. Une étude comparant différents floculants a montré des rendements de l'ordre de 80% pour des eaux de turbidité comprise entre 6 et 15 NTU mais inférieurs à 50 % pour des eaux de turbidité supérieure à 20 NTU (Stanfield *et al.*, 2000).

La floculation est très peu utilisée vu son impraticabilité sur le terrain. Elle reste néanmoins une alternative intéressante aux cartouches de filtration pour des eaux très chargées (turbides) puisqu'elle ne présente pas de problèmes de colmatage.

b) Purification des oocystes

La purification par gradient de densité ou flottation

La purification des oocystes peut se faire par gradient de densité ou flottation. Cette technique alternative consiste à centrifuger les oocystes dans un gradient composé de deux phases, l'une constituée par l'échantillon d'eau à tester (de densité égale à un) et l'autre de densité supérieure à celle des oocystes et à l'eau. Ainsi, après centrifugation, les oocystes de *Cryptosporidium* se retrouvent dans l'interface ou dans la phase supérieure, alors que les particules, de densité plus élevée, tombent dans la phase inférieure.

Le principal souci reste de trouver la densité la plus spécifique permettant une clarification maximale de l'échantillon sans perte de *Cryptosporidium*. Des solutions à base de sucre (solution de Sheather) ont été testées et préférées à l'utilisation de formol et d'éther qui provoquaient des distorsions de la paroi des oocystes et les rendaient méconnaissables. Ces solutions offrent des rendements de récupération autour de 67% et 82 % (LeChevallier, *et al.* 1995 ; Rose *et al.*, 1988). Dernièrement, une étude ayant comparé différents types de solutions de gradient n'a pas obtenu de récupérations supérieures à 29 % (Stanfield *et al.*, 2000). La purification par gradient de densité est

donc une technique qui peut être utilisée pour des eaux turbides mais qui a été abandonnée ces dernières années au profit de l'IMS.

La purification par cytométrie de flux
FCCS (Flow Cytometry and Cell Sorting)

Cette méthode, mise au point par Vesey *et al.* en 1993, permet de purifier rapidement et efficacement les oocystes de *Cryptosporidium* colorés. L'échantillon est examiné comme un flux de particules isolées; ainsi les oocystes ne peuvent pas être masqués par des débris (Vesey *et al.*, 1993a). Avant passage au cytomètre de flux, les échantillons sont colorés par des anticorps monoclonaux marqués au FITC. Les particules sont séparées des oocystes dans le cytomètre par des vibrations piézoélectriques qui séparent le flux en gouttelettes qui sont ensuite chargées électriquement. Ces gouttelettes passent entre deux plaques chargées les déviant selon leurs fluorescence, forme et taille. Les oocystes sont ainsi séparés, récupérés sur une lame et confirmés par examen au microscope à épifluorescence.

Il semble que le FCCS soit une méthode plus rapide et plus sensible que les techniques de séparation classiques. Un taux de récupération de 92 % est obtenu sur des eaux de rivière et de réservoir. Elle présente l'avantage de détecter une faible fluorescence (par exemple lorsque les oocystes sont âgés) mais elle a l'inconvénient d'augmenter le nombre de faux positifs par la présence d'autres organismes de taille similaire réagissant avec le FITC ou par la présence d'algues auto-fluorescentes. De plus, cette méthode nécessite un lourd investissement financier à l'achat et en maintenance.

c) Détection

Techniques Immunologiques de type ELISA

Les techniques immunologiques de type ELISA (Enzyme-Linked immunosorbent Assay) mettent en évidence le parasite par interaction antigénique. Les structures antigéniques du parasite sont prises en sandwich entre un anticorps adsorbé sur un support solide et un deuxième anticorps couplé à une enzyme. Cette technique, non spécifique à l'espèce *C. parvum*, est utilisée en diagnostic pour la détection des *Cryptosporidium* dans les fèces (Anusz *et al.*, 1990; Newman *et al.*, 1993).

Cytométrie à balayage de type Chemsan® RDI

Le Chemsan® RDI (Chemunex, AES, France) est un cytomètre à balayage permettant une lecture automatique des oocystes sous microscope. Il permet de dénombrer directement des micro-organismes cibles colorés préalablement par des marqueurs fluorescents spécifiques au moyen d'un balayage par un faisceau laser précis et rapide.

Cette technique a été adaptée au dénombrement des oocystes de *Cryptosporidium* préalablement marqués par un marqueur fluorescent de type FITC (Reynolds *et al.*, 1999; Rushton *et al.*, 2000). La discrimination se fait selon la longueur d'onde émise par le fluorochrome, l'intensité du signal, la forme du signal ou le recoupement de ligne à ligne. Tous les signaux enregistrés peuvent être confirmés par lecture directe sous microscope équipé d'une platine motorisée connectée au cytomètre afin de vérifier s'il s'agit bien d'un oocyste ou non.

De plus en plus utilisée pour la détection de *Cryptosporidium*, cette technique présente l'avantage d'avoir été intégrée à la norme française NF T 90-455 pour l'analyse de routine de *Cryptosporidium* dans les eaux. En effet, des tests de validation par dopages d'eaux usées et eaux de réseau ont donné les mêmes pourcentages de récupération et la même sensibilité que le protocole de l'AFNOR (De Roubin *et al.*, 2002). Elle présente néanmoins l'inconvénient de devoir systématiquement confirmer les lames lorsque celles-ci sont chargées au risque d'avoir de nombreux faux-positifs.

3.2.2. Méthodes ciblant la « viabilité »

Déterminer la viabilité, c'est à dire l'état mort ou vivant des oocystes de *Cryptosporidium*, constitue un point important lors de leur détection dans des échantillons d'eau. En effet, si ceux-ci peuvent survivre dans l'environnement pendant plusieurs mois, une fraction pouvant être importante correspond à des oocystes morts ou endommagés et, par conséquent, ne présentant aucun danger pour la santé publique (LeChevallier *et al.*, 1991). Déterminer la viabilité des oocystes retrouvés dans un échantillon d'eau est donc essentiel pour évaluer l'exposition au risque de cryptosporidiose.

Les méthodes actuelles déterminant la viabilité sont malheureusement peu fiables ou longues et difficiles à mettre en oeuvre. Elles sont basées sur un marquage cellulaire de l'activité physiologique au moyen de colorants vitaux fluorogéniques ou sur des essais d'excystation *in vitro* et sur l'observation microscopique de la morphologie des oocystes.

a) Coloration au DAPI-PI

Cette méthode consiste à estimer la viabilité des parasites en vérifiant leur intégrité membranaire par une technique d'inclusion/exclusion combinant deux colorants : le DAPI (4', 6-diamidino-2-phénylindole) auquel toutes les membranes sont perméables et le PI (iodure de propidium) qui est exclu par les cellules viables ayant leurs membranes intactes (Campbell *et al.*, 1992). Ainsi, deux classes d'oocystes peuvent être identifiées : DAPI+/PI- pour les oocystes viables, DAPI+/PI+ pour les non viables.

Cette technique simple n'est pas toujours très fiable et, par exemple, des oocystes morts peuvent avoir leur membrane intègre. Elle s'utilise donc plus pour confirmer la présence d'oocystes et suspecter une éventuelle viabilité.

b) L'excystation *in vitro*

L'excystation *in vitro* consiste à exposer les oocystes à un milieu adapté à la forme végétative infectante. Ainsi, la viabilité est mise en évidence par excystation des oocystes, c'est-à-dire par libération des 4 sporozoïtes qu'ils contiennent (Fayer et Leek, 1984; Korich *et al.*, 1990; Campbell, Robertson et Smith, 1992; Robertson *et al.*, 1993). Les sporozoïtes libérés sont observés au microscope et un ratio entre leur nombre et la quantité d'oocystes excystés est calculé afin d'estimer une proportion d'oocystes viables. Cette technique a été utilisée pour observer les effets de différents traitements désinfectants (Robertson *et al.*, 1992; Finch *et al.*, 1993; Black *et al.*, 1996). Cette méthode ne suffit pas toujours à déterminer la viabilité des oocystes, celle-ci étant influencée par différents facteurs tels que l'âge des oocystes, les conditions environnementales, le pH, la température, la présence de molécules oxydantes... (Brasseur *et al.*, 1998). De plus, sa faible sensibilité ne lui permet pas d'être applicable à des échantillons environnementaux où la quantité en oocystes est trop faible.

3.2.3. Méthodes ciblant le caractère infectieux

Toutes les formes viables des oocystes ne sont pas nécessairement infectantes. Cette capacité à infecter des oocystes (définie par le terme d'infectiosité) ne peut être mesurée que par des infections expérimentales sur des volontaires humains, des animaux de laboratoires ou, éventuellement, par cultures cellulaires. On atteint alors les limites d'accessibilité de l'information utile vis-à-vis d'une éventuelle exposition à *Cryptosporidium*.

a) L' infectiosité chez l'animal

Le pouvoir infectieux du parasite sur l'animal assure son caractère pathogène : on parle alors d'infectiosité. L'utilisation du modèle animal souriceau BALB/c-NMRI est choisi comme le plus adapté à *Cryptosporidium*. Des souriceaux de 4 jours sont inoculés par voie orale puis sacrifiés sept jours plus tard. Leur tube digestif est broyé, coloré à la carbofuchsine puis examiné en microscopie à contraste de phase. Un souriceau est considéré comme positif lorsqu'un oocyste est mis en évidence. Cette méthode a une sensibilité estimée à 79 oocystes ingérés pour avoir une réponse positive dans 50% des cas et 310 oocystes ingérés pour avoir une réponse positive dans 100% des cas (Finch *et al.*, 1993b). D'autres colorations des oocystes associant une immunofluorescence (FITC) et des Ac monoclonaux puis une détection par cytométrie de flux ont dernièrement permis d'obtenir de meilleurs résultats en terme de sensibilité puisque 1 à 10 oocystes infectieux inoculés initialement ont été détectés dans 70% des cas (Delaunay *et al.*, 2000). Ces tests mesurant l'infectiosité chez l'animal permettent d'évaluer un risque même si elles ne reflètent pas forcément l'infectiosité chez l'homme (doses minimales infectieuses et pouvoir pathogène différents selon la souche et le receveur).

b) La culture cellulaire

Ces modèles d'infectiosité in vitro utilisent des cultures cellulaires et peuvent être adaptés à des concentrats d'eau (Upton *et al.*, 1995; Slifko et Kose, 1998; Weir *et al.*, 2001; Pokorny *et al.*, 2002; Rochelle *et al.*, 2002;). Le concentrat d'eau est coulé sur une mono-couche cellulaire et laissé en contact un temps suffisant pour permettre aux oocystes d'infecter les cellules. La culture cellulaire lavée est observée 24 à 48 heures après. Des techniques immunofluorescentes ont été utilisées pour identifier les cellules

infectées (présence d'antigènes du parasite intracellulaire ou d'acides nucléiques). Une quantification des cellules infectées est possible mais ne reflète pas forcément le nombre d'oocystes infectieux car plusieurs d'entre eux peuvent infecter une même cellule. La culture cellulaire n'est pas une méthode très sensible (minimum 100 oocystes) et ne donne qu'une approximation des oocystes présents dans un concentrat d'eau (Widmer *et al.*, 1999).

Le Tableau VII récapitule l'ensemble des méthodes de détection non moléculaires adaptées à *Cryptosporidium*.

	Méthode	Principe	Spécifique	Sensible	Quantitative	Faux positifs	Faux négatifs	Durée du test	Laborieuse	Coût
Présence / Absence	Immuno-fluorescence	Reconnaissance de type Ag-Ac sous microscope optique	Non	Oui +	Oui	Algues-Artefacts	Défaut de coloration	< 2H	Oui	++
	ELISA	Reconnaissance de type Ag-Ac	Non	Oui +	Oui	Algues-Artefacts	Défaut de coloration	< 2H	Oui	++
	Cytométrie à balayage	Reconnaissance de type Ag-Ac et discrimination au laser sous m. optique	Non	Oui +	Oui	Algues-Artefacts	Défaut de coloration	< 2H	Non	+++
	Cytométrie de flux	Reconnaissance de type Ag-Ac et discrimination au laser	Non	Oui	Oui	Algues-Artefacts	Défaut de coloration	< 2H	Non	+++
Viabilité	DAPI-PI	Mesure l'intégrité (perméabilité) de la membrane	Non	Oui +	Oui	Algues-Artefacts	Défaut de coloration	< 2H	Oui	+
	Cytométrie - DAPI	Automatise la lecture sous microscope optique	Non	Oui +	Oui	Algues-Artefacts	Défaut de coloration	< 2H	Non	+++
	Excystation	Dékystement des oocystes in vitro	Non	Non	Oui	Oui (rarement)	Peu sensible	< 1 jour	Non	+
Infectivité	Culture cellulaire	Mesure l'infectiosité in vitro	Non	Non	Non	Oui (contaminations)	Peu sensible	< 3 jours	Oui	+++
	Infectiosité chez l'animal	Mesure l'infectiosité in vivo chez le souriceau	Non	Non	Non	Non	Résistance sensibilité	≥ 1 semaine	Oui	++++

Tableau VII : Récapitulatif des méthodes de détection non moléculaires adaptées à *Cryptosporidium*

3.3. Méthodes moléculaires

Les méthodes moléculaires ciblant *Cryptosporidium* offrent actuellement de nombreuses possibilités d'améliorations en terme de spécificité, sensibilité, rapidité, objectivité, reproductibilité des résultats, automatisation, coût...

3.3.1. Détection moléculaire

a) Détection de type présence/absence

Le génome des *Cryptosporidium* a tout d'abord été mis en évidence par des techniques d'hybridation moléculaire (dot blot) à l'aide de sondes s'hybridant à l'ADN (Kafatos *et al.*, 1979; Taylor *et al.*, 1988) mais ces méthodes ne sont pas adaptables à des échantillons de l'environnement du fait de leur faible sensibilité de l'ordre de 10^4 à 5.10^4 oocystes (Johnson *et al.*, 1993).

Actuellement très utilisée, la polymérase chain reaction (PCR) a permis de détecter avec une grande sensibilité des séquences d'acides nucléiques spécifiques du genre ou de l'espèce du micro-organisme recherché. Dès 1991, cette technique est adaptée spécifiquement à l'espèce *C. parvum* (Gooze *et al.*, 1991; Laxer *et al.*, 1991). Les principaux avantages de cette méthode est sa sensibilité (de 1000 à 10 000 fois supérieure à celle de l'hybridation moléculaire) et sa spécificité grâce aux amorces d'amplification (Johnson *et al.* 1993). Cette technique offre aussi l'avantage d'être automatisée et de pouvoir traiter plusieurs échantillons simultanément.

La PCR permet d'analyser des échantillons d'eau facilement et rapidement. D'importantes difficultés sont néanmoins rencontrées lors de l'application de cette méthode à des échantillons environnementaux du fait de la présence d'inhibiteurs dans les concentrats d'eau (Johnson *et al.*, 1995). Des adaptations de type contrôle interne d'amplification ou des nested PCR (double amplification par PCR) (Balatbat *et al.*, 1996; Mayer et Palmer, 1996; Gibbons et Awad-El-Kariem, 1999; Monis et Saint, 2001) ont permis de pallier à ces limitations.

Une étude permettant l'adaptation de la PCR à différents échantillons d'eau a été effectuée au CIRSEE. Une concentration par les cartouches Gelman, une purification par séparation immuno-magnétique (IMS) des oocystes de *Cryptosporidium* et l'extraction

d'ADN par chocs thermiques précèdent une amplification par PCR adaptée à *C. parvum* (Hallier-Soulier et Guillot, 1999; 2000). Ces travaux ont permis d'obtenir un test sensible et spécifique de l'espèce *C. parvum* puisque 1 à 5 oocytes ont été détectés dans 5 à 100 litres d'eau de réseau initialement dopée. Contrairement à l'IMS-IFA, ces techniques présentent l'avantage d'une meilleure sensibilité pour tous types d'eaux (de réseau, de surface, usées ...).

Au regard du succès de cette technique, de nombreux protocoles de PCR ont été développés afin de détecter l'ensemble du genre *Cryptosporidium* ou plus spécifiquement une espèce donnée, en particulier l'espèce *C. parvum* pathogène pour l'homme (Johnson *et al.*, 1995; Rochelle *et al.*, 1997a; Wiedenmann *et al.*, 1998; Chung *et al.*, 1999; Loge *et al.*, 2002). Chaque étude a son propre seuil de détection, variable selon le type d'eau. Ainsi, alors qu'une PCR adaptée à une eau peu turbide a une limite de détection de 1 oocyste, celle-ci, adaptée à des échantillons environnementaux ou à des échantillons de fèces, aura une limite de détection de 10 à 1000 fois supérieure (Johnson, *et al.* 1995; Balatbat, *et al.*, 1996; Kostrzynska *et al.*, 1999).

Malgré ces inconvénients, la détection de *Cryptosporidium* par PCR est beaucoup plus sensible que la détection sous microscopie optique (Deng *et al.*, 1997).

b) Génotypage

Des variantes de la technique PCR ont été utilisées dans des études génétiques ou épidémiologiques de *Cryptosporidium* par le biais de la RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) (Morgan *et al.*, 1995; Comes *et al.*, 1996; Singh, 1997) ou la RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) (Bonnin *et al.*, 1996; Sulaiman *et al.*, 1999; Xiao *et al.*, 2001).

Cette caractérisation d'espèce peut aussi s'effectuer par séquençage complet de régions amplifiées.

c) Quantification

La PCR compétitive ou comparative

Les PCR compétitives et comparatives ont été développées pour pallier aux limites de la détection de type présence-absence d'une simple PCR et permettre de quantifier l'ADN cible présent initialement dans l'échantillon.

Leur principe est basé sur l'addition dans le tube réactionnel d'une quantité connue d'ADN compétiteur pour l'une ou d'une quantité connue ADN standard non compétiteur pour l'autre et co-amplifiée avec l'ADN cible d'intérêt. Le rapport d'épaisseur de bande des produits amplifiés de fin de réaction et visualisés par électrophorèse permet de déterminer la quantité initiale de molécule cible. Ces PCR quantitatives très fastidieuses lors de la mise en œuvre nécessitent un dosage du standard pour chaque essai.

La PCR en temps réel

La PCR en temps réel ou TaqMan PCR est actuellement la technique la plus adaptée pour la quantification des ADN d'un micro-organisme donné. Apparue récemment, cette technique utilise la technologie TaqMan® et les performances de l'appareil ABI Prism 7700 Sequence Detection System (PE Applied Biosystems) composé d'un thermocycleur couplé à un système de détection d'intensité de fluorescence (Photo 8).

Contrairement à la PCR classique où l'on fait une mesure en point final des produits PCR amplifiés, le principe de cette technologie consiste à mesurer, en temps réel, une augmentation de fluorescence (en utilisant la chimie TaqMan) liée à l'amplification et à l'accumulation des fragments d'ADN cibles au fur et à mesure des cycles de PCR (Livak *et al.*, 1995; Heid *et al.*, 1996).

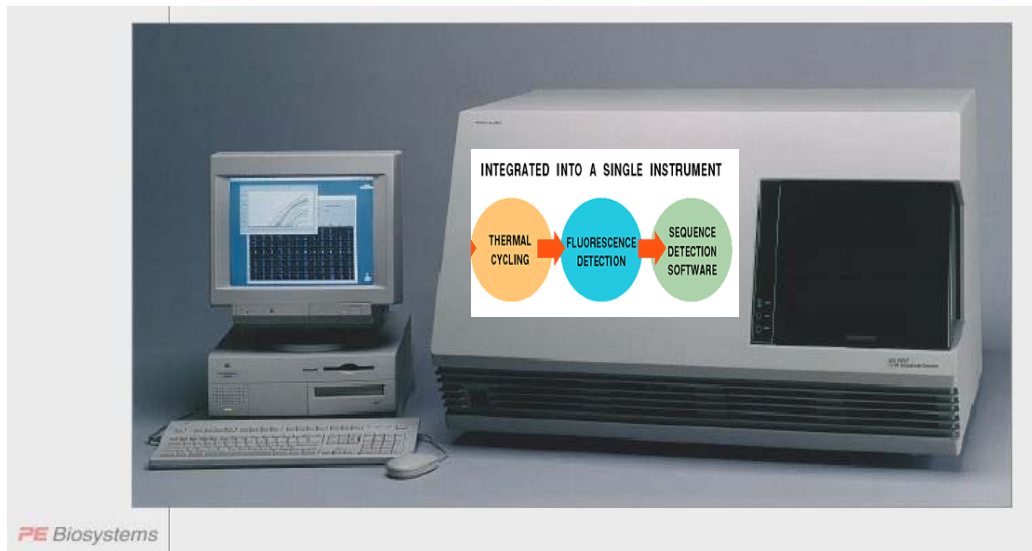


Photo 8 : ABI Prism™ 7700 sequence detection systems (Applied Biosystems)

La Figure 12 montre les cinétiques d'amplification obtenues après amplification de 96 répliques d'un même échantillon. La mesure de l'amplification s'effectue en début de la phase exponentielle de la cinétique, lorsque la répétabilité de la mesure est optimale.

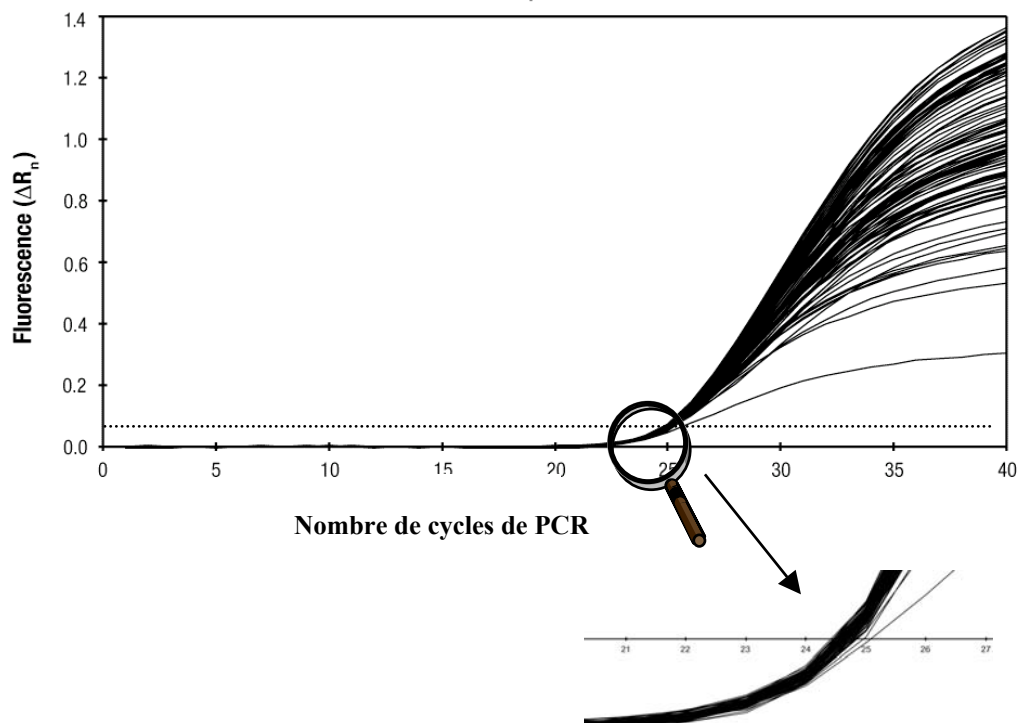


Figure 12 : Cinétiques d'amplifications obtenues en TaqMan PCR sur 96 répliques initialement identiques.

Ce système automatisé mesure directement la fluorescence dans les tubes fermés tout au long des cycles programmés. Dès la fin de la programmation, les résultats sont exploitables sous forme de courbe.

Au début de cette étude sur *Cryptosporidium*, aucune adaptation de cette technique à ce parasite n'existait, si ce n'est une communication orale décrivant des premiers essais (Di Giovanni *et al.*, 1999). Depuis, parallèlement à mes travaux, d'autres équipes de recherche ont publié sur le sujet. Elles ont adapté la PCR quantitative à des échantillons de fèces contenant un grand nombre d'oocystes et peu d'inhibiteurs de PCR (Higgins *et al.*, 2001) à des tests d'efficacité de traitement (McDonald *et al.*, 2002) ou à des tests associés à du génotypage (Limor *et al.*, 2002; Tanriverdi *et al.*, 2002).

3.3.2. Méthodes moléculaires et « viabilité »

Afin de déterminer de façon plus appropriée le danger d'exposition au risque « *Cryptosporidium* », des méthodes moléculaires visant à cibler l'état mort ou vivant des oocystes ont été développées.

a) Fluorescent Hybridation In Situ (FISH)

Cette approche moléculaire alternative est basée sur la détection des oocystes via des sondes nucléiques ciblant et se fixant sur les molécules d'ARN 18S. Cette méthode de fluorescence *in situ* a été adaptée à *C. parvum* et détecte spécifiquement la présence des ARNr 18S chez des oocystes viables (Vesey *et al.*, 1995). L'hybridation est spécifique du genre *Cryptosporidium* ou de l'espèce *C. parvum*. Les ARN 18S sont présents, selon les auteurs, en grand nombre dans les cellules viables et ont une demi-vie courte (le taux d'ARN 18S diminuant rapidement après la mort des oocystes) (Vesey *et al.*, 1998). Une coloration immunofluorescente des oocystes est souvent associée à la fluorescence des sondes nucléiques souvent peu lumineuses afin de palier aux interférences des particules auto-fluorescentes (algues). Cette méthode étant basée sur une détection microscopique et non sur une amplification des ARNr 18S, elle est, par conséquent, moins sensible que la PCR.

b) Reverse Transcription PCR (RT-PCR)

Cette technique dérivée de la PCR ajoute une étape de transcription inverse des ARN en ADNc ensuite amplifiés par PCR. Ainsi, elle permet de cibler des molécules dites « marqueurs de viabilité » du à leur rapide dégradation après la mort du parasite. Divers ARN ont été ciblés : ARNr 18S, ARNm codant pour des protéines de résistances à la chaleur (HSP70), pour la protéine beta-tubuline, pour l'enzyme amyloglucosidase... (Widmer *et al.*, 1999; Jenkins *et al.*, 2000; Hallier-Soulier et Guillot, 2003).

c) In vitro excystation PCR / RT-PCR

La PCR ou la RT-PCR permettent d'apporter à la méthode d'excystation in vitro deux avantages que cette méthode ne possédait pas : la spécificité d'espèce grâce à l'utilisation d'amorces de PCR spécifiques et la sensibilité puisque les sporozoïtes sont mis en évidence par PCR après excystation (Wagner-Wiening et Kimmig, 1995). Cette technique est très lourde à mettre en œuvre.

3.3.3. Méthodes moléculaires et caractère infectieux

La technique de PCR peut être combinée à la méthode de détection de l'infectiosité des oocystes via la culture cellulaire (Culture cellulaire-RT-PCR). Ainsi, la PCR apporte l'avantage de coupler la sensibilité à l'infectiosité. Les nombreux travaux de P.A. Rochelle ont permis d'optimiser la RT-PCR associée à la culture cellulaire de façon à ce qu'elle soit une alternative équivalente aux méthodes d'infectiosité in vivo. (Rochelle *et al.*, 1996, 1997b, 2002). Cette méthode rencontre néanmoins d'importants problèmes de reproductibilité, elle est très lourde à mettre en œuvre et nécessite au moins 2 à 3 jours de culture cellulaire.

Le Tableau VIII récapitule ces méthodes de détection moléculaires adaptées à *Cryptosporidium*.

	Méthode	Spécificité	Sensibilité	Quantification	Durée du test	Coût
Présence/ Absence	PCR	+++	+++	Non	< 4H	+
	Nested PCR	+++	++++	Non	< 5H	++
Quantification	PCR comparative ou compétitive	+++	+++	Oui	< 2 jours	++
	Real-time PCR	+++	+++	Oui	< 3H	+++
Viabilité	RT- PCR	+++	+++	Non	< 5H	++
	FISH	++	++	Semi	< 5H	+++
	In vivo excystation-PCR	+++	++	Non	< 2 jours	+++
Infectivité	Culture cellulaire- (RT)-PCR	+++	++	Non	< 3 jours	+++
	Culture cellulaire- FISH	++	++	Semi	< 3 jours	+++
Génotypage	RAPD	+++	+++	Non	< 5H	++
	PCR- RFLP	+++	+++	Non	< 6H	++
	Séquençage	++++	++	Non	< 3 jours	+++

Tableau VIII : Récapitulatif des méthodes de détection moléculaires adaptées à *Cryptosporidium*

Chapitre II. La PCR en temps réel, un outil quantitatif pour l'analyse spécifique de *C. parvum*

1. Introduction

Décrite pour la première fois en 1985 (Saiki *et al.*, 1985), la Polymérase Chain Reaction (PCR) est devenue la technique la plus utilisée pour la détection de l'ADN ou de l'ARN (après une étape de transcription inverse).

Quoi qu'il en soit, les caractéristiques de cette méthode d'amplification ne peuvent permettre d'utiliser son format classique pour quantifier précisément les acides nucléiques présents dans un échantillon. En effet, bien qu'il existe une relation quantitative théorique entre le nombre de séquences cibles initialement présentes et la quantité de produits amplifiés durant les cycles de PCR, il n'est pas rare en pratique d'observer des taux variables d'amplicons en fin de réaction (Figure 13).

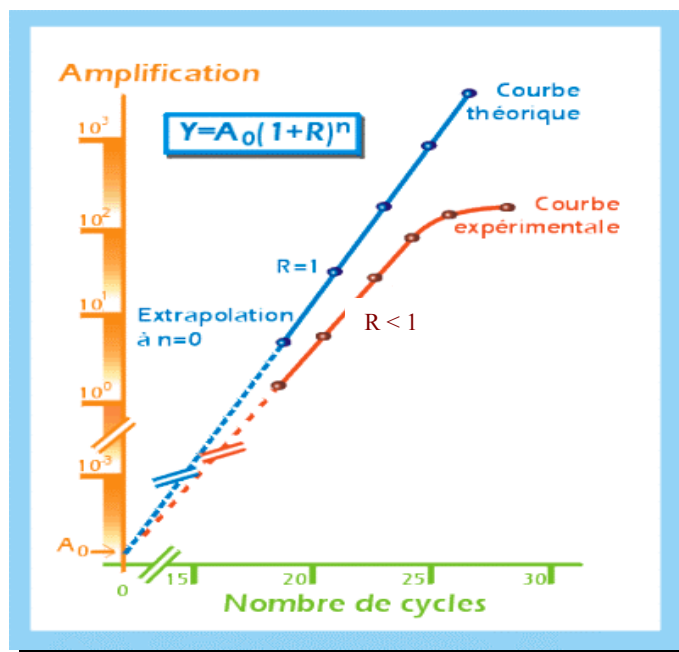


Figure 13 : Courbes théorique et expérimentale de l'amplification par PCR

Des variations non prévisibles (concentration en cible, qualité et pureté des composants initiaux, cycles ...) affectent constamment la quantité finale en amplicons accumulés (Desjardin *et al.*, 1998).

Ces dernières années, l'intérêt des scientifiques s'est porté sur le développement d'approches quantitatives moléculaires afin de pallier à cet aspect qualitatif de la PCR. De multiples méthodes ont été proposées, basées sur :

- des cinétiques de détection par l'utilisation d'agents intercalants (Saiki *et al.*, 1989; Higuchi *et al.*, 1992; Higuchi *et al.*, 1993),
- des captures d'amplicons par des sondes hybridées sur membranes ou autres phases solides (DiDomenico *et al.*, 1996; Saiki, *et al.*, 1989),
- des utilisations d'amorces marquées (Dahlen *et al.*, 1991),
- des couplages PCR-ligase chain reaction (Barany, 1991).

Finalement, le phénomène non maîtrisable de phase finale « plateau » lors de l'amplification n'a permis à aucune de ces approches de réellement aboutir. Seules des estimations semi-quantitatives ont pu être déduites.

D'autres méthodes plus fiables de PCR quantitatives basées sur l'utilisation d'un standard interne (PCR compétitive) ou externe (PCR comparative) amplifié simultanément à l'ADN cible ont également été développées (Haberhausen *et al.*, 1998). Ces méthodes sont assez difficiles à mettre en œuvre et requièrent des standards proches, en taille et en structure, de l'ADN cible amplifié. Des applications ont été décrites sur *Cryptosporidium* afin de les quantifier à partir d'échantillons d'eau ou du sol (Walker *et al.*, 1998; Chung *et al.*, 1999; Udeh *et al.*, 2000) mais ces méthodes sont apparues fastidieuses et peu transposables à un travail de routine (Walker *et al.*, 1998).

Le développement de la PCR en temps réel est très récent et a apporté de nouvelles perspectives pour des applications quantitatives. Les prémices de cette méthode ont été l'incorporation de dNTP radioactifs ou fluorescents pendant la phase exponentielle d'amplification et l'observation des bandes d'amplification par autoradiographie ou détection laser (Furtado *et al.*, 1993; Jin *et al.*, 1994).

L'idée initiale d'une méthode de PCR analysée en temps réel par l'utilisation de sondes TaqMan™ fluorescentes date de 1991 (Holland *et al.*, 1991). Son développement par la société Perkin Elmer s'est révélé extrêmement innovant (Livak *et al.*, 1995).

Grâce à l'analyse des échantillons dans leur phase exponentielle d'amplification, elle permet d'éliminer les variations de quantités d'amplicons observées en fin de cycle. **La technologie TaqMan PCR permet ainsi de quantifier en temps réel un micro-organisme cible par la mesure des amplicons synthétisés et accumulés au fur et à mesure des cycles de PCR.**

Cette approche moléculaire a rapidement remporté un large succès. En 1998, une équipe scientifique a comparé cette méthode à la PCR compétitive (Desjardin *et al.*, 1998). Ces deux types de PCR se sont révélées reproductibles et adaptées à la quantification. Cependant, la TaqMan PCR est, de loin, plus rapide, moins laborieuse et présente l'avantage de pouvoir traiter simultanément un nombre important d'échantillons. Depuis, cette technique a progressivement été adaptée à de nombreux micro-organismes.

Les premiers travaux d'adaptation de la technologie TaqMan sont apparus en 1999 pour la détection et la quantification rapide de pathogènes bactériens (Lee *et al.*, 1999 ; Leutenegger *et al.*, 1999; Manganelli *et al.*, 1999), viraux (Martell *et al.*, 1999 ; Ryncarz *et al.*, 1999) et parasitaires (Pusterla *et al.*, 1999).

Depuis, le procédé de TaqMan PCR s'est beaucoup développé et s'est révélé être un outil puissant. Des analyses d'expression de gènes, de réponse cellulaire à différentes drogues, de détection de mutations, de génotypage, de détection et quantification d'agents pathogènes, de quantification d'ADN et d'ARN, d'essais d'expression et de distribution pour la thérapie génique et, finalement, d'évaluation d'ADN résiduel sont quelques exemples d'applications de plus en plus répandues en PCR en temps réel.

L'objectif premier de cette étude a consisté à mettre au point un test TaqMan PCR spécifique et adapté à des oocystes de C. parvum.

L'objet de cette étude a été de montrer qu'un format de PCR quantitative en temps réel pouvait être appliqué à la détection spécifique du parasite *C. parvum*. Cette étape initiale était indispensable avant de pouvoir transposer cette méthode à l'analyse de *Cryptosporidium* dans l'eau.

Un premier travail a été de sélectionner théoriquement un couple d'amorces et une sonde TaqMan™. Les conditions d'amplification ont été testées expérimentalement et optimisées sur de l'ADN plasmidique. La spécificité, la répétabilité et la sensibilité ont ainsi été évaluées.

Un second travail a permis d'adapter ce test TaqMan PCR à des solutions pures d'oocystes de *C. parvum*. Des modifications dans la composition du mix réactionnel d'amplification ont tout d'abord été nécessaires et l'étape de lyse des oocystes a été améliorée. Différentes gammes de dilution d'oocystes de *C. parvum* ont ensuite été amplifiées et ont permis l'obtention d'une droite d'étalonnage permettant la quantification de suspensions inconnues.

2. Matériel et Méthodes

2.1. Le principe TaqMan

Le principe d'un test TaqMan PCR consiste à évaluer en temps réel la quantité de fragments d'ADN amplifiés et accumulés durant une PCR. Cette technologie est basée sur la détection et la quantification d'un fluorochrome émetteur tout au long des cycles d'amplification. L'augmentation du signal fluorescent est alors directement proportionnelle à la quantité d'amplicons générés durant la réaction de PCR (Heid *et al.*, 1996).

La technologie TaqMan est basée sur l'activité 5'exonucléasique de la Taq polymérase permettant d'hydrolyser une sonde fluorescente hybridée à sa séquence cible sur l'amplicon durant l'étape de polymérisation de la PCR.

Cette sonde est une séquence nucléotidique interne au fragment amplifié par les 2 amorces de PCR et est associée à deux marqueurs fluorescents :

- un fluorochrome émetteur ou « Reporter » (par exemple FAM : 6-carboxy-fluorescein) fixé à l'extrémité 5' de la sonde d'hybridation,
- un fluorochrome suppresseur ou « Quencher » (par exemple TAMRA : 6-carboxy-tetramethyl-rhodamine) présent à l'extrémité 3' de la sonde d'hybridation et inhibant l'émission de la fluorescence du Reporter par un phénomène de FRET (fluorescence resonance energy transfer) (Mackay *et al.*, 2002).

La fluorescence de la sonde est donc inhibée lorsque la sonde est intacte. Lors de la phase d'élongation de la PCR, cette sonde est dégradée par l'activité 5' exonucléasique de la Taq polymérase. Le Reporter est alors libéré de l'environnement du Quencher permettant ainsi l'émission de fluorescence.

La Figure 14 résume le principe de la TaqMan PCR.

Seules les sondes appariées au brin d'ADN étant hydrolysées, l'accroissement de la fluorescence est proportionnel au nombre de copies générées au cours des cycles.

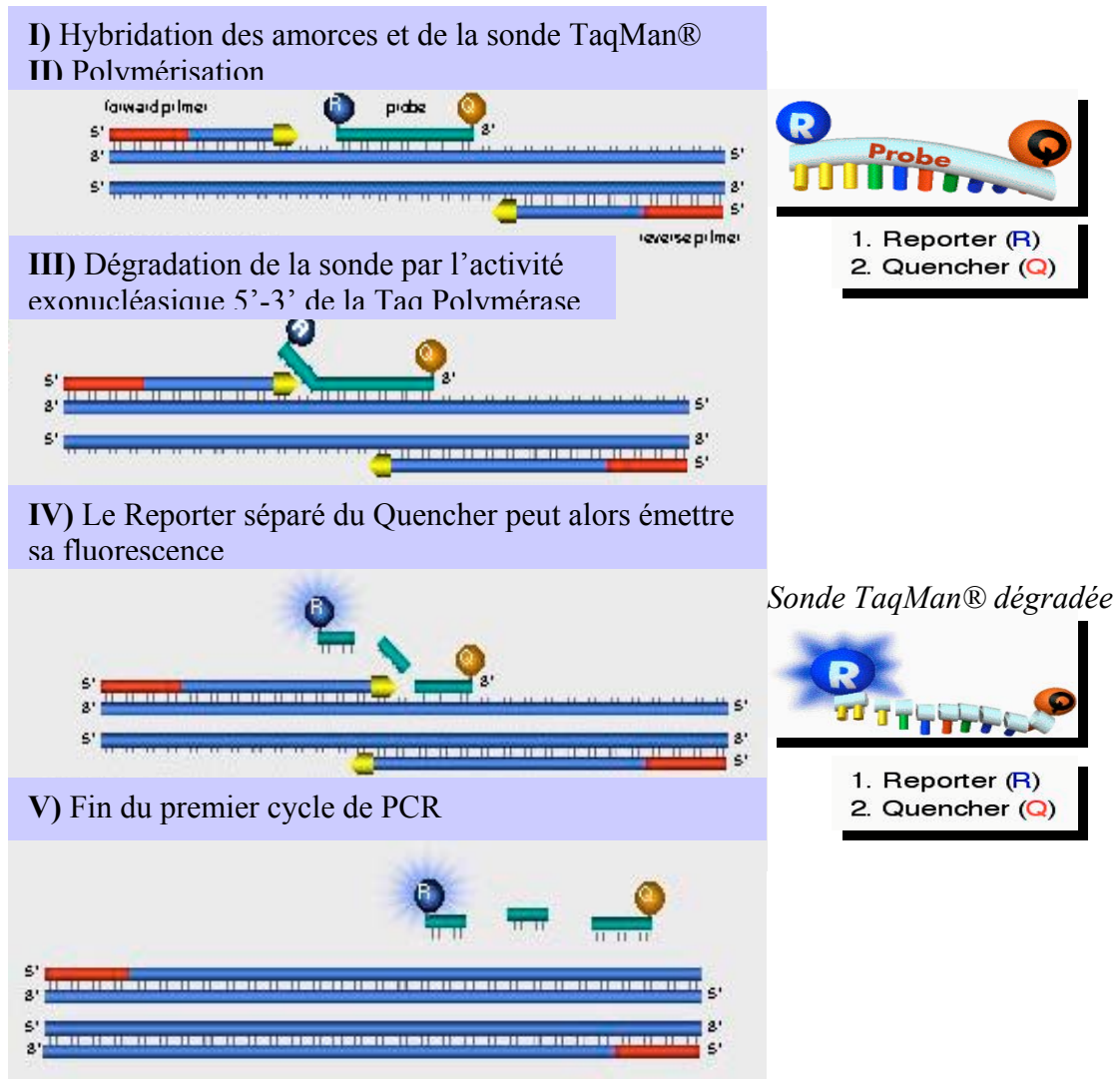


Figure 14 : Principe de la PCR en temps réel (Applied Biosystems) et schéma d'une sonde nucléotidique TaqMan®.

L'enzyme Taq polymérase hydrolyse la sonde uniquement durant l'étape de polymérisation de la PCR, lorsque celle-ci est hybridée à sa séquence complémentaire. Ainsi, les conditions de température doivent être ajustées de façon à permettre à la sonde de rester hybridée lors cette étape.

La majorité des sondes a une température de dissociation (T_m) autour de 70°C ou une température de 10°C plus élevée que celle des amorces de PCR. Par conséquent, la technologie TaqMan utilise une étape combinée d'hybridation et de polymérisation à 60°C assurant la stabilité du complexe sonde-ADNcible durant l'étape de polymérisation. Afin de stabiliser cette hybridation, des optimisations de la concentration en ions Mg^{2+} sont nécessaires.

2.2. Notion de cycle seuil ou threshold cycle (Ct)

En TaqMan PCR, les valeurs ΔRn reflètent la quantité de sonde fluorescente dégradée par la mesure de l'intensité émise du fluorochrome émetteur (ou Reporter). Chaque tube réactionnel d'amplification est analysé toutes les 25 millisecondes durant la PCR puis ré-examiné toutes les 8,5 secondes afin de construire la courbes d'amplification.

Une ligne de base (Threshold) de détection de la fluorescence est définie. Le nombre de cycles de PCR nécessaire pour que la fluorescence émise (ΔRn) par chaque échantillon atteigne cette ligne de base est inversement proportionnel au nombre de copies d'ADN cible initialement présentes dans l'échantillon. Ainsi, le **Ct (threshold Cycle ou Cycle seuil)** correspond au nombre de cycles de PCR requis pour que le signal d'émission de fluorescence générée par le Reporter soit significativement plus élevé que la ligne de base.

La Figure 15 montre une courbe d'amplification type en TaqMan PCR.

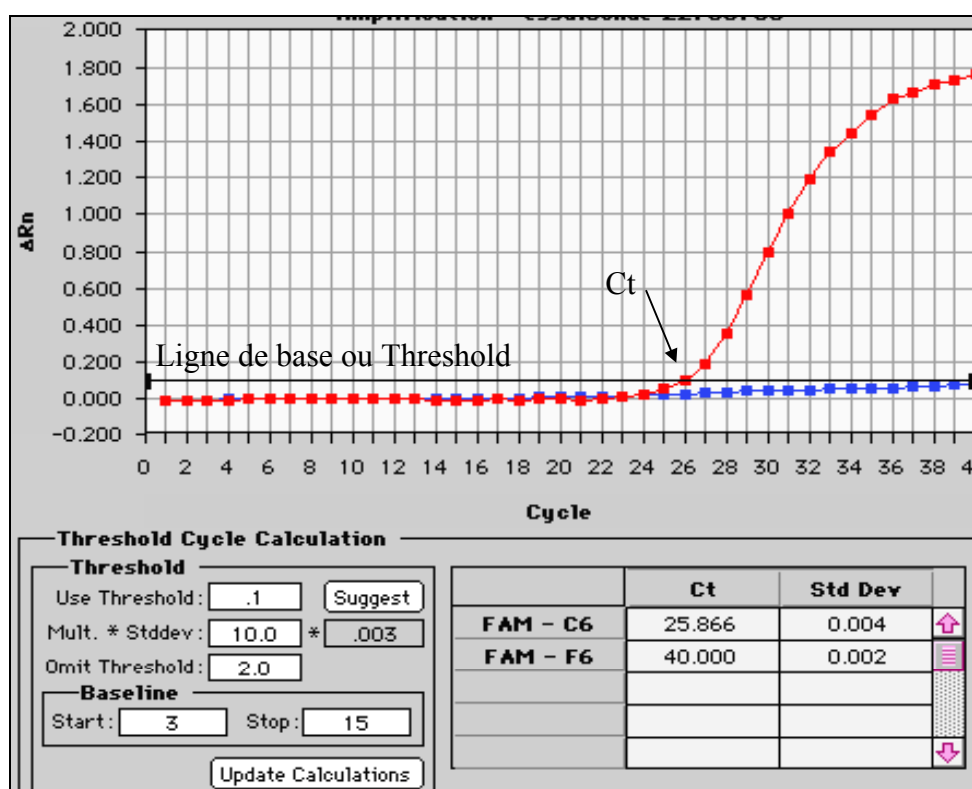


Figure 15 : Courbe d'amplification type (en bleu : témoin négatif d'amplification).

Par conséquent, la valeur du Ct obtenue pour chaque échantillon peut être traduite en un résultat quantitatif en la comparant à des valeurs de Ct obtenues à partir d'une gamme étalon amplifiée en parallèle.

Afin de s'assurer d'aucune contamination des milieux réactionnels, un tube réactionnel de contrôle ne possédant pas d'ADN cible (**NTC, Non Template Control ou témoin négatif**) n'aura pas sa sonde TaqMan™ hybridée (donc dégradée) et n'émettra pas de fluorescence (ΔRn nul).

2.3. Choix de la séquence cible

Un premier test IMS-PCR ciblant spécifiquement l'espèce *C. parvum* a déjà été développé pour la détection de routine du parasite au laboratoire d'analyse du CIRSEE. Ce test amplifie une séquence génomique définie par Laxer et a été appliqué à différents échantillons d'eau (Hallier-Soulier et Guillot, 1999; 2000). Ayant obtenu de très bons résultats en terme de sensibilité et de robustesse, **cette séquence d'ADN « Laxer » a donc été de nouveau choisie pour construire notre test TaqMan PCR.**

Cette séquence d'ADN génomique de fonction non identifiée (Laxer *et al.*, 1991) et référencée dans la base de données Genbank sous la référence AF188110 par Deng *et al.* Elle présente l'avantage de cibler spécifiquement l'espèce *C. parvum*. Cette séquence, amplifiée en PCR par les amorces décrites dans le Tableau IX, a une longueur de 452 pb.

Amorces Laxer (452-pb)	P1: 5'-CCGAGTTTGATCCAAAAAGTTACGAA-3'
	P2: 5'-TAGCTCCTCATATGCCTTATTGAGTA-3'

Tableau IX : Amorces d'amplification de PCR de la séquence « Laxer » spécifique de *C. parvum*.

2.4. Choix des sondes et des amorces

La construction d'un test TaqMan PCR doit répondre à des règles générales notamment celles concernant le choix des sondes et amorces.

Les sondes TaqMan doivent respecter les critères suivants :

- avoir une séquence courte de longueur comprise entre 20 et 40 nucléotides,
- avoir une séquence pauvre en guanidine G (celle-ci induisant une diminution de la fluorescence),
- ne pas avoir de base guanidine en position 5' de la sonde (celle-ci induisant une diminution de la fluorescence du Reporter, même après clivage),
- éviter les séquences GC à l'extrémité 3' de la sonde (sur les 5 dernières bases principalement),
- avoir un T_m (température de dissociation) de 5 à 10°C supérieur à celui des amorces afin de s'assurer que la sonde s'hybridera avant les amorces et qu'elle demeurera stable durant les étapes d'hybridation des amorces et l'étape de polymérisation,
- n'avoir aucune région de séquences répétées,
- n'avoir aucune séquence permettant une hybridation ou un chevauchement avec les amorces.

Les amorces associées à la sonde doivent générer des amplicons courts (longueurs entre 50 et 150 pb).

Nous avons donc sélectionné, en respectant ces règles, plusieurs sondes et amorces sur la séquence d'ADN « Laxer » à l'aide de deux logiciels informatiques spécialisés :

- Primer Express™ (version 1.0, Applied Biosystems),
- Oligo™ version 6 (National Biosciences, Plymouth, USA).

Deux sondes associées à plusieurs couples d'amorces ont été choisies par ces logiciels.

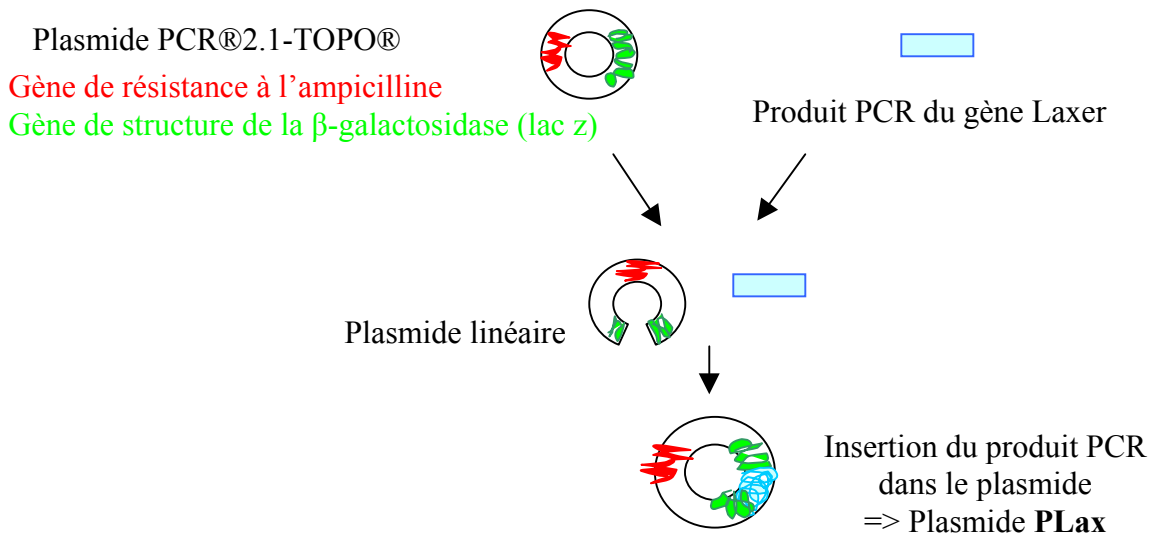
Les sondes sélectionnées ont été marquées en 5' par un fluorochrome émetteur ou Reporter FAM : 6-carboxyfluoresceine et en 3' par un fluorochrome suppresseur ou Quencher TAMRA : 6-carboxy-tetramethyl-rhodamine et purifiées par HPLC (Applied Biosystems, France).

2.5. Production de plasmides recombinants contenant la séquence Laxer

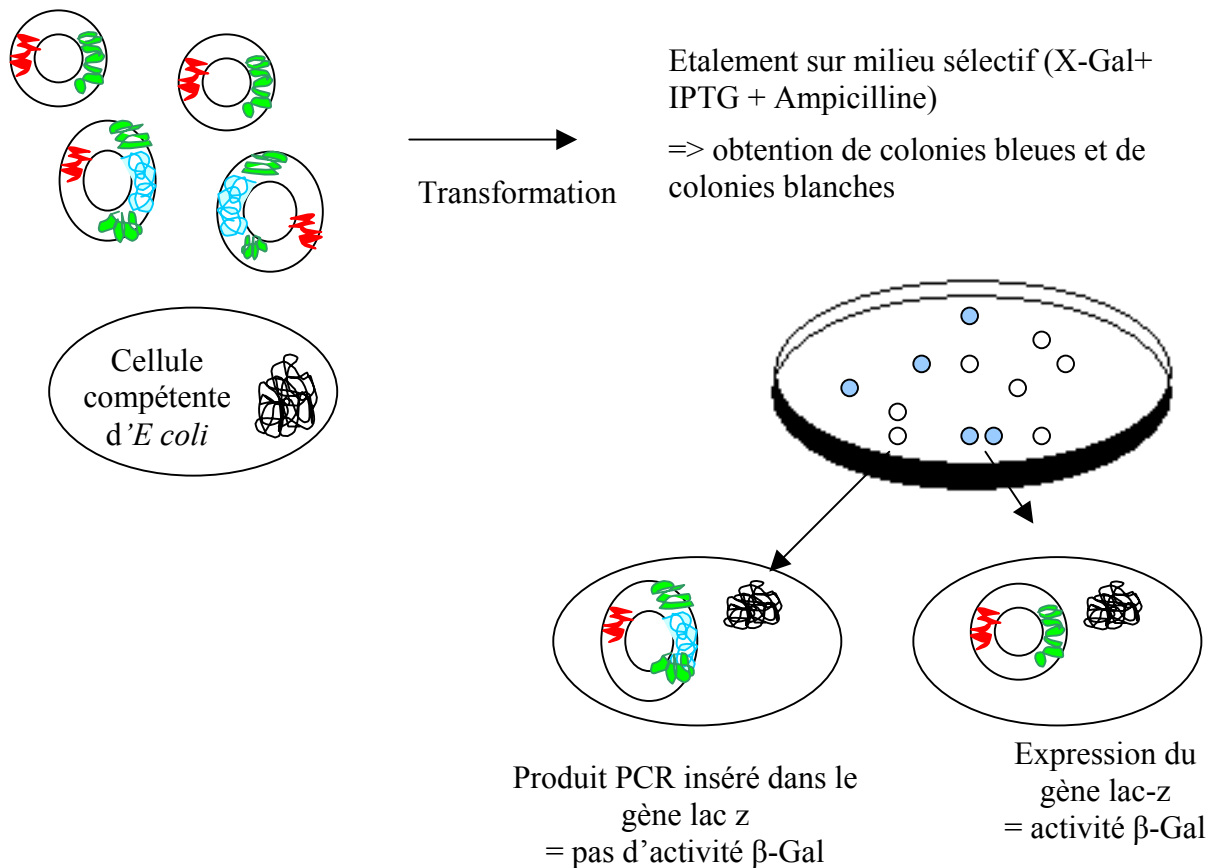
Afin de disposer de matériel génétique en quantité suffisante pour l'optimisation des conditions d'amplification et la répétabilité du test TaqMan PCR, nous avons choisi de synthétiser de l'ADN cible comprenant la séquence Laxer. **Dans ce but, des copies de la séquence Laxer ont été produites par l'intermédiaire de vecteurs plasmidiques.**

Le segment Laxer de 452 pb a été inséré dans un plasmide pCR®2.1-TOPO® (étape de ligation, Figure 16a.). Le produit de ligation obtenu a été appelé PLax. Puis, chaque plasmide a été intégré dans une cellule compétente d'*Escherichia coli* (étape de transformation, Figure 16b). Après culture des cellules sur milieu complété, les colonies (ou clones) contenant un plasmide ayant intégré le fragment Laxer ont été isolées.

a. Insertion du produit amplifié dans le vecteur plasmidique :



b. Transformation et introduction dans une cellule compétente :



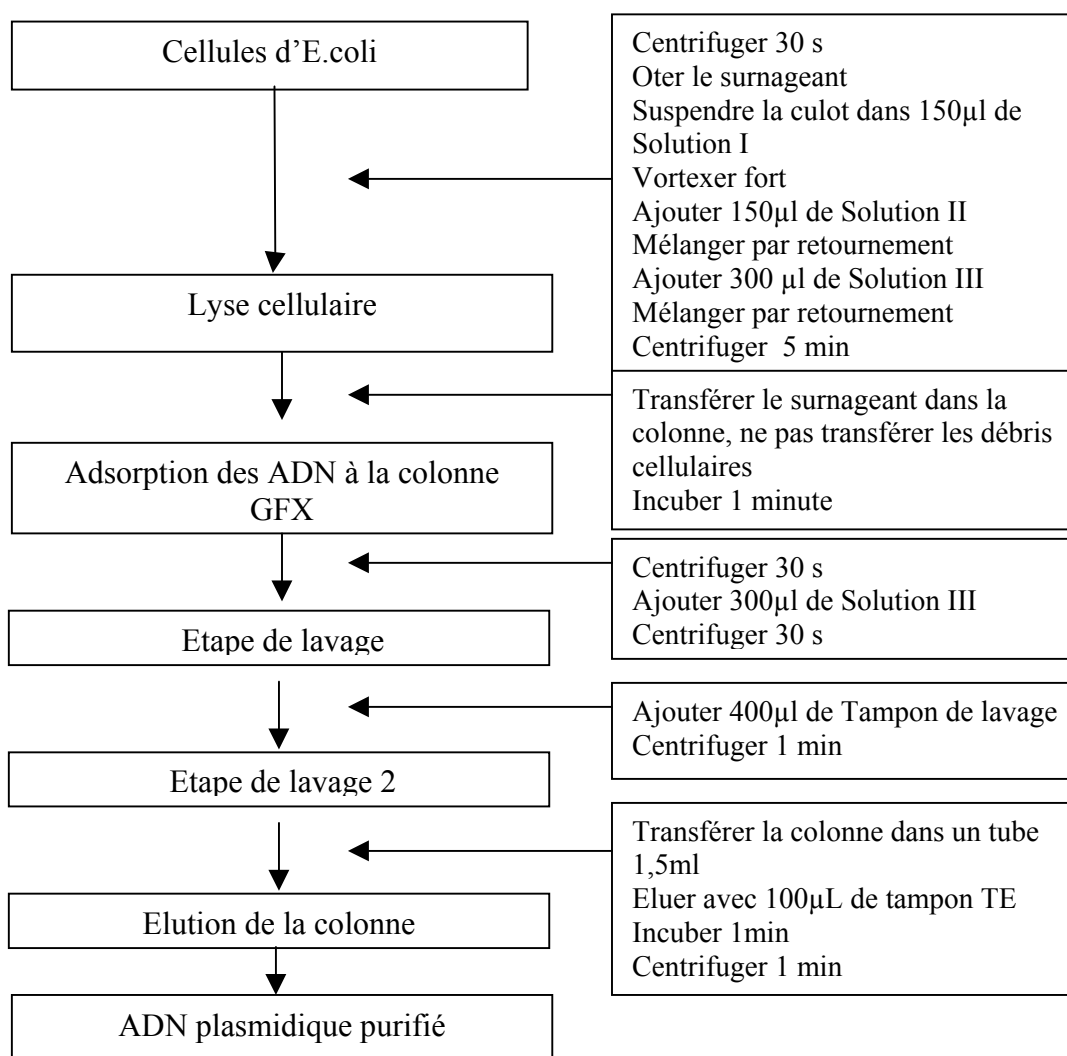
c. Etape de multiplication du plasmide dans *E.coli*.

Figure 16 : Schématisation des étapes pour le clonage du fragment génomique « Laxer ».

La purification des plasmides PLax clonés a été effectuée via un kit d'extraction et de purification plasmidique GFX™ Micro Plasmid Prep kit (Pharmacia Biotech, France). Nous avons choisi ce type d'extraction pour sa facilité et sa rapidité de mise en œuvre au laboratoire.

Le principe consiste à lyser la suspension bactérienne utilisée pour cloner les plasmides, dénaturer les protéines et l'ADN présents puis fixer les plasmides sur colonne (matrice en fibre de verre). Après plusieurs lavages, les plasmides sont élués de la colonne. La concentration en ADN plasmidique obtenue après extraction est estimée par la mesure de la densité optique (DO) à 260 nm (à 260 nm, une unité DO correspond à 50 ng.µl⁻¹ d'ADN double brin).

Le protocole d'extraction est décrit dans la Figure 17.



NB : Toutes les étapes de centrifugation se font à vitesse maximale (10000-12000 x g)

Figure 17 : Protocole d'extraction et de purification plasmidique GFX™

2.6. Application du test à des oocystes de *Cryptosporidium*

2.6.1. Solutions stocks d'oocystes et d'ADN de *Cryptosporidium*

Des solutions d'oocystes de *Cryptosporidium* ont été fournies par un laboratoire américain (Waterborne, USA) :

- des oocystes de *C. parvum* (isolat Iowa),
- des oocystes de *C. muris* (isola RN66).

Ces oocystes sont purifiés et conservés en suspension à + 4°C dans une solution tampon salin phosphaté à 2,5 % (PBS, phosphate-buffered saline). Ces solutions sont fournies à des concentrations de 10^8 oocystes.ml⁻¹ pour *C. parvum* et de $2,5 \times 10^5$ oocystes.ml⁻¹ pour *C. muris*, concentrations déterminées par le fournisseur par comptage par hématocytométrie (cellule de Neubauer).

Des solutions d'ADN purifié des espèces de *Cryptosporidium* suivantes ont été obtenues auprès d'un laboratoire américain du CDC (L. Xiao, Centers for Disease Control and Prevention, USA) : *C. baileyi*, *C. andersoni*, *C. felis*, *C. wrairi*, *C. serpentis* et *C. meleagridis*.

2.6.2. Détermination de la concentration en oocystes

La concentration en oocystes a été déterminée par immunofluorescence en utilisant le kit *Cryptosporidium/Giardia* cell IFA (Cellabs, BMD, France).

Un volume de 10 µl de solution d'oocystes de *Cryptosporidium* a été déposé et séché sur lame à puits puis fixé au méthanol. Chaque puits a été coloré par un mélange (50 µl) de 25 µl de PBS (tampon de phosphate-buffered saline) et de 25 µl d'anticorps monoclonaux marqués à la fluorescéine. Après une incubation de 30 minutes à 37°C, les lames ont été rincées à l'eau puis séchées à l'étuve à 37°C. Les lames ont été montées d'une lamelle, après dépôt d'une solution de glycérol tamponnée.

Les oocystes de *Cryptosporidium* ont été quantifiés par comptage de l'ensemble de la lame à puits sous microscope optique à épifluorescence (grossissement x 200 et x 400).

Afin de contrôler la quantité d’oocystes présents (et de vérifier aussi la qualité du marquage immunofluorescent), des confirmations ont été effectuées par comptage au microscope à l’aide de cellules de Neubauer sous lumière visible.

2.6.3. Extraction d’ADN à partir d’une suspension d’oocystes

L’ADN génomique contenu dans les oocystes est extrait par une série de 5 cycles de chocs thermiques (2 minutes à -80°C et 2 minutes à 95°C). Afin d’optimiser cette étape de lyse thermique, des tests en présence et en absence de Chelex-100 (résine dite protectrice de la dégradation d’ADN par la chaleur, Bio-Rad, USA) ont été effectués. Des volumes finaux de 15 à 75% (poids/volume) en Chelex-100 ont été testés.

Le lysat obtenu est centrifugé 3 minutes à 10 000 xg. L’ADN contenu dans le surnageant est amplifié.

2.7. Conditions d’amplification en PCR classique

Afin de tester les couples d’amorces retenus, des amplifications en PCR classique ont été effectuées.

2.7.1. Préparation du mélange réactionnel

Des échantillons de 5 μl de plasmide recombinant PLax ou 10 μl de lysat d’oocystes sont ajoutés au Mix de PCR. Les composants du Mix de PCR sont décrits dans le Tableau X.

Composants	Concentrations finales
Tampon PCR	1 X
dATP, dCTP , dTTP et dGTP	200 μ M de chaque
AmpliTaq DNA polymérase	2,5 U
MgCl ₂	2 mM
Amorces	1 μ M
BSA (albumine de sérum bovin)	10 μ g.ml ⁻¹

Tableau X : Composition des Mix de PCR (volume final de 50 μ l).

Pour chaque série de réactions, des contrôles négatifs sans ADN cible (remplacé par de l'eau ultra-pure) sont amplifiés parallèlement.

2.7.2. Conditions d'amplification

L'amplification s'effectue dans un thermocycleur , modèle 9600 (Perkin Elmer) avec les cycles de température décrits dans le Tableau XI.

Nombre de cycles	Durée	Température	Fonction
1 cycle	5 min	94°C	activation de l'AmpliTaq
40 cycles	30 s	94°C	dénaturation
	45 s	60 °C	hybridation
	1 min	72 °C	élongation

Tableau XI : Conditions d'amplification en PCR

2.7.3. Analyse des résultats

Les produits d'amplification (10 μ l) ont été visualisés sous lampe UV après électrophorèse dans un gel d'agarose à 2% (Life technologies, MD, USA) contenant 0,5

mg.ml⁻¹ de bromure d'éthidium. Un marqueur de taille de 1-kpb a été inclus (Life technologies, MD, USA)

2.8. Conditions d'amplification en TaqMan PCR

2.8.1. Préparation du mélange réactionnel

Des échantillons de 5 µl de plasmide recombinant PLax ou 10 µl de solution d'oocystes lysés sont ajoutés au Mix de PCR (Applied Biosystems) décrit dans le Tableau XII.

Composants	Concentrations finales
Tampon	1 X
DATP, dCTP et dGTP	200 µM de chaque
DUTP	400 µM
Uracil- <i>N</i> -glycosidase (UNG)*	0,5 U
AmpliTaq Gold DNA polymérase	1 U
MgCl ₂	à optimiser
Sonde TaqMan	à optimiser
Amorces	à optimiser

* L'UNG permet d'éviter que des produits d'amplification issus de réactions PCR précédentes servent de matrice à de nouvelles réactions

Tableau XII : Composition des Mix de TaqMan PCR (Volume final de 50 µl).

Pour chaque série de réactions, des contrôles négatifs sans ADN cible (remplacé par de l'eau PCR ultra-pure) sont amplifiés parallèlement.

2.8.2. Conditions d'amplification

Des tubes spécifiques MicroAmp optical caps, pour l'amplification et la détection laser de la fluorescence sont utilisés (Applied Biosystems).

L'amplification et la détection s'effectuent dans un appareil ABI Prism® 7700 Sequence Detection System (Applied Biosystems, France) associant un thermocycleur et un laser permettant une détection de la fluorescence émise.

Les conditions d'amplification sont résumées dans le Tableau XIII.

Nombre de cycles	Durée	Température	Fonction
1 cycle	2 min	50°C	Digestion par l'UNG d'éventuels contaminants
1 cycle	10 min	95°C	Activation de l'AmpliTaq Gold
40 cycles	15 s	95°C	Cycles d'amplifications (dénaturation-élongation)
	1 min	60°C	

Tableau XIII : Conditions d'amplification en TaqMan PCR.

2.8.3. Analyse des données

Les données de la PCR sont analysées par le logiciel Sequence Detector Software relié directement à l'ABI Prism® 7700.

3. Résultats

3.1. Choix des amorces et de la sonde TaqMan

La séquence « Laxer » étant riche en Guanidine, aucune sonde TaqMan répondant aux exigences d'un test TaqMan PCR n'a pu être sélectionnée par le Logiciel Primer Express™.

Nous avons donc décidé de travailler sur le brin complémentaire de cette séquence « Laxer ».

Deux cents couples d'amorces et de sondes ont été sélectionnés par le logiciel Primer Express™ pour la construction du test TaqMan PCR.

Le logiciel Oligo™ a permis d'affiner cette sélection en analysant la faible capacité à dimériser.

Le Tableau XIV présente les séquences des 2 sondes choisies : Slax et S320

Sondes TaqMan	CCAATCACAGAATCATCAGAATCGACTGGTATC	SLax
	TCCTTGGTTAGTGCTTTTACTGTTTGCTTCATT	S320

Tableau XIV : Séquences des sondes TaqMan PCR sélectionnées

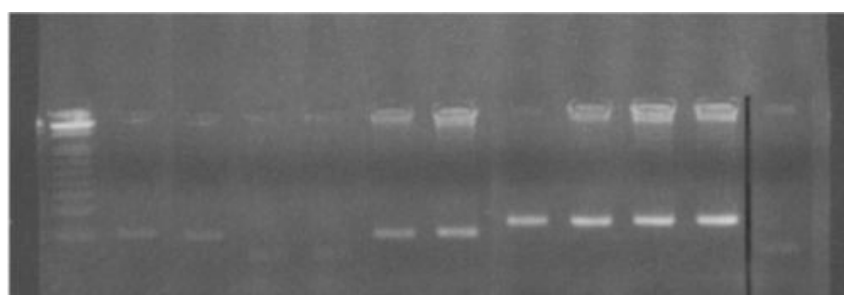
Le Tableau XV présente les couples d'amorces retenus permettant de tester 5 types d'amplifications en TaqMan PCR en association avec la sonde Slax ou la sonde S320.

Couples d'amorces sélectionnés	Séquences	Sonde TaqMan associée
Couple d'amorces n°1	F67 : 5'-GGGTGGTACAATAATGACAGCTTCTA-3'	SLax
	R162 : 5'-TGTTTGCCAATGCATATGAAGTTATA-3'	
Couple d'amorces n°2	F34 : 5'-CGCTTCTCTAGCCTTTCATGA-3'	SLax
	R171 : 5'-CTTCACGTGTGTTTGCCAAT-3'	
Couple d'amorces n°3	F34 : 5'-CGCTTCTCTAGCCTTTCATGA-3'	SLax
	R162 : 5'-TGTTTGCCAATGCATATGAAGTTATA-3'	
Couple d'amorces n°4	F67 : 5'-GGGTGGTACAATAATGACAGCTTCTA-3'	SLax
	R171 : 5'-CTTCACGTGTGTTTGCCAAT-3'	
Couple d'amorces n°5	P1 : 5'-CCGAGTTTGATCCAAAAAGTTACGAA-3'	S320
	F293 : 5'-TGAATGATTATTCTGCCAATGT	

Tableau XV : Séquences des couples d'amorces sélectionnés

Les couples d'amorces et de sonde retenus ont été évalués par des amplifications en PCR « classique » de l'ADN plasmidique recombinant PLax.

La Photo 9 représente les résultats obtenus pour les différents couples d'amorce.



Marqueur de taille $n=1$ F67/R171 $n=2$ F67/R162 $n=2$ F34/R162 $n=2$ F34/R171 $n=2$ P1/F293 $N=2$ Témoin négatif $n=1$

Photo 9 : Résultats des amplifications obtenues avec les différents couples d'amorces en PCR classique.

Des amplifications en TaqMan PCR du plasmide PLax ont ensuite été effectuées en triple, en conditions de Mix réactionnel non optimisées, avec ajout de 5 mM de $MgCl_2$ et de 200 nM de chaque sonde et amorce. Ces concentrations correspondent aux conditions d'amplification généralement retrouvées dans la littérature.

Le Tableau XVI résume les résultats obtenus en PCR classique et TaqMan PCR

Amorces/sondes	PCR classique (bande d'amplification)	TaqMan PCR (courbe d'amplification)
F67/R162, Slax	-	-
F34/R171, Slax	+ (forte intensité)	+
F34/R162, Slax	+	+
F67/R171, Slax	+ (faible intensité)	-
P1/F293, S320	+ (forte intensité)	+

NB : Les sondes Slax ou S320 ne sont ajoutées qu'en TaqMan PCR.

Tableau XVI : Obtention (+) ou non (-) d'une amplification (n=3).

Nous avons observé une bonne corrélation entre les résultats d'amplifications obtenus par PCR « classique » et par TaqMan PCR, sauf pour le couple d'amorces F67/R171 associé à la sonde Slax qui n'a pas donné de courbe d'amplification en TaqMan PCR.

Deux couples d'amorces ont donné un bon profil d'amplification en PCR classique et en TaqMan PCR : le couple F34/R171 associé à la sonde Slax et le couple P1/F293 associé à la sonde S320.

Nom	Séquence (5'-3')	Localisation sur le fragment Laxer	Température d'hybridation (T _m)	Pourcentage en GC (%GC)	Longueur de la séquence (pb)
F34	CGCTTCCTCTAGCCTTTCATGA	34	56	48	21
R171	CTTCACGIGIGITTTGCCAAT	171	56	45	20
Slax	CCAATCACAGAATCATCAGA- ATCGACTGGTATC	102	68	48	33

Tableau XVII : Récapitulatif sur le couple d'amorces et de la sonde TaqMan sélectionnés.

Le couple d'amorces F34-R171 associé à la sonde Slax a été sélectionné et s'est révélé approprié pour la détection spécifique et quantitative par TaqMan PCR.

Ce couple amplifie un fragment d'ADN génomique de 138 paires de bases à l'intérieur de la séquence de 452 paires de bases identifiée par Laxer (Tableau XVII).

3.2 Optimisation de l'amplification

Une optimisation des conditions de PCR a été nécessaire pour obtenir un test à la fois sensible et reproductible. Pour ceci, des optimisations en concentrations en MgCl₂, en amorces et en sonde ont été effectuées sur les plasmides recombinants PLax.

Des concentrations en MgCl₂ comprises entre 0 et 7 mM ont été testées en trois répétitions sur 6.10⁸ copies de plasmides Plax.

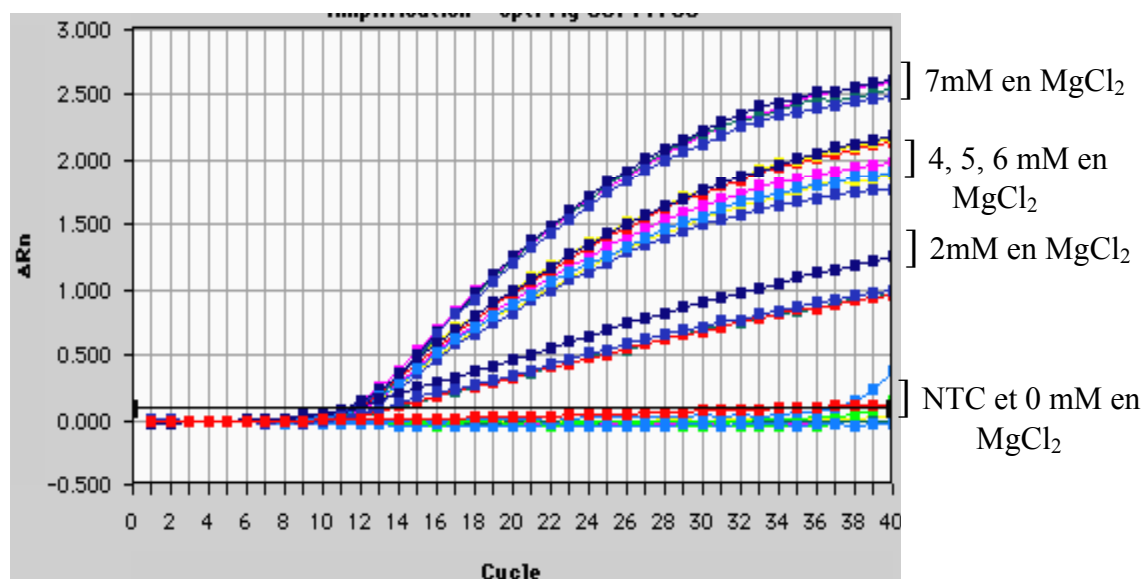


Figure 18 : Optimisation du test TaqMan PCR à partir d'ADN plasmidique (Plax) en fonction de la concentration en $MgCl_2$, ($n=3$).

Les résultats obtenus (Figure 18) ont montré différents niveaux de fluorescence générés (ΔRn) selon la concentration en $MgCl_2$ présente dans le Mix réactionnel :

- **Les concentrations comprises entre 0 et 2 mM de $MgCl_2$ ont donné des amplifications nulles ou insuffisantes** où la fluorescence générée (ΔRn) est trop faible (Un ΔRn de 1 correspondant à l'amplitude minimale est préconisé en TaqMan PCR),
- **Les concentrations comprises entre 4 et 7 mM en $MgCl_2$ ont donné des profils d'amplification corrects.**

Ces profils d'amplification sont fonction de la fluorescence générée par la dégradation de la sonde TaqMan (ΔRn) au cours des cycles de PCR. **Les profils obtenant un C_t (cycle seuil de détection de la fluorescence) le plus petit et une fluorescence générée par la sonde (ΔRn) la plus élevée sont à sélectionner.**

Ainsi, on observe qu'un minimum de 4 mM en $MgCl_2$ a été nécessaire pour obtenir une bonne amplification en TaqMan PCR. De plus, une concentration trop faible en $MgCl_2$ risquerait de réduire l'efficacité d'amplification et une concentration trop élevée de $MgCl_2$ pourrait amplifier des séquences d'ADN non spécifiques. Cinq

millimolaires en MgCl_2 ont été choisis dans un premier temps pour l'amplification en TaqMan PCR des ADN plasmidiques PLax.

*Une concentration en MgCl_2 de 4, 5 ou 6 mM peut être utilisée
pour l'amplification du test TaqMan PCR*

Des concentrations en amorces de 50, 200, 300 et 600 nM ont été testées. Une concentration identique pour chaque amorce n'optimisant pas forcément une amplification, des combinaisons pour chaque concentration d'amorces testée ont été effectuées. Les différentes combinaisons effectuées en trois répétitions sont représentées dans le Tableau XVIII.

R	F	50 nM	200 nM	300 nM	600 nM
50 nM		A	C		
200 nM		B	D	F	
300 nM			E	G	I
600 nM				H	J

Tableau XVIII : Nomenclature des combinaisons en concentrations d'amorces testées. R : amorce R171, F : amorce F34.

Les courbes d'amplifications obtenues pour l'amplification de 6.10^7 unités PLax plasmidiques sont montrées sur la Figure 19 où chaque lettre représente la combinaison en amorces testée. Une courbe moyenne ($n=3$) est représentée.

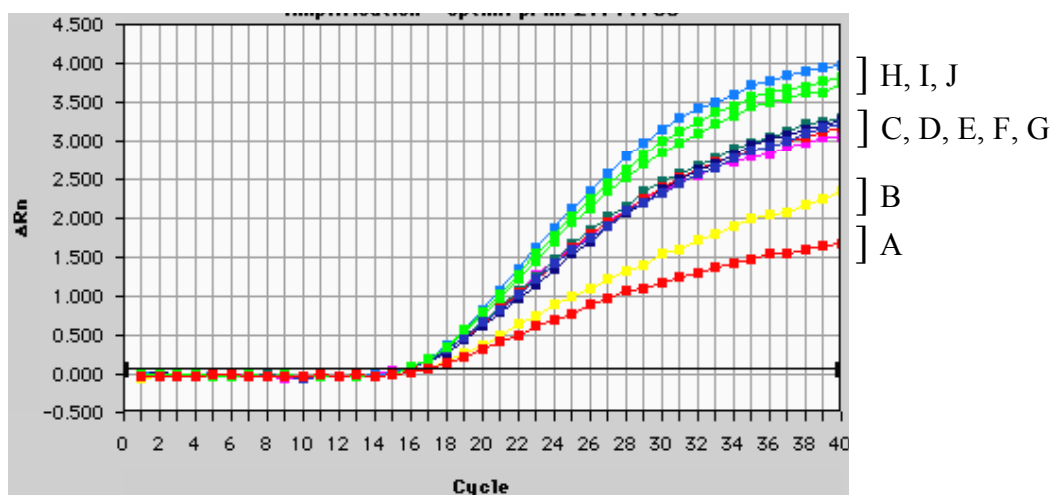


Figure 19 : Optimisation du test TaqMan PCR à partir d'ADN plasmidique (Plax) en fonction de la concentration en amorces.

Ces amplifications ont mis en évidence que des variations de concentrations en amorces n'ont pas affecté la détection initiale de la fluorescence du Reporter : la valeur du Ct obtenue est identique pour tous les essais (Ct=16). **Ce type de test permet d'observer que des concentrations limitantes en composants du Mix réactionnel n'influent pas sur les valeurs des Ct.**

Les phases plateau d'amplification PCR sont influencées : **plus les concentrations en amorces initiales sont limitantes, plus le plateau d'amplification est observé tôt au cours des cycles de PCR :**

- les combinaisons testées C, D, E, F et G en amorces antisens (R) / sens (F) respectivement, ont permis d'obtenir des profils d'amplifications identiques et adéquats pour un test TaqMan PCR,
- les combinaisons A et B n'ont pas donné de bons profils d'amplification (ΔRn faibles),
- les combinaisons H, I et J ont donné des profils d'amplification plus élevés en terme de ΔRn . Ces plateaux d'amplifications élevés ne sont pas nécessaires à la quantification puisqu'ils n'influent pas sur les Ct. De plus, l'importante quantité en amorces augmentant inutilement les coûts des essais, ces combinaisons n'ont pas été retenues.

Ainsi, une valeur minimum de 200 nM de chaque amorce est nécessaire afin d'assurer une quantité en amorces non limitante pour chaque amplification.

Des concentrations en sonde « Slax » variant de 25 à 225 nM ont été testées en trois répétitions.

La Figure 20 représente les amplifications obtenues pour chacune des concentrations en sonde.

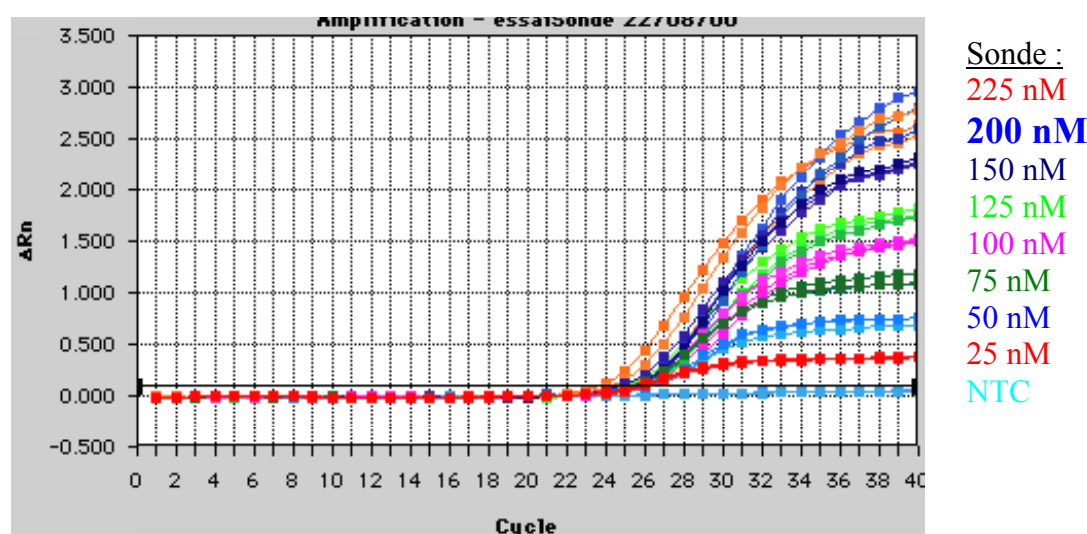


Figure 20 : Optimisation du test TaqMan PCR à partir d'ADN plasmidique (Plax) en fonction de la concentration en sonde.

Par ces amplifications, nous avons pu observer **qu'un minimum de 100 nM en sonde est nécessaire pour obtenir une amplitude de fluorescence détectée (ΔR_n) supérieure à 1** (amplitude minimale préconisée).

Une concentration finale de 200 nM en sonde a été sélectionnée. Cette concentration nous permet de travailler avec un excédent de sonde même lorsque la quantité en ADN cible est importante.

Une concentration de 200 nM en sonde a été sélectionnée afin de travailler en condition non limitante lors des amplifications.

3.3. Spécificité des amorces et de la sonde utilisées

Afin de déterminer la spécificité de ce test TaqMan vis-à-vis de l'espèce pathogène de l'homme, *C. parvum*, des réactions croisées avec d'autres espèces appartenant au genre *Cryptosporidium* ont été testées.

Les Figure 21 et Figure 22 présentent l'ensemble des résultats obtenus.

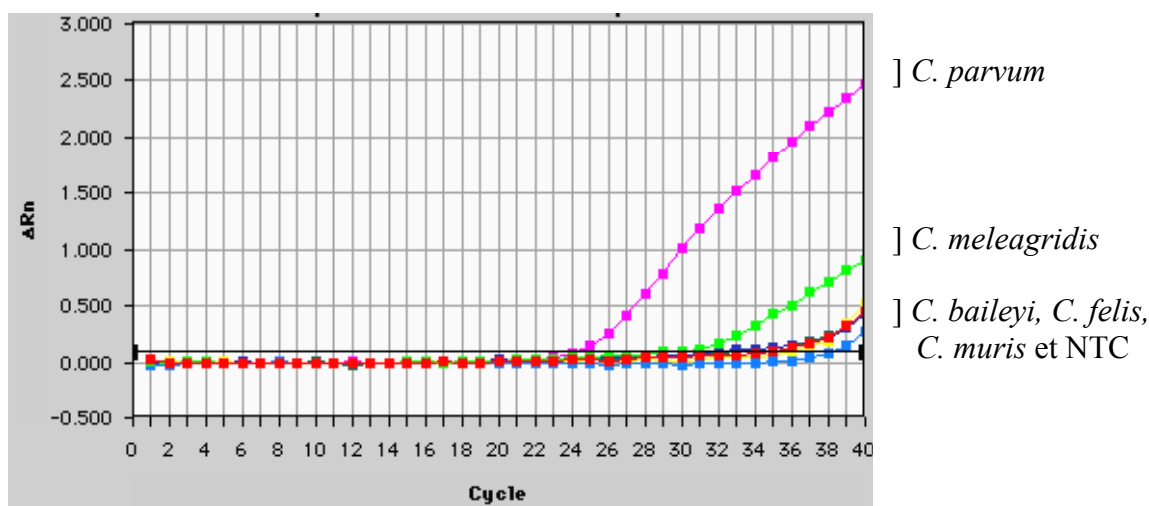


Figure 21 : Spécificité du test TaqMan PCR vis-à-vis de différentes espèces de *Cryptosporidium* (*C. meleagridis*, *C. baileyi*, *C. felis*, *C. muris*)

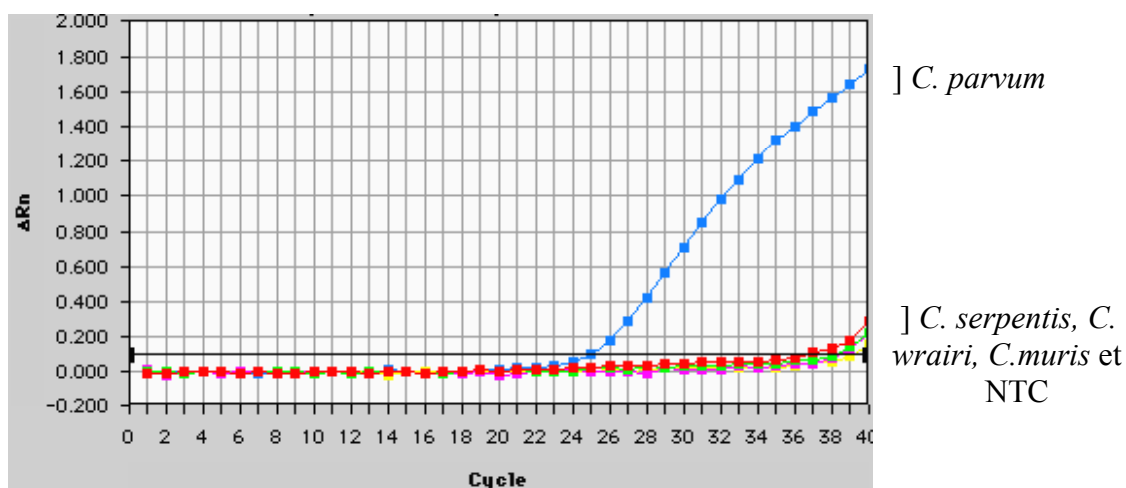


Figure 22 : Spécificité du test TaqMan PCR vis-à-vis de différentes espèces de *Cryptosporidium* (*C. serpentis*, *C. wrairi*, *C. muris*).

Les Figure 21 et Figure 22 montrent que seule l'espèce *C. meleagridis* réagit avec les amorces et la sonde sélectionnées. Aucune amplification n'est observée avec les espèces *C. baileyi*, *C. andersoni*, *C. felis*, *C. wrairi*, *C. serpentis* et *C. muris* en condition de TaqMan PCR optimisée.

Le test TaqMan PCR est spécifique des espèces parvum et meleagridis de Cryptosporidium.

3.4. Sensibilité et linéarité du test TaqMan PCR

La linéarité et la sensibilité du test ont été évaluées par des amplifications à partir d'une gamme de plasmides recombinants PLax dans les conditions optimisées de PCR. La concentration de la solution mère de plasmides a été estimée par mesure de la DO à 260 nm. La quantité de plasmide a été déterminée théoriquement en tenant compte de la longueur totale du plasmide recombinant PLax (4,36 Kb dont 452 pb pour l'insert « Laxer ») et par l'utilisation des équivalences théoriques de conversion molaire des acides nucléiques ci-dessous :

- à 260 nm, 1 Unité DO = 50 ng.µl⁻¹ d'ADN double brin,
- 1 pmol de 1000 pb d'ADN a une masse de 0,66 µg,
- 1 mole correspond à 6,022 x 10²³ éléments.

Ainsi, le titre de solution mère de plasmide PLax a été évaluée à 60 ng.µl⁻¹ (soit 12,6 x 10⁹ molécules .µl⁻¹). Des dilutions en série de cette solution mère ont été préparées.

Des solutions contenant de 6.10⁹ à 6 copies de plasmides PLax ont été amplifiées en TaqMan PCR. Trois répliques de chaque dilution ont été amplifiées.

La Figure 23 présente les courbes d'amplification ainsi obtenues. La ligne de base de détection de la fluorescence (threshold) a été positionnée à 0,1. Le contrôle négatif (NTC), sans ADN cible initialement présent, amplifié en parallèle, est négatif.

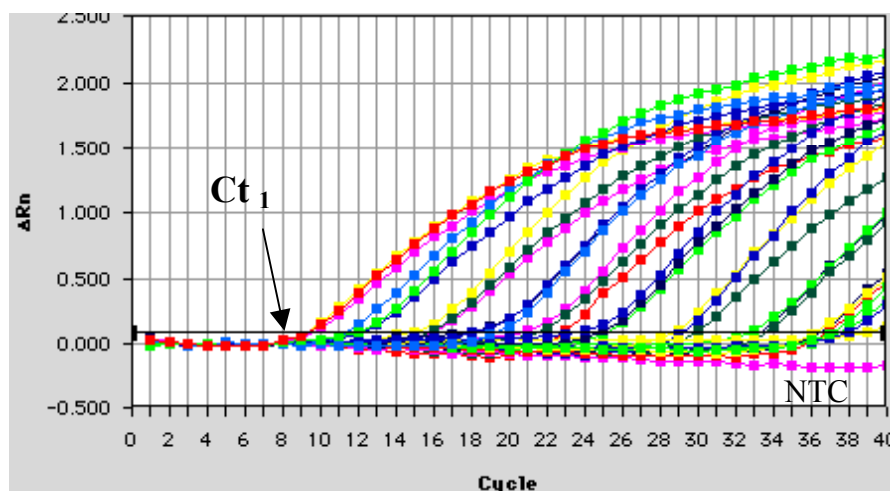


Figure 23 : Courbes d'amplification obtenues pour des solutions contenant de 6.10^9 à 6 copies de plasmide PLax.

La Figure 24 montre la gamme étalon générée à partir des courbes d'amplification obtenues. La valeur du Ct déduite pour chaque échantillon est reliée à la quantité d'ADN plasmidique amplifiée. Chaque dilution en plasmide ayant été amplifiée en trois fois, à chaque quantité d'ADN sont associés trois points.

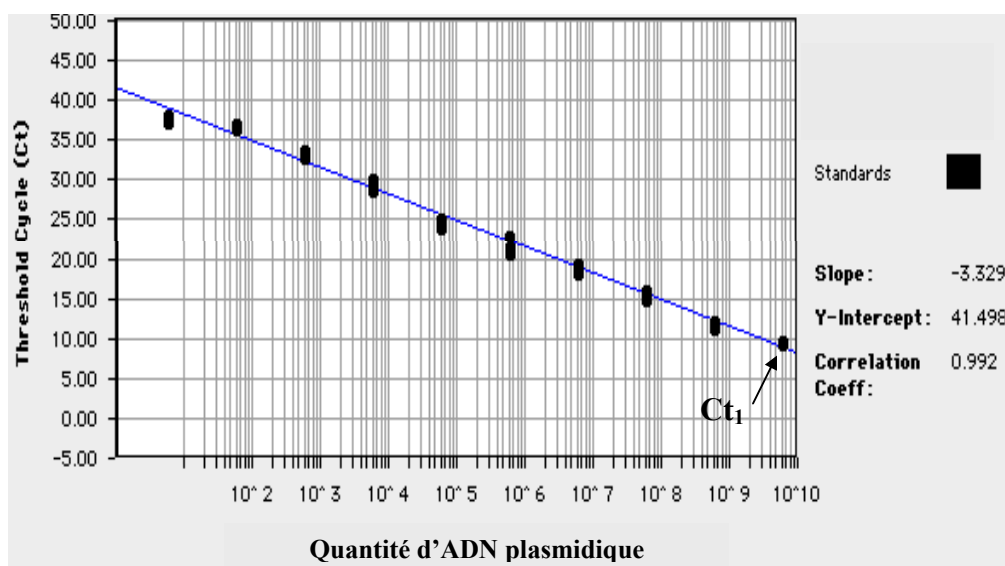


Figure 24 : Gamme étalon résultante des Ct obtenus en Figure 23.

Cette gamme étalon a une amplitude allant de 6.10^9 à 6 copies d'ADN pour des valeurs de Ct obtenus variant respectivement de 10 à 37. La limite de détection théorique de 6 copies d'ADN correspond ainsi à un Ct de 37.

La quantification réalisée est linéaire sur l'amplification des 9 log de dilutions effectuées. La pente de la droite de régression est de 1,446.

Le coefficient de corrélation obtenu de 0,992 a démontré une bonne reproductibilité de l'étalonnage. L'efficacité d'amplification a pu être déterminée par l'utilisation de la formule $E = 10^{-1/s} - 1$ où s est la pente de la droite. Dans le cas présent, l'efficacité d'amplification a une valeur égale à 0,997 soit très proche de l'efficacité maximale théorique d'amplification (égale à 1).

Ce test, spécifique et optimisé, permet d'amplifier une gamme dynamique de 9 log de copies d'ADN de façon linéaire et reproductible avec une sensibilité de 6 copies d'ADN plasmidique.

Des essais complémentaires d'amplification de solutions contenant de 1 à 5 copies d'ADN plasmidiques ont été effectués. Les C_t obtenus en fin de cycle ($C_t = 38$ à 40) ont permis de détecter la présence d'1 seule copie d'ADN cible. Cependant, à ces niveaux de concentration, la répétabilité du test est affectée de manière significative.

3.5. Adaptation du test TaqMan PCR à des suspensions d'oocystes purifiés

Les performances du test TaqMan PCR optimisé sur plasmides recombinants ont ensuite été évaluées sur des suspensions d'oocystes purifiés lysés. L'ADN génomique contenu dans les oocystes a été extrait après lyse par une série de cinq chocs thermiques.

Dans les conditions optimales d'amplification préalablement déterminées sur ADN plasmidique, les courbes d'amplification obtenues à partir des lysats d'oocystes de *C. parvum* ont été détectées avec une fluorescence relative trop faible (seuils des ΔR_n inférieurs à 1).

Après des essais faisant varier les concentrations des composants des Mix de PCR ($MgCl_2$, sonde, amorces), il a été observé que ce défaut d'amplification ne semblait pas dû uniquement aux composants du mix.

Des tests d'acidification du Mix réactionnel ont été effectués en trois répliques.

La Figure 25 présente les résultats d'amplifications réalisées sur des lysats d'environ 6.10^5 oocystes additionnés ou non de 2 μ l d'HCl à 0,1N.

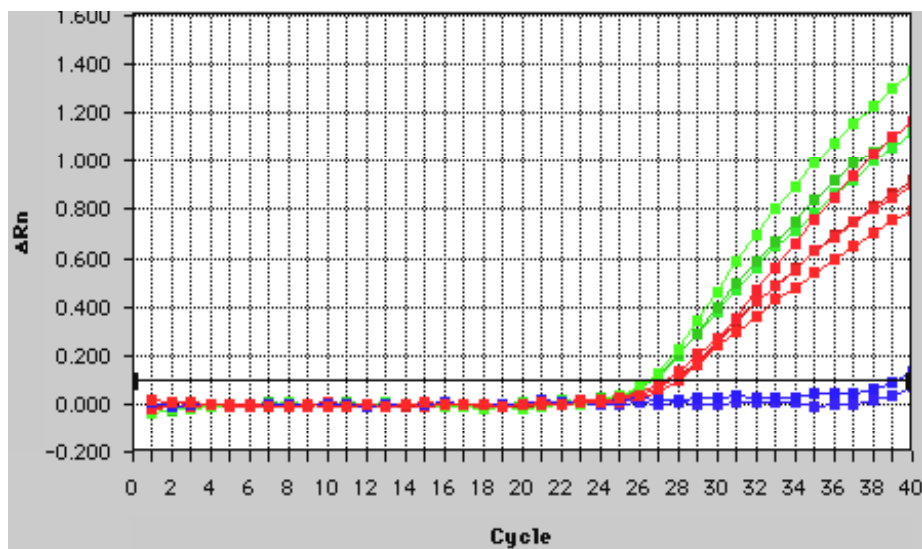


Figure 25 : Optimisation du test TaqMan PCR sur des lysats d'oocystes. Amplifications en présence (courbes vertes) ou en absence (courbes rouges) d'HCl 0,1N; n=3.

*Ce test de TaqMan PCR nécessite une acidification par 2 μ l d'HCl à 0,1N du Mix réactionnel pour amplifier l'ADN cible d'un lysat d'oocystes de *Cryptosporidium*.*

Etant donné la nature des profils d'amplifications observés (ΔRn trop faibles et amplification sans plateau prononcé), nous avons décidé de réévaluer les concentrations en composants du Mix qui avaient été établies à partir de manipulations effectuées sur de l'ADN plasmidique.

Des concentrations en amorces de 50, 200 et 300 nM combinées entre elles ont été testées sur des suspensions contenant 10^5 oocystes. La nomenclature de ces combinaisons, effectuées en triple, est précisée dans le Tableau XIX.

R	F	50 nM	200 nM	300 nM
		50 nM	200 nM	300 nM
50 nM		A	C	
200 nM		B	D	F
300 nM			E	G

Tableau XIX : Nomenclature des combinaisons en concentrations d'amorces testées. R : amorce anti-sens (Reverse), F : amorce sens (Forward).

Les courbes d'amplification ainsi obtenues sont présentées dans la Figure 26 où chaque lettre représente la combinaison testée. Deux répliques par essai ont été effectuées.

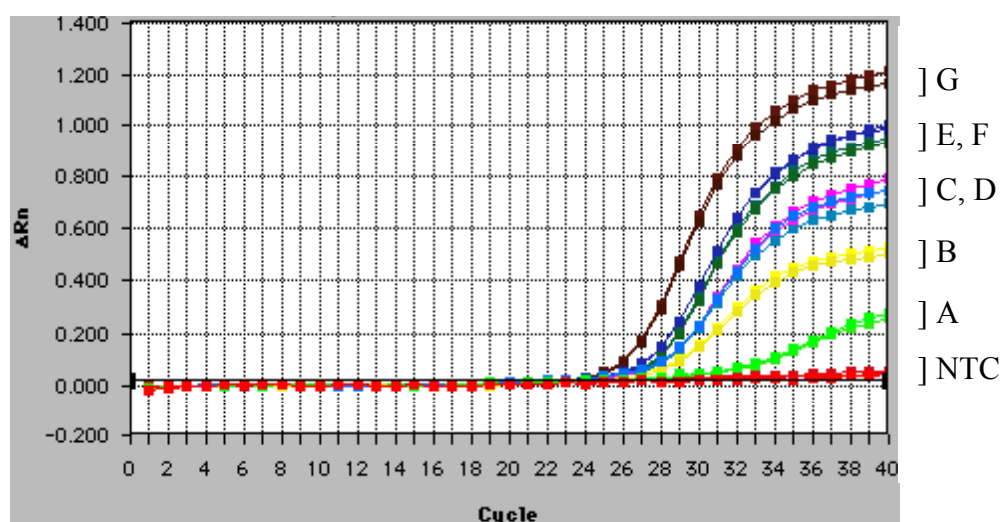


Figure 26 : Optimisation du test TaqMan PCR sur des lysats d'oocystes de *C. parvum* en fonction de la concentration en amorces.

La Figure 26 montre que seule la combinaison G :300/300 a donné des profils d'amplification satisfaisants (ΔRn supérieurs à 1). Une concentration de 300 nM pour chaque amorce a donc été retenue.

Ensuite, des concentrations en $MgCl_2$ comprises entre 0 et 7 mM ont été testées sur des suspensions contenant 10^5 oocystes. Quatre répliques par concentration ont été effectuées (Figure 27).

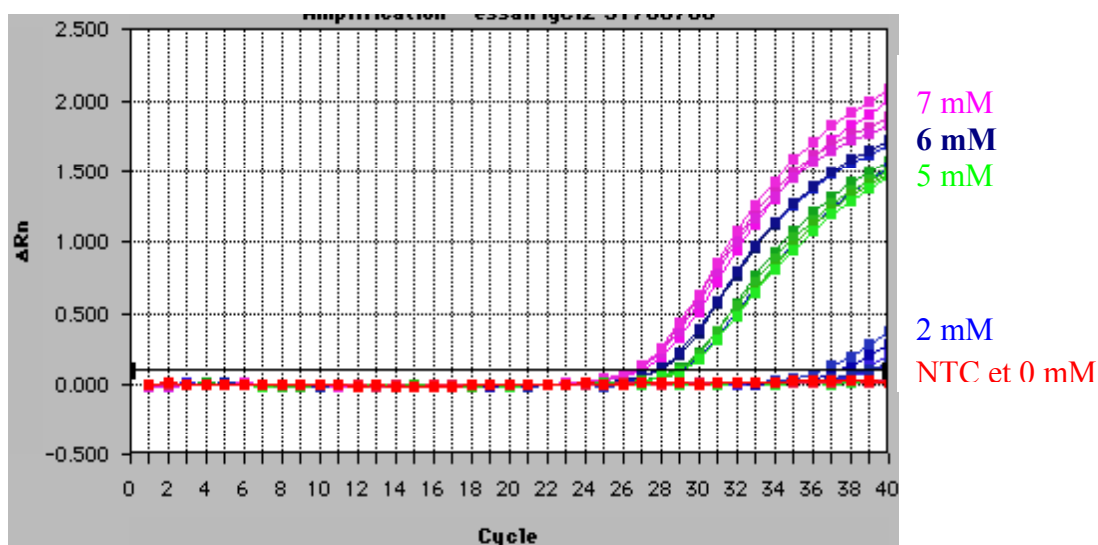


Figure 27 : Optimisation du test TaqMan PCR sur des lysats d’oocystes de *C. parvum* en fonction de la concentration en $MgCl_2$.

La Figure 27 montre des profils d’amplification satisfaisants pour les concentrations 5, 6 et 7 mM. Nous avons décidé de retenir la concentration intermédiaire de 6 mM afin de ne pas être limitant en quantité de $MgCl_2$.

*Une concentration de 300 nM en amorces et de 6 mM en $MgCl_2$ permet une amplification optimale en TaqMan PCR de lysats d’oocystes de *Cryptosporidium* .*

Afin d’obtenir une meilleure reproductibilité dans les amplifications en TaqMan PCR, nous avons testé un Master Mix (Applied Biosystems) prêt à l’emploi contenant les composants décrit dans le Tableau XX. Le couple d’amorces et la sonde sont ajoutés lors de chaque manipulation, selon les concentrations optimales précédemment établies.

L’utilisation de ce Master Mix prêt à l’emploi supplémenté a présenté des résultats équivalents à celle du Mix réactionnel mis au point précédemment. La préparation des tubes d’amplification s’est révélée plus simple et plus rapide.

Composants	
Master Mix	1X Tampon ROX
	200 μ M de chaque dATP, dCTP et dGTP
	400 μ M de dUTP
	0,5 U d'Uracil- <i>N</i> -glycosidase (UNG)
	1 U AmpliTaq Gold DNA polymérase
	5 mM MgCl ₂
+	MgCl ₂ additionnel (afin d'avoir une concentration finale de 6mM)
+	200 nM de Sonde TaqMan
+	300 nM de chaque amorce
+	0,2 μ l d'HCl à 0,1N

Tableau XX : Récapitulatif des concentrations finales en composants optimisées pour l'amplification de solutions d'oocystes de *C. parvum* lysés (volume final 50 μ l).

3.6. Optimisation de la lyse des oocystes

Afin d'optimiser les conditions de lyse des oocystes, la présence ou l'absence de 25% (poids/volume) de Chelex-100 durant les chocs thermiques a été testée.

Les courbes d'amplification obtenues (cinq répétitions par essai) sur les lysats ainsi obtenus sont représentées sur la Figure 28.

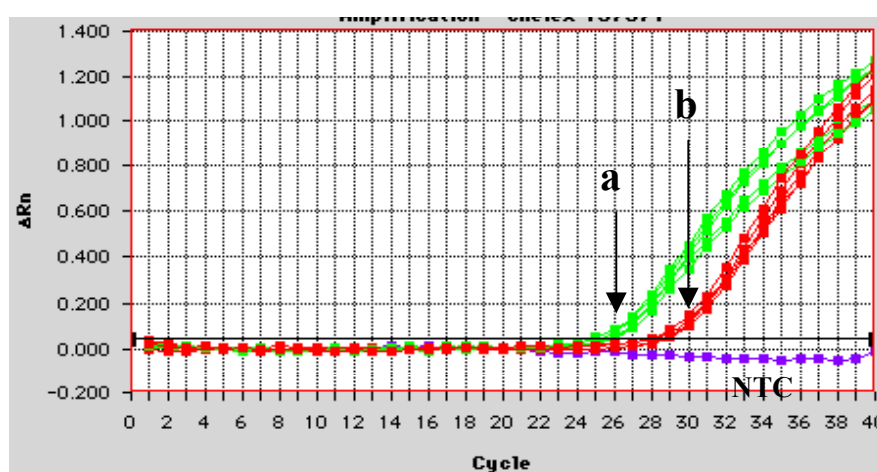


Figure 28 : Effet du Chelex-100 additionné avant la lyse de 10^5 oocystes de *C. parvum* par chocs thermiques. a : amplifications avec l'addition de Chelex-100 avant la lyse. b : amplifications sans Chelex-100 ; NTC : contrôle négatif ; n=5.

On peut observer l'effet positif de l'ajout de cette résine avant les chocs thermiques. Les Ct observés pour une même concentration initiale en oocystes de 10^5 ont été abaissés de 28 à 25 suite à cette addition. Ainsi, **l'ajout du Chelex-100 durant la phase de lyse des oocystes permet de diminuer les pertes d'ADN durant les chocs thermiques et d'augmenter ainsi la sensibilité du test.**

De nouveaux essais ont été effectués en variant le pourcentage de Chelex-100 présent dans les solutions d'oocystes avant lyse.

Des volumes finaux de 15 à 75% (poids/volume) en Chelex-100 ont été ajoutés à des suspensions d'oocystes de concentration égale à 10^5 . Les amplifications obtenues pour les trois répliques ont donné des Ct identiques et égaux à 25. **L'augmentation des concentrations en Chelex-100 dans les tubes contenant les suspensions d'oocystes à lyser par chocs thermiques n'a donc pas permis d'améliorer la quantification des ADN.**

La lyse des oocystes de Cryptosporidium a été améliorée par l'ajout de Chelex-100 25% (p/v) lors des chocs thermiques.

3.7. Réalisation d'une gamme étalon à partir de lysats d'oocystes purifiés.

Des amplifications en TaqMan PCR ont été effectuées sur une gamme d'oocystes diluée en série au dixième. Les dilutions inférieures à 1000 oocystes ont été énumérées par immunofluorescence en microscopie optique. Dix numérations pour chaque dilution ont été effectuées. Ces concentrations ont été confirmées par comptage à l'aide de cellules de Neubauer sous lumière visible. Les dilutions supérieures à 1000 oocystes ont été évaluées par extrapolation.

Une gamme de dilution d'oocystes comprise de 5 à $6,6 \cdot 10^6$ a ainsi été lysée et amplifiée. Cinq répétitions pour chaque dilution ont été effectuées.

La ligne de base de détection de la fluorescence (threshold) est fixée à 0,1. Chaque courbe d'amplification a permis d'obtenir une valeur de Ct.

Une gamme étalon a été réalisée en reliant ces Ct à la quantité initiale d'oocystes de *C. parvum* (Figure 29). Chaque dilution de lysat d'oocystes ayant été amplifiée en cinq répétitions, à chaque quantité d'oocystes sont associés cinq points.

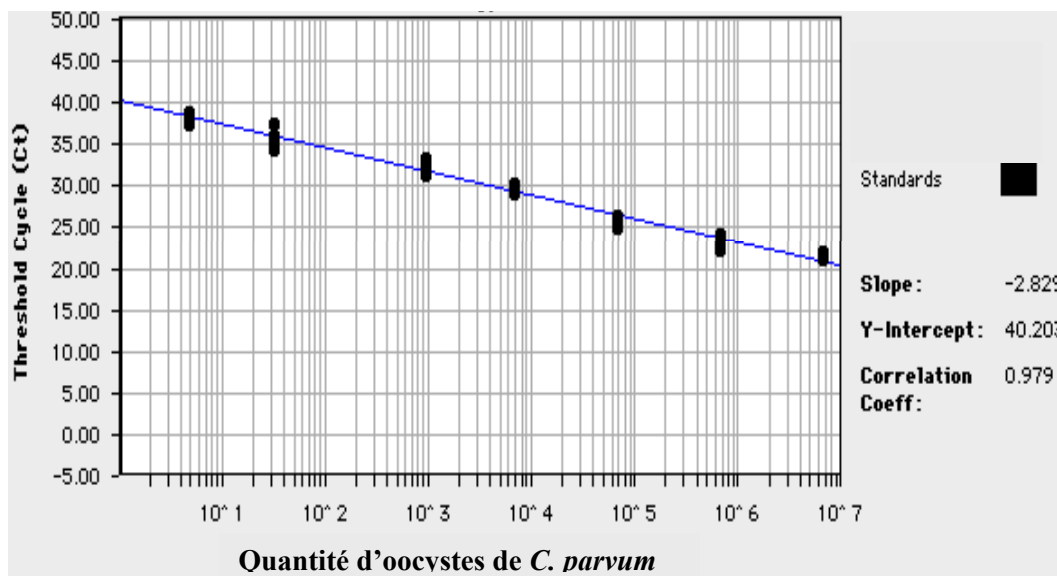


Figure 29 : Amplification d'une gamme d'oocystes de *C. parvum* lysés par chocs thermiques en présence de Chelex-100 (25%) (n=5). Génération d'une gamme étalon à partir des Ct obtenus.

Une réponse linéaire a été obtenue sur toute la gamme de concentrations testées et aucun effet d'inhibition n'a été observé. Aucune amplification n'a été observée dans les tubes témoins négatifs.

La pente de cette gamme étalon est de 1,229. Le coefficient de corrélation obtenu de 0,979 a démontré la bonne répétabilité de la quantification même pour une concentration de 5 oocystes présents par tube d'amplification.

Ce test, adapté à des oocystes de Cryptosporidium, permet de détecter et de quantifier linéairement de 5 à $6,6 \cdot 10^6$ oocystes. Cette quantification est très sensible, spécifique et rapide.

4. Discussion-Conclusion

Dans cette première partie de l'étude, une méthode de PCR quantitative ciblant spécifiquement l'espèce pathogène *Cryptosporidium parvum* a été mise au point. Ce test cible une séquence d'ADN génomique interne au fragment rapporté par Laxer *et al.* (1991), de fonction inconnue et spécifique de *Cryptosporidium parvum*. Les logiciels informatiques « Primer express » et « Oligo » ont permis d'établir la séquence de la sonde TaqMan™ et des amorces d'amplification nécessaires au test TaqMan PCR.

L'optimisation des paramètres de ce test a été rendue possible grâce à la synthèse d'un plasmide recombinant, PLax, possédant l'insert « Laxer » et utilisé comme ADN matrice. A l'aide de ce plasmide, les concentrations optimales en MgCl₂, en amorces et en sonde composant le mix réactionnel d'amplification pour le test TaqMan PCR ont été déterminées. Des concentrations de 5 mM de MgCl₂ et de 200 nM de chaque amorce et de sonde ont ainsi été retenues pour l'amplification de l'ADN plasmidique.

Une quantité testée équivalente à 6 copies d'ADN plasmidique nous a permis de déterminer la sensibilité minimale de ce test. Ainsi, si le génome de *C. parvum* ne détenait qu'une seule fois la séquence cible, le test TaqMan PCR développé ici aurait une limite de quantification d'au moins 6 unités génomiques. Le nombre de copies de cette séquence reste cependant hypothétique. En effet, malgré une large utilisation de cette région Laxer depuis sa publication, son nombre de copies dans le génome de *Cryptosporidium* n'est pas connu. Sluter *et al.* (1997) ont constaté qu'un ciblage de cette région pouvait multiplier par dix la sensibilité d'un test PCR et ont donc émis l'hypothèse qu'elle pouvait être présente en plusieurs copies dans le génome de *Cryptosporidium*. Néanmoins, compte tenu du fait que chaque oocyste possède 4 sporozoïtes, il semble logique que même un gène présent en une seule copie soit en réalité présent 4 fois par oocyste.

La linéarité a été évaluée par l'amplification d'une gamme de dilutions au dixième de plasmides PLax. Les résultats obtenus ont montré que la quantification était linéaire et reproductible sur une gamme allant de 6 à $6 \cdot 10^9$ copies d'ADN plasmidique présentes initialement en solution. La droite étalon obtenue grâce à cette gamme d'amplification a une pente de 3,329 avec une efficacité égale à 0,997, soit très proche de l'efficacité

maximale théorique d'amplification (égale à 1). Ceci est dû au fait que nous amplifions l'ADN de solutions très pures. De plus, les amplifications qui ont été réalisées en 3 répliques présentent un coefficient de corrélation de 0,992, ce qui montre la très bonne reproductibilité de ce test.

D'autres auteurs utilisant ce type d'amplification TaqMan PCR ont obtenu des résultats comparables, par exemple, pour des virus (virus de l'herpes) où la quantification linéaire a pu être observée à partir de quantités allant de 10 à 10⁸ copies d'ADN présents (Ryncarz *et al.*, 1999), pour des cellules fongiques sur une gamme de 2 à 10⁵ conidies (Haugland *et al.*, 1999) ou pour des bactéries sur une gamme de 100 à 10⁸ cellules (Lyons *et al.*, 2000).

La spécificité du test a été évaluée sur différentes espèces de *Cryptosporidium* autres que *C. parvum*, à savoir *C. baileyi*, *C. andersoni*, *C. felis*, *C. wrairi*, *C. serpentis*, *C. muris* et *C. meleagridis*.

Seul l'ADN de *C. meleagridis* a été amplifié par les amorces et la sonde sélectionnées pour le test. Différents travaux ont étudié génétiquement le fragment de 452-pb de Laxer. Champliand et son équipe (Champliand *et al.*, 1998) ont été les premiers à étudier par RFLP cette séquence et ont conclu qu'il n'était pas possible de différencier phylogénétiquement les espèces *C. parvum* de *C. meleagridis* au niveau de cette région isolée par Laxer. D'autres études ont par la suite démontré (d'après leur ADNr 18S, des locus d'HSP 70 ou de protéines d'adhésion) le contraire pour des isolats de *C. parvum* et *C. meleagridis* bien différenciés (Morgan et Thompson, 1999; Guyot *et al.*, 2002). Ainsi, des variations de bases entre les deux séquences existent bien même si le fragment Laxer semble conservé entre ces deux espèces. Pour une différenciation plus fine entre ces deux espèces, une RFLP ou un séquençage serait donc à envisager. Il est important de remarquer que l'espèce *C. meleagridis* a souvent été diagnostiquée lors de cas de cryptosporidiose (Pieniazek *et al.*, 1999; Sulaiman *et al.*, 2000; Pedraza-Diaz *et al.*, 2001; Tiangtip et Jongwutiwes, 2002). Le fait que le test détecte *C. meleagridis* en plus de *C. parvum* permet donc d'assurer une protection plus large du consommateur.

De plus, il est important de noter que d'autres auteurs (Chrisp *et al.*, 1994) ayant analysé les amplicons générés par les amorces Laxer ont révélé que *C. wrairi* pouvait être amplifié en PCR classique. En effet, seulement 18 à 20 pb semblent différencier ces 2 espèces à l'intérieur des 2 amorces de PCR. Notre test TaqMan PCR n'a pas soulevé ce

problème. Le choix de 2 amorces internes à ce fragment et d'une sonde de longueur conséquente (33pb) peut expliquer cette bonne spécificité.

L'application de ce test, développé sur ADN plasmidique, à des suspensions purifiées d'oocystes de *C. parvum* lysées a nécessité quelques ajustements. Cela concerne en particulier l'acidification du milieu réactionnel qui s'est révélée nécessaire pour obtenir une amplification optimale. Il est probable que la lyse des oocystes tend à donner un pH basique à l'échantillon. Or, l'enzyme de polymérisation utilisée en TaqMan PCR (AmpliTaq Gold DNA polymérase) a une activité très sensible et dépendante des variations de pH (Moreti *et al.*, 1998). Son activité étant plutôt favorisée par des pH acides, l'acidification du mélange réactionnel a permis de rétablir l'amplification.

Au final, l'évaluation d'un Master Mix (mix prêt à l'emploi) en comparaison à des réactifs en tubes individuels a présenté des résultats satisfaisants. L'utilisation future de ce Master Mix nous permettra d'augmenter d'une part, la reproductibilité et, d'autre part, de diminuer les risques de contaminations. En limitant les erreurs de pipetage, il ouvre des possibilités de standardisation entre les différentes réactions ou entre les différents laboratoires (Smetsers *et al.*, 1998). Ce réactif se conserve au réfrigérateur et permet d'éviter les pertes d'activité enzymatiques observées après un long stockage à -20°C (4 mois) (Kofler et Klausegger, 1999). Il permet aussi un gain de temps lors de la préparation de l'échantillon par l'élimination de cette étape de décongélation.

La première utilisation de ce test TaqMan PCR nous a permis de tester simplement et directement l'effet de l'addition de Chelex-100 au moment de la lyse thermique des oocystes sur une éventuelle amélioration des rendements de récupération des ADN de *Cryptosporidium*.

Ces billes de résine, par leurs propriétés chélatrices d'ions, sont connues comme protectrices de l'ADN à la chaleur (Walsh *et al.*, 1991). Du Chelex-100 est donc souvent employé dans des protocoles d'extraction d'ADN génomique précédant une amplification par PCR. Il a d'ailleurs déjà été utilisé lors de lyses thermiques des *Cryptosporidium* pour augmenter le degré de sensibilité de la PCR (Hallier-Soulier et Guillot, 1999; Lowery *et al.*, 2000; Rimhanen-Finne *et al.*, 2001).

Les résultats ont montré que l'addition de 25% de Chelex-100 lors de l'étape de lyse des oocystes a permis l'obtention d'une plus grande quantité initiale d'ADN présents dans les tubes avant l'amplification. Cet effet positif a directement été visualisé par une diminution significative du Ct.

Le Chelex-100 a donc été intégré au protocole de lyse thermique des oocystes avant amplification pour la détermination des performances du test sur oocystes en terme de sensibilité, de linéarité et reproductibilité.

La limite de quantification de ce test a été déterminée à 5 oocystes par réaction. Celle-ci est comparable à celle obtenue lors des tests de PCR « classique » (Hallier-Soulier et Guillot, 1999). Cette limite de quantification doit pouvoir être inférieure mais il est difficile de s'assurer, à ce niveau de concentration, du nombre exact d'oocystes amplifiés et donc de déterminer expérimentalement une limite de quantification plus basse avec certitude.

Une gamme dynamique linéaire de 6 log de concentration en oocystes de *C. parvum* a été obtenue par TaqMan PCR. Aucune inhibition, par exemple des composants du lysat d'oocystes, n'a été observée. La pente de la droite étalon obtenue par l'amplification des lysats d'oocystes est de 2,829 avec un coefficient de corrélation de 0,979. Cette pente est moins accentuée que celle générée par l'amplification des plasmides PLax (3,329). Cette différence pourrait être expliquée par la capacité qu'ont les oocystes à s'agglutiner entre eux lorsqu'ils sont en importante concentration. Pour être plus proche des conditions réelles, il conviendra donc d'utiliser une gamme d'étalonnage générée à partir de dilutions d'oocystes plutôt qu'une gamme plasmidique.

Un test développé en 2001 pour la détection d'un autre protozoaire, *Toxoplasma gondii* (Jauregui *et al.*, 2001) a présenté des résultats similaires. Après optimisation de leur test sur ADN plasmidique recombinant, les auteurs ont aussi obtenu une très bonne sensibilité et une linéarité sur une gamme de 4 à $3,7.10^5$ parasites avec un coefficient de corrélation de 0,977.

Dans cette première partie de notre étude, nous avons mis au point un test quantitatif de PCR spécifique applicable à des oocytes de *C. parvum* sur une large gamme logarithmique (6 unités logarithmiques). En plus des résultats satisfaisants obtenus en terme de linéarité, sensibilité et spécificité, cette méthode a confirmé les avantages entrevus en théorie, à savoir une bonne praticabilité permettant de quantifier rapidement et simultanément 96 échantillons en 2 heures. Entièrement automatisée, aucune manipulation post-PCR, comme par exemple une migration électrophorétique des amplicons sur gel, n'est nécessaire. En conséquence, cette technique ajoute au gain de

temps de manipulation, une réduction considérable des risques de contamination après amplification (les tubes restant fermés).

L'ensemble des résultats obtenus à la fois sur ADN plasmidique et sur oocystes lysés laisse entrevoir une adaptation possible de cette méthode TaqMan PCR à la détermination du parasite *C. parvum* dans des échantillons d'eau.

Chapitre III. Le test TaqMan PCR adapté à des échantillons d'eau.

1. Introduction

Dans la première partie de cette étude, nous avons développé un test TaqMan PCR optimisé et validé pour la détection et la quantification d'oocystes de *C. parvum* purifiés en suspension.

Malgré les nombreux avantages que les techniques de PCR ou de PCR quantitative offrent, les plus grandes difficultés ont surtout été observées lors de leurs applications à des échantillons environnementaux. La plupart des adaptations de cette technique à des concentrats d'eau sont confrontées à des problèmes d'inhibitions essentiellement dus aux nombreux ions et particules organiques interférentes présents et accumulés simultanément avec les parasites (Johnson *et al.*, 1995). De ce fait, une étape de purification des oocystes et/ou des ADN est généralement nécessaire.

Notre méthode a été bien évidemment confrontée aux mêmes problèmes sachant en plus que la faible quantité d'oocystes de *Cryptosporidium* dans l'eau nécessite obligatoirement une première étape de concentration de volumes importants d'échantillons d'eau de l'ordre de la centaine de litres.

Dans cette seconde partie, nous avons donc eu pour objectif d'adapter le test TaqMan PCR à des échantillons d'eaux traitées et d'eaux brutes en ajoutant des étapes de purification efficaces et compatibles avec la technologie TaqMan.

Par sa spécificité vis-à-vis de l'organisme recherché, la séparation immuno-magnétique (IMS) est la méthode de purification des oocystes de *Cryptosporidium*

actuellement la plus utilisée avant une amplification par PCR. Elle s'est révélée très efficace, voire indispensable pour purifier les oocystes des matières en suspension interférentes concentrées simultanément (Rochelle *et al.*, 1999; Hallier-Soulier et Guillot, 1999, 2003; Hsu et Huang, 2001 ; Lowery *et al.*, 2001; Sturbaum *et al.*, 2002).

Dans une première partie de cette étude, cette méthode de purification par séparation immuno-magnétique (IMS) a donc été testée : d'une part, dans son format « classique » purifiant spécifiquement les oocystes de *Cryptosporidium* des concentrats d'eau et, d'autre part, dans son format « moléculaire » récemment apparu sur le marché, purifiant spécifiquement les molécules d'ADN extraits après lyse des micro-organismes présents dans des milieux contaminés.

De plus, de nouveaux outils de purification et d'extraction d'ADN de type QIAamp™ DNA stool (Qiagen) révélés très efficaces pour des pathogènes issus de milieux très contaminés (Holland *et al.*, 2000 ; Monteiro *et al.*, 2001; Vandenberg et van Oorschot, 2002) ont aussi été évalués. Ce type de purification non spécifique de *Cryptosporidium* s'avère néanmoins intéressant, compte tenu de la spécificité vérifiée du test TaqMan PCR.

Dans une deuxième partie, et après sélection de la méthode de purification la plus adaptée, l'ensemble de la méthode a été évaluée par dopages d'eau de réseau (eau du robinet) ou d'eau de surface (eau de Seine) à partir de quantités connues d'oocystes de *C. parvum*.

2. Matériel et Méthodes

2.1. Quantification des oocystes

La concentration en oocystes a été déterminée par immunofluorescence sous microscope optique à épifluorescence (grossissement x200 et x400) en utilisant le kit *Cryptosporidium/Giardia* cell IFA (Cellabs, BMD, France). Le protocole opératoire est décrit dans le § 2.6.2 du chapitre II.

La concentration a été confirmée par comptage sous microscope à l'aide de cellules de Neubauer, sous lumière visible.

2.2. Filtration et concentration d'échantillons d'eau dopés

Des échantillons d'eau de réseau (robinet, 20 l et 100 l) et des échantillons d'eau de Seine (5 l) ont été filtrés selon les conditions de l'US EPA (USEPA 1622, 1999) en utilisant des cartouches Envirocheck® (Pall Gelman Sciences, Ann Arbor, USA) (Tableau XXI).

Nom	Envirocheck®
Fabricant	Pall (Gelman sciences)
Référence	12110
Porosité	1 µm (absolu)
Média filtrant	Polyéthersulfone
Support de filtre	Polypropylène
Carter	intégré (polycarbonate)
Longueur	21 cm
Diamètre	60 mm (dont carter)
Température maximum	-
Pression différentielle maximum	30 psid à 70°F (21°C)

Tableau XXI : Caractéristiques de la cartouche Envirocheck®

Les échantillons d'eau ont été filtrés à l'aide d'une pompe péristaltique (pompe Masterflex modèle n° 7549) pourvue d'une soupape de sécurité réglée à 2 bars permettant

de contrôler la pression et d'un compteur volumétrique mesurant le volume filtré. La vitesse de filtration de l'eau a été fixée à 2 l.min⁻¹.

Des dilutions stocks d'oocystes contenant de 5-8 oocystes à 775 oocystes de *C. parvum* ont été utilisées pour doper les échantillons d'eau filtrés. **Un système de dopage en continu a été intégré à la filtration afin d'injecter simultanément des suspensions d'oocystes de quantité connue.**

La Figure 30 présente ce système de filtration.

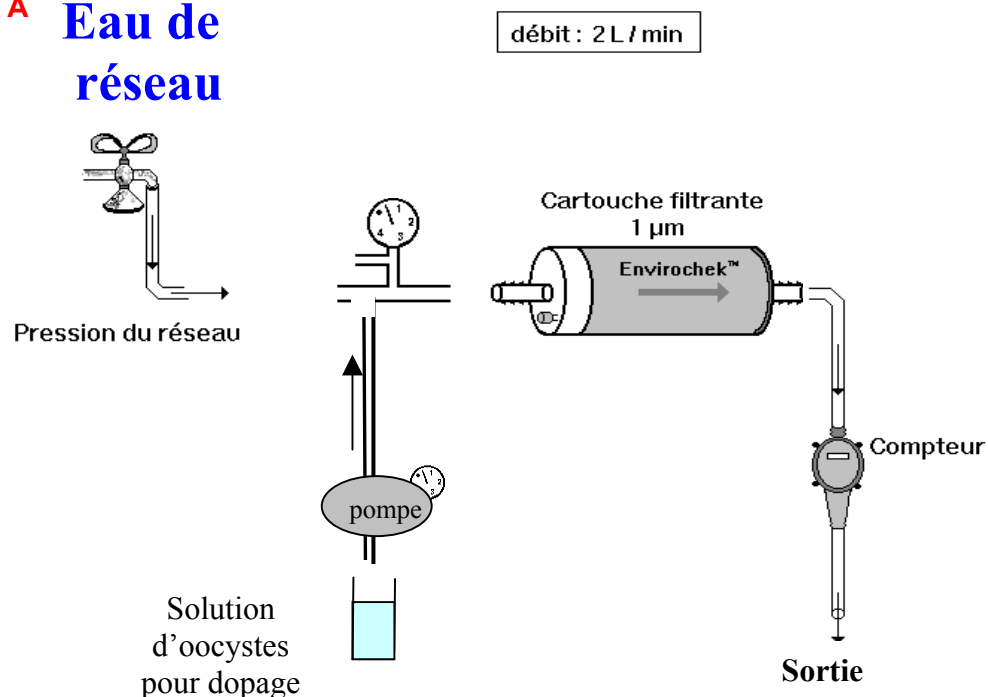
La turbidité des échantillons d'eau de Seine a été mesurée à l'aide d'un turbidimètre HACH 2100AN.IS (Prolabo, Fontenay sous bois, France).

Après filtration, les oocystes ont été élués des cartouches à l'aide d'une solution d'élution et d'une agitation en accord avec le protocole de l'US EPA (1999).

Les éluats ont été collectés dans des pots à fond conique de 250 mL puis les oocystes ont été concentrés par centrifugation à 1100 x g à + 4°C durant 20 minutes et sans freinage.

Les culots de centrifugation ont été obtenus par aspiration douce des surnageants, à la pipette, jusqu'au niveau des pots correspondant à 5 ml.

A Eau de réseau



B

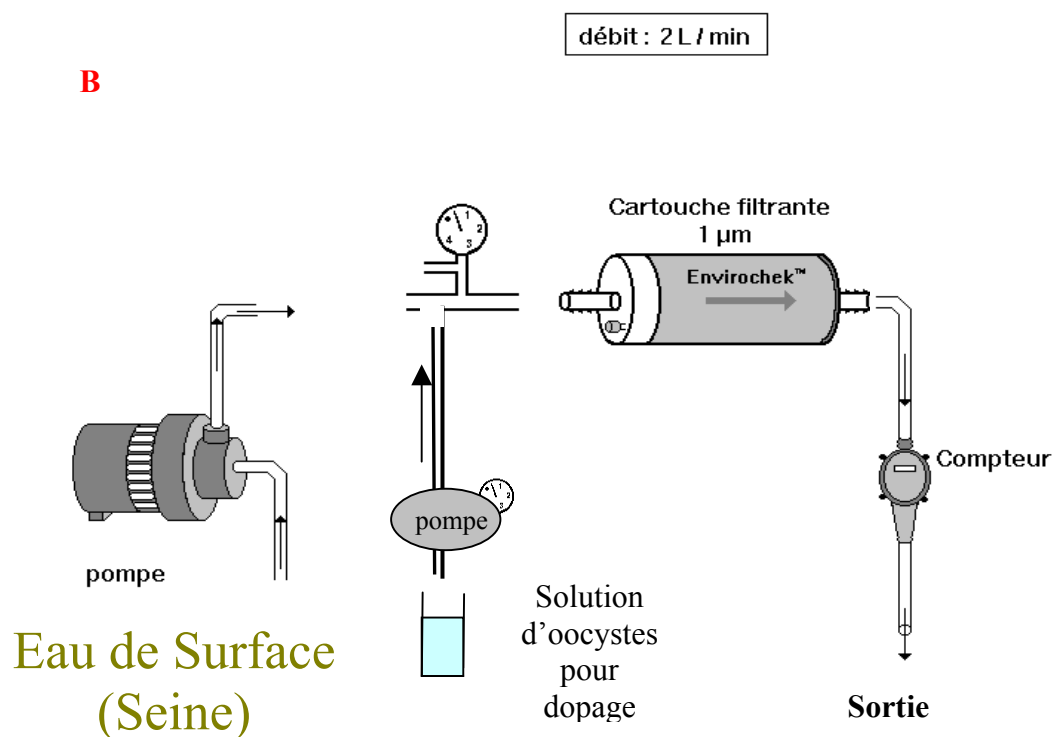


Figure 30 : Représentations schématiques des protocoles de filtration.
A : filtration d'eau de réseau (eau potable); B : filtration d'eau de surface (eau de Seine).

2.3. Lyse et purification d'ADN issus de concentrats d'eaux traitées ou d'eaux de surface.

2.3.1. Les colonnes échangeuses d'ions

Le kit de purification d'ADN total proposé par la société Qiagen (QIAamp® DNA Stool mini kit, Courtaboeuf, France) permet d'extraire rapidement et facilement l'ADN total provenant d'échantillons fortement contaminés par des inhibiteurs de PCR ou des enzymes de dégradation. **Le principe de cette purification est basé sur une lyse chimique, enzymatique et thermique des micro-organismes associée à une purification et extraction de l'ADN total sur des mini colonnes échangeuses d'ions.**

Les volumes d'élutions finaux des mini-colonnes conseillés dans le protocole sont compris entre 30 µl et 200 µl. Le protocole appliqué est détaillé en Figure 31.

Un volume d'éluat récupéré de 36µl a été amplifié en TaqMan PCR.

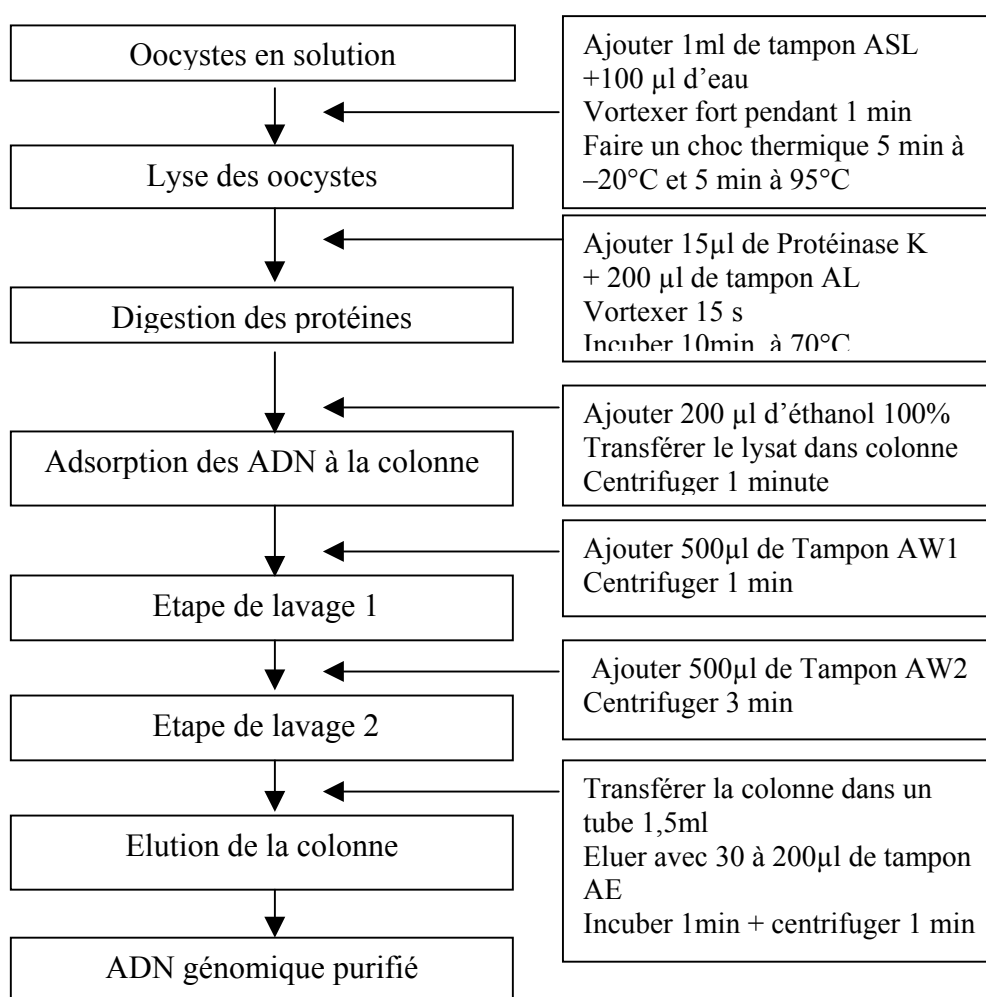


Figure 31 : Purification d'ADN génomique par QIAamp DNA stool mini kit

2.3.2. Les billes magnétiques de purification d'ADN génomique

Le kit de purification d'ADN génomique total par capture magnétique proposé par la société Dynal (Dynabeads® DNA DIRECT™ Universal, Compiègne, France) permet d'extraire l'ADN total provenant d'échantillons fortement contaminés. **Le principe de cette méthode est basé sur une lyse chimique des micro-organismes présents dans un échantillon puis une mise en présence des billes magnétiques fixant l'ADN par adsorption spécifique.** Les complexes ADN-Billes ainsi formés sont purifiés des contaminants et des inhibiteurs de PCR par capture magnétique.

Le protocole de cette purification est détaillé par la Figure 32.

Pour *Cryptosporidium*, les oocystes étant la forme de résistance du parasite, le protocole choisi a été celui conseillé pour des échantillons dits « difficiles » : les température et temps de lyse sont augmentés de 25°C pendant 5 min à 65°C pendant 15 min.

Le volume total d'éluat de 36 µl récupéré a été amplifié en TaqMan PCR.

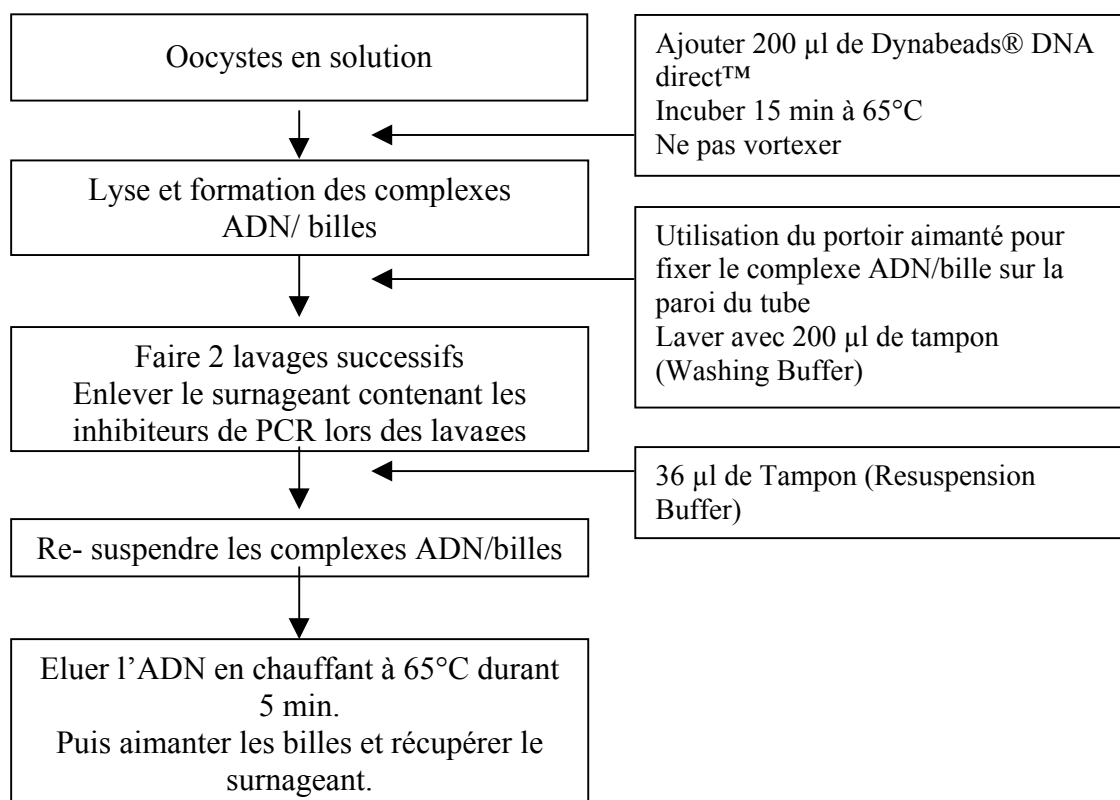


Figure 32 : Purification d'ADN génomique total par capture magnétique (Dynabeads® DNA DIRECT™ Universal)

2.4. Séparation immuno-magnétique des oocystes issus de concentrats d'eaux, extraction et purification d'ADN.

Le principe de cette méthode consiste à **combiner une étape de purification des oocystes de *Cryptosporidium* des concentrats d'eau par séparation immuno-magnétique (IMS) et une étape de purification des ADN par filtration au travers de mini-colonnes**, après lyse des oocystes par une série de chocs thermiques en présence de Chelex-100.

2.4.1. Séparation Immuno-Magnétique (IMS)

Les 5 ml de culot obtenus après filtration et concentration d'échantillons d'eau dopés ont été transférés dans un tube de Leighton pour l'étape de séparation immuno-magnétique. Trois millilitres d'eau distillée ont permis de rincer les pots à fond conique et ont aussi été transférés dans le tube de Leighton.

Des kits de séparation immuno-magnétique pour oocystes de *Cryptosporidium*, Dynabeads® anti-*Cryptosporidium*, (Dynal, Compiègne, France) ont été utilisés. Ces purifications ont été effectuées selon le protocole du fournisseur (cf. annexe) à l'exception de l'addition d'étapes de lavage permettant de réduire au maximum la quantité d'inhibiteurs de PCR :

- pour des échantillons issus de la filtration d'eau traitée (robinet) , un deuxième lavage avec 1 ml de tampon salin phosphaté à 2,5% (PBS phosphate buffered saline solution) a été ajouté,
 - pour des échantillons issus de la filtration d'eau de Seine, un premier lavage préliminaire a été ajouté avec 5 ml de 1x SL tampon A (préparé à partir des solutions de 10x SL buffer A fournies dans les kits).
- Deux autres lavages avec 1 ml de PBS à 2,5% ont été ajoutés.

Au terme de l'immuno-capture de *Cryptosporidium*, les billes magnétiques ont été suspendues dans 24 µl d'eau ultrapure (doublement distillée et garantie sans ARN ni ADN) en présence de 25% (p/v) de Chelex-100 (Biorad, Hercules, USA).

2.4.2. Lyse thermique des oocystes

L'ADN a été extrait des oocystes par une série de 5 cycles de chocs thermiques (-80°C 2 min, 95°C 2 min) en présence de 25% (poids/volume) de Chelex-100.

2.4.3. Purification du lysat par filtration sur colonne Nanosep®

Après une centrifugation de 3 minutes à 10 000 x g, l'ADN contenu dans le surnageant est purifié à travers des mini colonnes de filtration de porosité 0,45µm Nanosep® (Pall Gelman sciences).

Cette étape de filtration permet en particulier d'éliminer les billes magnétiques et les billes de Chelex-100.

Trois types de colonnes ont été testées, à savoir, les colonnes Nanosep®, les Nanosep Bio-inert® et les Nanosep® GHP MF conçues avec différentes membranes et décrites dans le Tableau XXII.

Cette purification est effectuée par centrifugation durant 5 minutes à 10 000 x g. Le volume total d'éluat récupéré a été amplifié en TaqMan PCR.

Nom	Nanosep Omega™	Nanosep Bio-Inert®	Nanosep® GHP-MF
Fabricant	Pall (Gelman sciences)		
Référence	OD010C33	ODM45C33	ODGHPC34
Média filtrant	Polyéthersulfone modifié	Nylon modifié	Polypropylène hydrophile
Porosité	0,45 µm		
Support de filtre	Polypropylène		
Longueur	4,5 cm		
Surface de filtration	0,28 cm²		
Volume maximum de l'échantillon	500 µl		
Volume mort (membrane/support)	< 5 µl		
Gamme de pH	3-14		
Force centrifuge maximale	14 000 x g		
Sanitation	Non stériles		

Tableau XXII : Gamme de colonnes à centrifuger Nanosep®

2.5. Gamme d'étalonnage

Afin de déterminer la quantité d'oocystes dans l'échantillon analysé, des gammes d'oocystes purifiés de quantités connues ont été amplifiées en parallèle.

Ces suspensions diluées en série de $7,7 \cdot 10^5$ à $1 \cdot 10^1$ oocystes ont été amplifiées en trois répliques. Les concentrations allant de 1 et 10^3 oocystes ont été évaluées par comptage de dix répétitions par immunofluorescence.

Les oocystes ont été lysés par chocs thermiques en présence de 25 % de Chelex-100 puis les ADN ont été purifiés par filtration à travers les colonnes Nanosep® GHP MF avant d'être amplifiés en TaqMan PCR.

L'efficacité d'amplification est déterminée par l'utilisation de la formule $E = 10^{-1/s}$ où s est la pente de la gamme étalon.

2.6. Conditions d'amplification en TaqMan PCR

La composition du mélange réactionnel pour l'amplification est résumée dans le Tableau XXIII.

Composants (concentrations finales)	
Master Mix	1X Tampon ROX
	200 μ M de chaque dATP, dCTP et dGTP
	400 μ M de dUTP
	0,5 U d'Uracil-N-glycosidase (UNG)
	1 U AmpliTaq Gold DNA polymérase,
	5 mM $MgCl_2$
+	$MgCl_2$ supplémenté (pour obtenir une concentration finale de 6mM)
+	200 nM de Sonde TaqMan
+	300 nM de chaque amorce
+	0,2 μ l d'HCl 0,1N

Tableau XXIII : Mix réactionnel d'amplification (volume final = 50 μ l)

Des solutions d'ADN purifiés obtenues à partir des échantillons d'eau ou des dilutions de suspensions d'oocystes ont été ajoutées au Mix de PCR.

Des contrôles négatifs sans oocyste ni ADN cible (remplacé par de l'eau PCR ultra pure) dans les étapes d'IMS et de PCR ont été amplifiés en parallèle pour chaque série de réactions.

Les conditions d'amplification sont résumées dans le Tableau XXIV.

Nombre de cycles	Durée	Température	Fonction
1 cycle	2 min	50°C	Digestion par l'UNG d'éventuels contaminants
1 cycle	10 min	95°C	Activation de l'AmpliTaq Gold
40 cycles	15 s	95°C	Cycles d'amplifications (dénaturation-élongation)
	1 min	60°C	

Tableau XXIV : Conditions d'amplification en TaqMan PCR.

L'amplification et la détection s'effectuent dans l'appareil ABI Prism® 7700 Sequence Detection System (Applied Biosystems, France).

Les données de la PCR sont analysées par un logiciel Sequence Detector.

3. Résultats

3.1. Choix d'une méthode de purification

3.1.1. Tests préliminaires par IMS-lyse thermique

Des tests d'amplification en TaqMan PCR ont été effectués sur des suspensions d'oocystes purifiés par IMS puis lysés par une série de chocs thermiques.

La présence des billes magnétiques issus de l'IMS dans le Mix réactionnel d'amplification a entraîné des problèmes de détection et donc de quantification : le laser de l'appareil semble avoir été gêné par l'opacité des billes lors de la lecture de la fluorescence.

Lors de la dernière étape d'IMS, des billes magnétiques sont systématiquement aspirées lors de la récupération du surnageant et ce, même en présence de l'aimant. Cette présence de billes en quantité variable a été vérifiée sous microscope. Elle a toujours été observée malgré les précautions prises lors du pipetage.

Cette méthode utilisée classiquement avant PCR n'a donc pas pu être directement utilisée avant TaqMan PCR.

Nous avons donc testé d'autres procédés de purification d'ADN pré-TaqMan PCR.

3.1.2. Les colonnes échangeuses d'ions

Des ADN issus de suspensions pures d'oocystes de *C. parvum* ont été purifiés par les kit QIAamp® DNA stool mini avant d'être amplifiés en TaqMan PCR. La reproductibilité de la récupération finale en ADN a été évaluée.

Pour ce faire, des suspensions identiques de 1000 oocystes ont été purifiées. Afin d'optimiser l'élution finale en ADN, des volumes d'élution variables de colonnes QIAamp® compris de 20 µl à 198 µl ont été testés. Chaque volume d'élution a été testé en 3 ou 4 répliques.

Un volume fixe de 36µl d'ADN élué des colonnes a pu être amplifié grâce à un volume de Mix réactionnel final de 100 µl au lieu de 50 µl (Figure 33).

Volume d'élution de la colonne QIAamp (µl)	Facteur de dilution
20	du volume
36	d'élution est
72	prélevé
90	2,5 →
108	3
126	3,5
144	4
180	5
198	5,5

Mix réactionnel d'amplification de 100µl (volume final)
 TaqMan PCR

Figure 33 : Volumes d'élution utilisés lors de l'étape finale de la purification, facteurs de dilution associés.

En parallèle, une gamme étalon d'oocystes a été amplifiée afin de pouvoir rapporter les Ct obtenus après purification par Qiagen DNA stool mini kit à une quantité de *C. parvum*.

Les quantités d'oocystes déduites de la gamme étalon ont été corrigées par le facteur de dilution associé au volume d'élution utilisé pour les colonnes.

La Figure 34 relie les volumes d'élution des colonnes Qiagen à la quantité en oocystes obtenue et corrigée par le facteur de dilution.

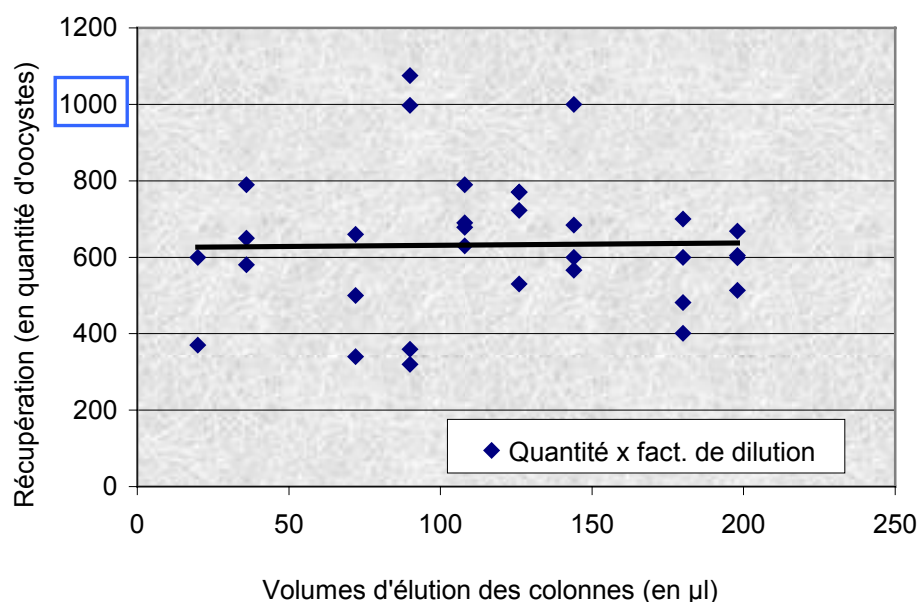


Figure 34 : Quantité d'oocystes récupérés (corrigée par le facteur de dilution) pour chaque volume d'élution testé (n = 3 ou 4).

La moyenne totale d'oocystes récupérés pour tous les échantillons cumulés (n=32) a été de 632,5 ($\pm 182,4$), pour un dopage initial de 1000 oocystes. **Ce mode de lyse et de purification nous a donc permis de ne récupérer que 63,2% du dopage initial.**

Les taux de récupération ont d'importantes variations. Pour chaque volume d'élution testé, les écart-types calculés ont varié de 10,6 % à 58,7 % en oocystes récupérés.

De plus, nous avons pu observer que l'augmentation des volumes d'élution de 20 μ l à 198 μ l n'a eu aucun effet sur les rendements de récupération en ADN purifié par les colonnes.

D'autres essais de lyse et de purification par Qiagen DNA stool mini kit de suspensions contenant 10 oocystes de *Cryptosporidium*, ont été élués dans 36 μ l puis amplifiés en TaqMan PCR. Une détection a toujours été observée sur les cinq essais effectués.

Ces derniers résultats montrent malgré tout la sensibilité de cette méthode de purification.

Les extractions-purifications d'ADN par « QIAamp DNA stool » ne sont pas adaptées à une quantification de l'échantillon . Cette purification est sensible mais non reproductible en terme de quantification.

3.1.3. Les billes magnétiques pour la purification d'ADN génomique

L'ADN d'une suspension de 1000 oocystes a été extrait par le kit d'extractions-purifications « Dynabeads® DNA DIRECT™ Universal » et amplifié en TaqMan PCR.

Cette expérience a été réalisée en 5 répliques.

L'ensemble des amplifications en TaqMan PCR n'a donné aucun signal. Les témoins positifs d'amplification se sont révélés positifs et ont validé la phase d'amplification.

*Les extractions-purifications d'ADN par « Dynabeads® DNA DIRECT™ Universal » ne sont pas adaptées à une lyse et purification des oocystes de *Cryptosporidium* avant une amplification en TaqMan PCR*

3.1.4. IMS, Lyse thermique des oocystes et purification par filtration sur Nanosep®

Compte tenu des résultats précédemment obtenus, nous avons décidé de valider une phase de purification combinant plusieurs étapes :

- une première purification des oocystes de *Cryptosporidium* par séparation immuno-magnétique (IMS),
- une seconde étape de lyse thermique en présence de Chelex-100 des complexes billes-oocystes,
- une étape finale de purification des ADN par filtration sur colonne.

Trois types de colonnes de filtration, différant principalement par leurs membranes filtrantes, ont été testées.

Pour ce faire, des suspensions de quantités identiques d'oocystes (10^5) lysées par chocs thermiques en présence de Chelex-100 ont été filtrées par ces différentes colonnes puis amplifiées en TaqMan PCR.

Les courbes d'amplification obtenues pour les 3 types de membranes ont été confondues (Ct identiques). Les types de membrane caractérisant chacune de ces unités de filtration n'ont donc eu aucune incidence sur la filtration de l'ADN. De plus, les trois membranes ont un volume mort identique (strictement inférieur à 5µl, selon le fournisseur).

Il a été observé à l'œil nu que les billes de Chelex-100 semblent toutes retenues par ces filtrations.

Compte tenu de ces résultats, **nous avons décidé de retenir la colonne GHP Nanosep® MF** pour ses propriétés plutôt axées sur la filtration de solutions aqueuses (d'après les conseils du fournisseur) et son prix légèrement plus attractif.

Le mode de purification des oocystes puis d'ADN développé ici a montré des résultats répétables et adaptables à des concentrats d'eau. Trois étapes ont été nécessaires aux extractions-purifications

d'ADN avant TaqMan PCR :

- ① *Une purification des oocystes par Séparation Immuno-magnétique (IMS)*
- ② *Une lyse des oocystes par une série de chocs thermiques en présence de Chelex-100*
- ③ *Une purification des ADN des billes magnétiques et de Chelex par filtration sur colonne « Nanosep® GHP MF »*

3.2. Détermination d'une gamme étalon pour la quantification d'oocystes de *C. parvum* contenus dans des échantillons d'eau.

Nous avons décidé de construire une gamme étalon d'oocystes purifiés combinant les étapes de lyse thermiques et filtration sur Nanosep® GHP MF.

Pour ce faire, une gamme de suspensions d'oocystes de *C. parvum* purifiés allant de $7,7 \times 10^5$ à 1-5 a été lysée en présence de Chelex-100, purifiée par filtrations (Nanosep® GHP MF) puis amplifiée en TaqMan PCR. Trois répliques de chaque dilution ont été effectuées.

La ligne de base de détection de la fluorescence (threshold) a été déterminée à 0,1 et a permis d'obtenir une valeur de Ct pour chaque amplification. Une gamme étalon a été construite en reliant ces Ct à la quantité initiale d'oocystes de *C. parvum* présents (Figure 35).

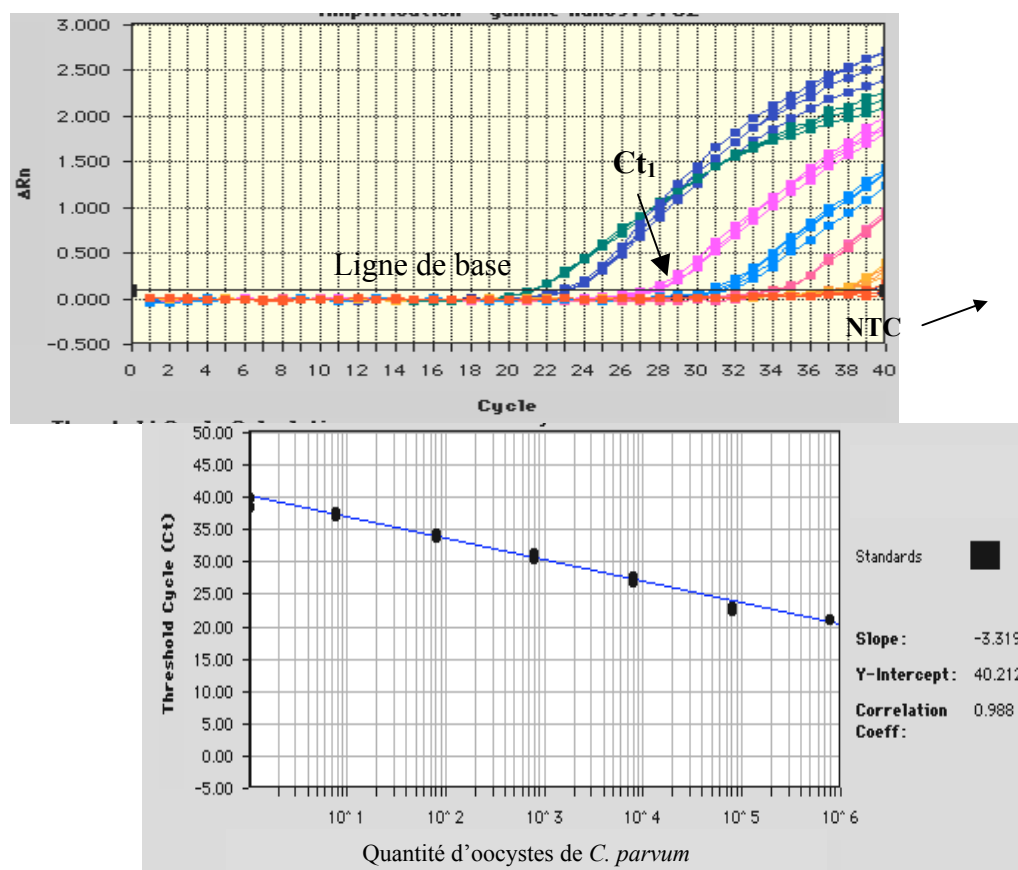


Figure 35 : Construction d'une nouvelle gamme étalon obtenue après lyse thermique des oocystes et purification des ADN sur colonne Nanosep®

La gamme étalon obtenue est linéaire sur 6-log de concentration. Le témoin négatif d'amplification (NTC) est négatif. La pente obtenue est de 3,319 et le coefficient de corrélation de 0,988.

L'efficacité d'amplification a été calculée à 0,999. Le seuil de quantification est de 5 oocystes.

Nous avons testé ensuite la répétabilité et la reproductibilité du test.

Des gammes de dilution au dixième ont été amplifiées, dans les mêmes conditions, en trois répliques et en trois occasions différentes, sur une période de 3 mois. Chaque expérience a été effectuée en trois répliques avec des dilutions d'oocystes stockées à 4°C sur une période de 3 mois. Les pentes obtenues des trois amplifications ont été $s = -1,443$, $s = -1,441$ et $s = -1,526$ et ont eu le même coefficient de corrélation de l'ordre de 0,99.

Quantité initiale amplifiée	Coefficient de variation entre les trois répliques			Moyenne des coefficients de variation
	Amplification n°1	Amplification n° 2	Amplification n° 3	
4	1,68 %	2,28 %	-	1,98 %
7,67	2,63 %	0,90 %	1,97 %	1,83 %
79,8	1,41 %	0,84 %	1,01 %	1,09 %
775,25	0,99 %	1,36 %	0,65 %	1,00 %
7752,5	1,23 %	1,16 %	0,79 %	1,06 %
77525	0,97 %	0,90 %	0,92 %	0,93 %
775250	0,71 %	0,14 %	1,28 %	0,71 %

Tableau XXV : Test de la répétabilité et de la reproductibilité des gammes étalon obtenues à partir de gammes de dilutions en oocystes.

Pour chaque concentration et pour chaque expérience, une moyenne des valeurs de Ct obtenus a été effectuée et a été associée à un coefficient de variation (variations entre trois répétitions).

Ces coefficients de variation obtenus ont été compris entre 0,14 % et 2,63 %. Cette valeur maximale de 2,63 % a été obtenue pour les faibles concentrations en oocystes (concentration inférieure à 10 oocystes).

Concernant la reproductibilité sur les 3 manipulations effectuées à un mois d'intervalle chacune, la moyenne des coefficients de variation a été comprise entre 0,71 % et 1,98 % (Tableau XXV).

Des gammes d'étalonnages applicables à la quantification d' oocystes de C. parvum issus d'échantillons d'eau ont été validées.

Ces gammes, construites après lyse de dilutions d' oocystes de C. parvum en présence de 25% de Chelex-100, purification des lysats par filtration sur colonne Nanosep® puis amplification en TaqMan PCR, sont linéaires, répétables et reproductibles.

3.3. Influence de l'addition de l'étape d'IMS au test TaqMan PCR

Afin d'évaluer l'influence de l'ajout de l'étape d'IMS sur notre gamme étalon construite précédemment, deux gammes de dilutions en séries de suspensions purifiées d'oocystes de *C. parvum* allant de $7,7 \cdot 10^5$ à 7 oocystes ont subi une étape d'IMS avant d'être lysés en présence de Chelex-100, purifiés par filtration sur colonnes Nanosep® puis amplifiés par TaqMan PCR.

Trois répliques par dilution ont été purifiées par IMS. La Figure 36 présente une des gammes d'amplification obtenue.

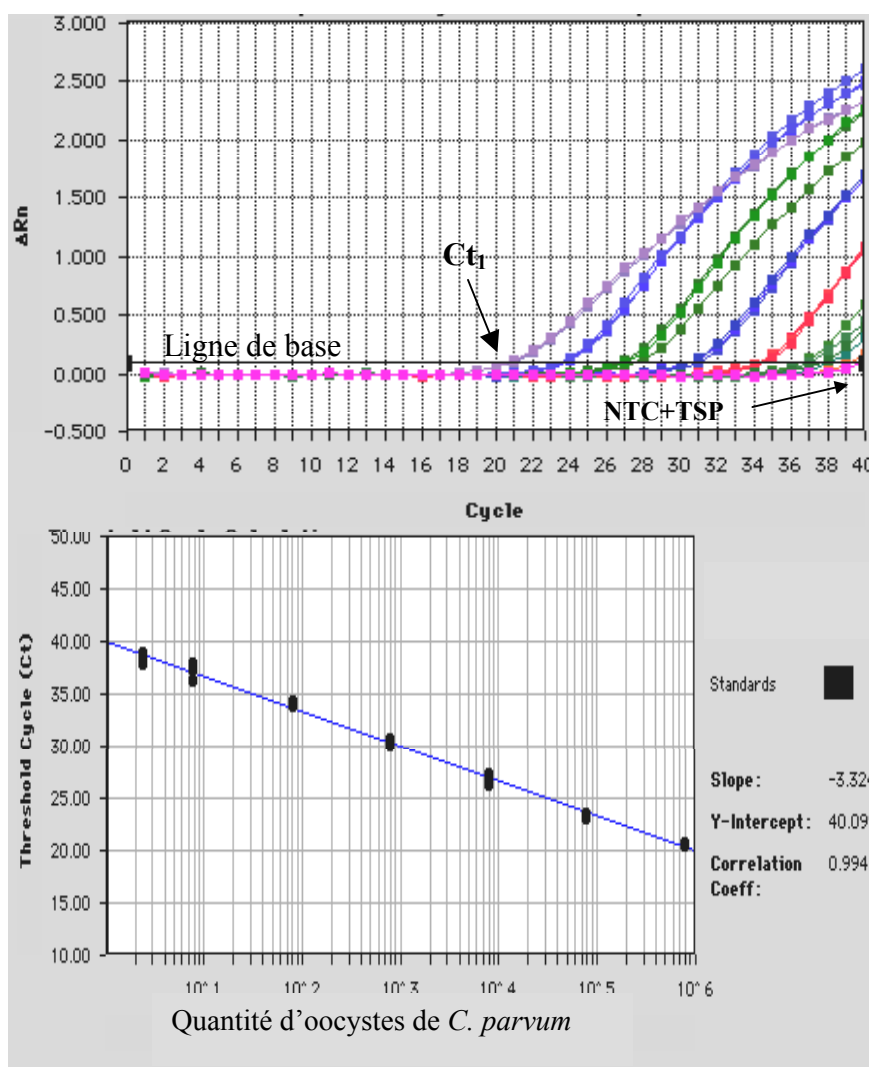


Figure 36 : Gamme obtenue après addition de l'étape de purification par IMS avant lyse thermique des oocystes et purification des ADN sur colonne Nanosep®

La ligne de base de détection de la fluorescence (threshold), déterminée à 0,1, a permis d'obtenir les valeurs de Ct. Une gamme étalon a été construite à partir de ceux-ci.

Deux contrôles négatifs ont été amplifiés en parallèle : un contrôle négatif d'IMS (TSP : Témoin sample préparation) sans oocyste présent lors de la purification par IMS et un contrôle de contamination d'amplification (NTC) sans ADN cible initialement présent. Les 2 témoins ont été négatifs dans les deux séries de manipulations.

Les deux gammes amplifiées après IMS-Nanosep-TaqMan PCR ont obtenu des pentes $s = -1,447$ et $s = -1,442$ et des coefficients de corrélation de 0,99. **Ces résultats ont montré que l'IMS n'a pas eu d'influence sur les gammes d'oocystes amplifiées.**

L'IMS est une étape nécessaire à la concentration et à la purification des oocystes issus de concentrats d'eau. Elle est applicable, avant filtration sur colonnes Nanosep®, à la quantification par TaqMan PCR des oocystes. Elle n'agit ni sur la pente, ni sur le coefficient de corrélation.

3.4. Analyse par TaqMan PCR d'échantillons d'eau dopés

Des échantillons d'eau potable (20 l et 100 l) et d'eau de surface (5 l d'eau de Seine) sont dopés avec trois quantités d'oocystes différentes (5-8, 78 et 775 oocystes). Après filtration et concentration des échantillons d'eau, purification des oocystes par IMS, l'ADN a été extrait et purifié par chocs thermiques suivis d'une filtration sur colonnes Nanosep®.

Trois à cinq répétitions par dopage ont été effectuées. Les valeurs de turbidité des eaux de Seine ont été comprises entre 4 et 7 NTU.

Quantités initiales en oocystes (moy)	Type d'eau filtré	Volume filtré (l)	Nombre de réplifications	Ct obtenu (threshold cycle) (moy)	Nombre d'oocystes quantifiés (moy)	Pourcentage d'oocytes récupérés
5	Eau de réseau	20	3	37,98 ±1,02	3,8 ±2,1	75,8 ±42,3
8,3	Eau de réseau	20	3	37,68 ±1,15	4,8 ±2,8	58,2 ±33,4
		100	3	37,39 ±1,57	6,5 ±4,4	78,2 ±61,8
	Eau de Seine	5	3	37,7 ±0,58	4,1 ±1,6	49,6 ±19,3
78,6	Eau de réseau	20	5	33,87 ±0,44	54,8 ±17,5	69,7 ±22,3
		100	5	33,54 ±0,26	66,4 ±7,6	84,5 ±9,7
	Eau de Seine	5	5	34,33 ±0,27	36,4 ±5,8	46,4 ±7,3
775	Eau de réseau	20	5	30,41 ±0,27	551,1 ±108,7	71,1 ±14,0
		100	3	30,47 ±0,36	608,5 ±158,1	78,5 ±20,4
	Eau de Seine	5	5	30,78 ±0,30	446,5 ±83,1	57,6 ±10,7

Tableau XXVI : Quantités d'oocystes de *C. parvum* récupérées après dopages d'eau du robinet et d'eau de surface

Après amplification par TaqMan PCR, chaque échantillon est caractérisé par un signal fluorescent d'amplification (Ct).

Aucune amplification n'a été observée pour les échantillons d'eau non dopés en oocystes de *C. parvum*, que ce soit pour les échantillons d'eau potable ou pour les échantillons d'eau de Seine. Ceux-ci ne possédaient donc pas d'oocystes de *C. parvum* ou un nombre inférieur à la limite de détection.

Afin de déterminer la quantité en oocystes de *C. parvum* présents dans chaque échantillon, les Ct obtenus après amplification sont comparés à la gamme étalon amplifiée en parallèle dans la même expérience. Le pourcentage de récupération en oocystes a été calculé pour chaque échantillon. Le Tableau XXVI résume les résultats obtenus selon le type d'échantillon (eau du robinet /eau de Seine), la concentration initiale en oocystes du dopage (quatre quantités testées), le volume d'eau filtré (5, 20 ou 100 litres) et le nombre de répétitions effectuées pour chacune des manipulations.

Nous pouvons observer que, malgré la succession d'étapes (filtration, élution, IMS, chocs thermiques, Nanosep®), ce test permet de détecter de petites quantités en oocystes. **Cinq et huit oocystes respectivement utilisés pour doper des échantillons d'eau potable (20l et 100l) et des échantillons d'eau de Seine (5 l) ont toujours été détectés après amplification en TaqMan PCR.**

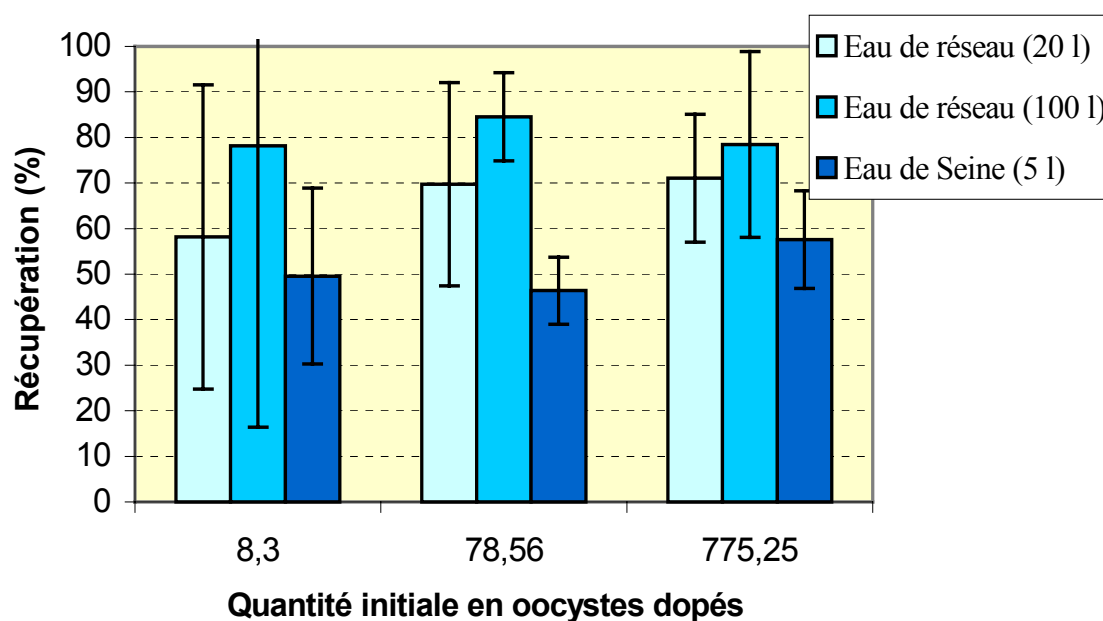


Figure 37 : Comparaison des pourcentages de récupération en oocystes de *C. parvum* obtenus avec différentes quantités de dopage pour différents types d'échantillons.

Les moyennes des taux de récupération obtenus pour des quantités initiales de dopage en oocystes de 78 et 775 respectivement sont de $69,7 \pm 22,3$ % et $71,1 \pm 14,0$ % pour des volumes de 20 l d'eau potable et de $84,5 \pm 9,7$ % et $78,5 \pm 20,4$ % pour des volumes de 100 l d'eau potable.

Pour les eaux de surface du type eau de Seine, de turbidité comprise entre 4 et 7 NTU, les taux de récupération pour 5 l filtrés sont plus faibles et sont, pour des quantités initiales de dopages en oocystes de 78 et 775 respectivement, de $46,4 \pm 7,3$ % et $57,6 \pm 10,7$ %. Ces taux de récupération sont présentés dans la Figure 37.

4. Discussion-Conclusion

Dans cette seconde partie de l'étude, nous avons adapté le test TaqMan PCR, développé précédemment sur des suspensions pures d'oocystes, pour quantifier le parasite *C. parvum* issu de différents échantillons d'eau. Un protocole a donc été établi pour concentrer les oocystes puis pour extraire et purifier leurs ADN afin de les quantifier. Différentes méthodes de purification d'ADN, fréquemment utilisées en diagnostic PCR, ont été testées.

Dans un premier temps, nous avons testé l'IMS classique directement avant TaqMan PCR puisque cette méthode avait déjà été rapportée comme une étape pré-PCR efficace (Rochelle, *et al.*, 1999; Hallier-Soulier et Guillot, 2000; Lowery, *et al.* 2001). Cependant, les résultats ont rapidement montré que les billes magnétiques sont mélangées au Mix d'amplification et troublent la détection laser de la fluorescence des sondes TaqMan.

Dans un second temps, nous avons utilisé des colonnes échangeuses d'ions de kit QIAamp™ DNA stool mini (Qiagen, France) ayant été séduits par les nombreux avantages qu'elles présentaient :

- facilité de mise en œuvre,
- possibilité de purifier l'ADN de micro-organismes en moins d'une heure,
- efficacité rapportée par différents auteurs, même lors de la purification de faibles concentrations en ADN cible (Monteiro, *et al.* 2001; Vandenberg et van Oorschot, 2002),
- prix attractif (3,18 € par tube de purification) par rapport à une purification par IMS (évaluée en interne à 25 € et à 46\$US par Higgins (Higgins *et al.*, 2001).

De plus, leur application avant PCR sur *Cryptosporidium* avait obtenu des résultats prometteurs en terme de sensibilité puisque 1 à 10 oocystes ont pu être détectés après filtration de 100 l d'eau de réseau et purification d'un aliquot du culot de centrifugation (Chung *et al.*, 1998).

Nos propres essais de purification par QIAamp™ DNA stool n'ont pas été concluants pour être appliqués à un test quantitatif de type TaqMan PCR. Les résultats

obtenus ont en effet montré que les quantités d'ADN éluées variaient à chaque purification et ce, quelque soit le volume d'élution utilisé lors de l'étape finale. Le rendement moyen de récupération a été évalué à 63,2% ($\pm 18,2\%$) pour l'ensemble des volumes d'élution testés. De plus, des écart-types extrêmes allant jusqu'à 58,7% ont été observés à plusieurs reprises.

Malgré une bonne sensibilité (signal toujours positif pour des quantités purifiées inférieures à 10 oocystes), ce manque important de reproductibilité rend inadaptée cette purification à une méthode de quantification des échantillons.

De tels résultats ont également été rapportés dans une autre étude effectuée simultanément à la nôtre (Higgins, *et al.* 2001). Cette équipe a appliqué cette purification à *C. parvum* issus d'échantillons de fèces avant TaqMan PCR. Deux kits d'extraction d'ADN ont été testés : Qiagen QIAamp™ DNA stool mini et Mo bio UltraClean™ soil DNA kit (Salonana beach, CA, USA). En premier lieu, le kit Qiagen s'est avéré plus efficace que le second pour purifier les ADN des inhibiteurs présents. Dans un deuxième temps, il a été observé qu'il n'était pas possible de quantifier les oocystes de *C. parvum* par TaqMan PCR après une purification par QIAamp™ DNA stool. Les auteurs soulignent aussi que les oocystes sont souvent en quantités trop faibles pour pouvoir être purifiés et que ces colonnes n'éliminent pas totalement les inhibiteurs de PCR présents (ions en particulier).

Au vu des résultats peu reproductibles obtenus sur QIAamp™ DNA stool, nous avons testé une seconde méthode de purification d'ADN intégrant une lyse chimique et thermique puis une capture d'ADN sur billes magnétiques (IMS Dynabeads® DNA DIRECT™ Universal).

Les résultats d'amplification en TaqMan PCR ont montré qu'aucun ADN n'a été détecté suite à cette purification. L'étape combinée de lyse chimique et d'un chauffage à 65°C n'a pas semblé suffire à la lyse du parasite avant la fixation de l'ADN sur les billes magnétiques. Ces résultats confirment l'extrême résistance des oocystes de *Cryptosporidium* conférée en particulier par la morphologie de leurs parois.

De plus, deux inconvénients majeurs ont été révélés lors des différentes manipulations :

- lors de l'élution finale, les ADN doivent être séparés des billes. Cette purification a pour risque de soit pipeter des billes simultanément à

l'ADN, soit de laisser du concentrat d'ADN au fond du tube. Or, cette approche n'est pas appropriée avec une détection quantitative précise.

- cette méthode s'effectue sur un volume initial de 1,5 ml, volume trop faible pour traiter la totalité du culot de centrifugation d'environ 5 ml récupéré après filtration des échantillons d'eau. L'utilisation de ce type de purification aurait donc nécessité la multiplication du nombre de purifications, l'addition d'une étape de concentration type IMS ou de se restreindre à ne travailler que sur un aliquot.

Compte tenu des résultats décevants obtenus avec les techniques testées de purification d'ADN, nous avons réfléchi à une troisième approche originale résultant de la combinaison de deux purifications : une purification des oocystes de *Cryptosporidium* issus des concentrats d'eau suivie d'une purification des ADN contenus dans les oocystes. Pour ce faire, un protocole en trois étapes a été imaginé :

- ① une première étape consistant à extraire du concentrat d'eau les oocystes de *Cryptosporidium* par IMS classique permettant d'éliminer les inhibiteurs éventuels de PCR,
- ② une seconde étape de chocs thermiques en présence de Chelex-100 permettant de lyser les oocystes liés aux billes et de libérer les ADN,
- ③ une troisième étape de purification par filtration sur mini-colonnes Nanosep® purifiant les ADN des billes magnétiques restantes, des billes de Chelex-100 et d'éventuels gros résidus cellulaires.

Par ce protocole de purification, le culot de centrifugation (~5 ml) peut être ainsi totalement amplifié en TaqMan PCR. De plus, le volume mort quasiment nul de ces colonnes n'entraîne aucune perte de l'échantillon traité.

Les résultats préliminaires obtenus avec ce mode de purification se sont révélés rapidement satisfaisants rendant possible l'adaptation de ce type de pré-traitement à une amplification en TaqMan PCR d'oocystes issus d'échantillons d'eau.

Dans la perspective de l'utilisation de ce dernier protocole de purification, il était nécessaire de valider une nouvelle gamme d'étalonnage en intégrant l'étape de purification sur Nanosep® après lyse des oocystes par chocs thermiques. Cette nouvelle gamme de 5-8 à 10⁶ oocystes a montré une linéarité et une sensibilité identiques à celles

développées sans purification sur Nanosep®. De plus, la pente de cette gamme d'étalonnage obtenue ($s=-1,441$) a présenté une meilleure efficacité que celle obtenue sur lysat d'oocystes sans purification ($s=-1,229$) et s'est rapprochée de celle obtenue avec les amplifications sur des solutions très pures de plasmides PLax ($s=-1,446$). Cette différence de pente observée avec les lysats d'oocystes provient probablement de la bonne rétention des billes de Chelex-100 et, éventuellement, de particules cellulaires qui pouvaient interférer la quantification en absence de purification initiale. Cette purification par filtration sur colonnes Nanosep® permet donc d'obtenir une meilleure efficacité d'amplification (efficacité proche de 1).

De plus, la répétition des manipulations en trois répliques réalisés à plusieurs reprises sur 3 mois d'intervalle a présenté des coefficients de variation relativement faibles (coefficient maximum de 2,6%, obtenus pour des faibles quantités d'oocystes). Ces résultats sont inférieurs aux coefficients de variation maximum de 10% généralement observés pour des techniques d'énumération non moléculaire de type immunofluorescence (Chesnot *et al.*, 2002) et montrent la bonne reproductibilité des gammes étalon.

Afin de vérifier que l'étape de pré-traitement de l'échantillon d'eau par IMS initialement envisagée dans le protocole de purification n'influçait pas les résultats précédemment obtenus, nous avons réalisé une gamme étalon IMS-Nanosep®-TaqMan PCR sur des suspensions pures d'oocystes de *C. parvum* dilués.

Nous avons observé que les pentes et les coefficients de corrélation obtenus étaient similaires à ceux obtenus sans l'IMS. De même, les coefficients de corrélation obtenus de 0,99 pour les deux séries d'amplifications effectuées nous permettent de montrer que, en conditions identiques, la récupération et la quantification après IMS a été répétable. Ces résultats montrent que l'étape de filtration sur Nanosep® en aval de l'IMS a bien éliminé les billes magnétiques qui pouvaient perturber la détection laser.

Nous avons donc construit ici un test moléculaire linéaire, sensible, spécifique et reproductible adaptable à la quantification d'oocytes de *C. parvum* contenus dans des échantillons d'eau initialement purifiés par IMS.

A l'heure actuelle, aucune étude n'a encore été développée pour la quantification de *Cryptosporidium* en TaqMan PCR. Seuls les travaux de l'équipe de Higgins (Higgins *et al.*, 2001) ont tenté une quantification de *Cryptosporidium* à partir de selles humaines

mais n'ont pas abouti en terme de quantification à cause de l'importante quantité d'inhibiteurs. Les autres applications de cette nouvelle technique sur oocystes n'ont été effectuées que sur des suspensions pures (McDonald *et al.*, 2002; Keegan *et al.*, 2003).

Nous avons ensuite validé ce test sur des échantillons d'eaux traitées et d'eaux de Seine dopées via une injection régulière de suspensions d'oocystes lors de la filtration à travers les cartouches Envirocheck®.

Le pilote de dopage imaginé pour cette étude présente l'avantage d'éviter les pertes souvent générées lorsque ces suspensions sont directement injectées dans un récipient intermédiaire (les oocystes pouvant s'adsorber sur la paroi du récipient et un volume mort plus ou moins important pouvant échapper à la filtration). Les oocystes ont été purifiés, lysés puis amplifiés en utilisant la technique combinée IMS-Nanosep®-TaqMan PCR et les rendements de récupération ont été calculés.

Pour les filtrations d'eau de réseau, nous avons obtenu des pourcentages de récupération allant de 47,4% à 99% pour des dopages allant de 78 et 775 oocystes approximativement.

La récupération a été supérieure pour la filtration d'échantillons de 100 l d'eau du robinet comparée à la filtration de 20 l d'eau du robinet. En effet, pour 100 l d'eau potable filtrée, respectivement 84,5 % ($\pm 9,7$ %) et 78,5 % ($\pm 20,4$ %) de récupération ont été obtenus, alors que pour 20 l d'eau potable filtrée, les rendements ont été de 69,7 % ($\pm 22,3$ %) et 71,1 % ($\pm 14,0$ %). Cette différence peut être expliquée par la taille du culot de centrifugation obtenu dans les pots après élution des cartouches. Ces culots étant plus importants et compacts après la filtration de 100 l d'eau potable, nous avons, par conséquent, moins de risque de perdre du matériel lors de l'élimination du surnageant. Ces résultats tendent à aller dans le sens des auteurs qui privilégient la filtration d'un grand volume d'eau, quitte à ne pas tout analyser, plutôt que de filtrer de petits volumes dans le but d'analyser la totalité.

En terme de sensibilité, ce test d'IMS-TaqMan PCR est comparable aux tests IMS-PCR déjà développés (Hallier-Soulier et Guillot, 1999). Des dopages des échantillons (20 l et 100 l) réalisés en 3 répétitions avec 5-8 oocystes sont détectés lors de chaque amplification. Cette limite de quantification correspond au niveau de sensibilité de la procédure globale, c'est à dire de toutes les étapes incluant la filtration, l'IMS, la

purification des ADN et l'amplification en TaqMan PCR. Ceci nous permet de montrer que la perte en oocystes à chaque étape a été faible.

Pour les filtrations d'eau brute (eau de Seine de turbidité de 4 à 7 NTU), les rendements de récupération sont situés entre 46,4 % ($\pm 7,3$ %) et 57,6 % ($\pm 10,7$ %) pour des dopages respectifs de 78 et 775 oocystes. La sensibilité du test est équivalente à 8 oocystes. La perte observée par rapport aux eaux traitées peut s'expliquer par l'importante quantité de particules présentes qui interfèrent sur le rendement de la cartouche de filtration et la capacité des billes magnétiques d'IMS à fixer les oocystes. De plus, la présence de particules, d'ions et de substances inhibitrices est aussi connue pour diminuer les rendements de PCR (Johnson *et al.*, 1995; Lowery *et al.*, 2000).

L'ensemble des rendements de récupération calculés sont supérieurs à ceux rapportés récemment par une étude d'évaluation de la méthode classique 1622 de l'USEPA effectuée par l'équipe de Simmons *et al.* (Simmons *et al.*, 2001). Ceux-ci ont obtenu, sur 10 l d'eau filtrée, un taux de récupération en oocystes pour des échantillons d'eau propres à 47% (± 19 %) et pour des échantillons d'eau de rivière à 12 % (± 6 %).

De même, la norme française NF T 90-455 rapporte d'autres résultats obtenus au cours d'essais inter-laboratoires effectués lors de la validation de la norme (AFNOR, 2001). Quatorze laboratoires ont effectué ces essais et ont obtenu un taux de récupération en oocystes pour des échantillons de 100 l d'eau de distribution de 41,3% ($\pm 12,3$ %) et pour des échantillons de 20 l d'eau de surface de 56,1% ($\pm 18,2$).

Par ailleurs, la norme française impose d'obtenir un rendement global de la méthode de recherche et de dénombrement d'oocystes de *C. parvum* dans l'eau supérieur ou égal à 20%. Notre méthode mise au point a obtenu des pourcentages bien supérieurs et pourrait donc être applicable à des laboratoires d'analyse de routine. De plus, ce nouveau test par TaqMan PCR applicable à des échantillons d'eau présente les avantages d'être :

- spécifique de l'espèce pathogène de l'homme *C. parvum* (et de *C. meleagridis*),
- reproductible sur une large gamme d'oocystes (de 1-5 à 10^6),
- sensible,
- rapide puisque la combinaison IMS-Nanosep®-TaqMan PCR peut s'effectuer entre 3 et 4 heures.

Chapitre IV. Construction d'un test quantitatif ciblant la viabilité des oocystes de *Cryptosporidium* via les ARNr 18S

1. Introduction

Actuellement, les méthodes conventionnelles (AFNOR, USEPA, DWI...) utilisées par les laboratoires de routine ne permettent pas de cibler la viabilité (état mort ou vivant) du parasite *Cryptosporidium*. Aussi, ce pathogène détecté dans un échantillon d'eau peut ne pas être viable et n'avoir par conséquent aucune incidence sur la santé publique. Il serait donc intéressant d'avoir à disposition un test de détection du parasite *Cryptosporidium* caractérisant également l'état viable ou mort des oocystes. Cela permettrait, notamment aux industriels de l'eau, d'évaluer d'une part, les risques réels du danger à *Cryptosporidium* lors d'analyses d'échantillons d'eau et, d'autre part, l'efficacité réelle des traitements physiques ou chimiques de désinfection de l'eau (chloration, ozonation, UV...).

Plusieurs approches conventionnelles visant à déterminer la viabilité du parasite *Cryptosporidium* ont déjà été développées :

- l'incorporation de colorants marqueurs de viabilité (Robertson *et al.*, 1998; Freire-Santos *et al.*, 2000; Neumann *et al.*, 2000b),
- l'excystation *in vitro* des oocystes (Campbell *et al.*, 1992; Robertson *et al.*, 1993; Neumann *et al.*, 2000a),
- la capacité d'infectivité sur culture cellulaire (Slifko *et al.*, 1997; Jenkins *et al.*, 2003).

Du fait de leur faible sensibilité, ces méthodes présentent l'inconvénient majeur de nécessiter une concentration importante des oocystes les rendant inapplicables à des échantillons environnementaux. De plus, alors que l'incorporation de marqueurs de

viabilité est une méthode peu fiable (faux positifs et faux négatifs), les méthodes d'excystation et de culture cellulaire beaucoup plus sûres sont plus lourdes et longues à mettre à œuvre et ne sont pas du tout adaptées à une éventuelle situation d'urgence.

Les nouvelles techniques de biologie moléculaire utilisent le plus souvent la molécule d'ADN pour détecter spécifiquement un micro-organisme. Or, les molécules d'ADN ne peuvent généralement pas être associées à la viabilité. En effet, elles se sont révélées très stables et sont détectables par PCR plusieurs jours après la perte de viabilité du pathogène déterminée par culture cellulaire (Herman, 1997; McKillip *et al.*, 1999).

Des approches moléculaires estimant la viabilité de *Cryptosporidium* ont déjà été développées en ciblant les ARNm des protéines hsp70 ou les ARNm de la beta-tubuline par RT-PCR (Stinear *et al.*, 1996; Kaucner et Stinear, 1998; Widmer *et al.*, 1999; Jenkins *et al.*, 2000; Hallier-Soulier et Guillot, 2003). De même, les ARNr sont utilisés comme indicateurs de viabilité des *Cryptosporidium* notamment dans la méthode FISH où il a été démontré que la présence des ARNr 18S était corrélée à la viabilité des parasites (Vesey *et al.* 1995, Vesey *et al.*, 1998; Jenkins *et al.*, 2003). Néanmoins, ces molécules sont surtout étudiées chez les bactéries (Amann *et al.*, 1995 ; McKillip *et al.*, 1998) et restent peu documentées, en terme de marqueurs de viabilité, chez le parasite *Cryptosporidium* (Widmer *et al.*, 1999).

Dans le but de développer un test quantitatif de routine, l'utilisation des ARNr 18S présente de nombreux avantages :

- leur présence en grand nombre de copies dans les oocystes permet d'obtenir un test sensible. Plusieurs études ont évalué leur nombre de copies entre 20 et 40 par oocyste (Sluter *et al.*, 1997; Keegan *et al.*, 2003),
- leur demi-vie courte et leur dégradation rapide après la mort des oocystes par action des RNases intracellulaires ne permet de détecter que les oocystes viables (Vesey *et al.* 1995),
- leur utilisation comme marqueurs taxonomiques permet de mieux différencier les espèces de *Cryptosporidium* entre elles, d'après leurs propriétés moléculaires (Figure 38). Les séquences d'ARNr 18S sont en effet très utilisées pour révéler les relations phylogénétiques entre micro-organismes, par comparaison de leurs régions homologues (régions très conservées) et divergentes (régions hyper-variables) de séquences (Xiao *et al.*, 1998, 1999a,

1999b; Morgan et Thompson, 1998; Zhu *et al.*, 2000; Egyed *et al.*, 2003). Le séquençage de l'ADNr 18S a donc souvent été effectué et déposé dans des banques d'acides nucléiques.

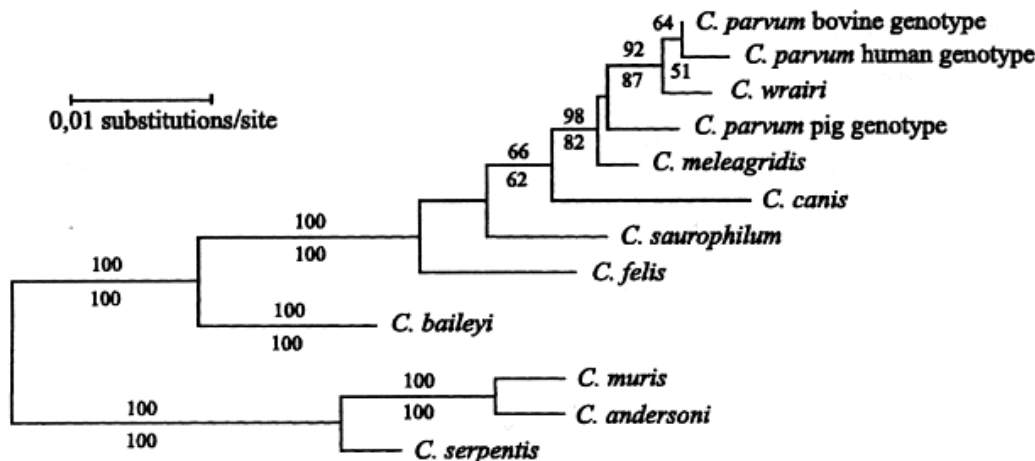


Figure 38 : Relation phylogénique, par l'algorithme du Neighbour Joining, entre les différentes espèces et « génotypes » de *Cryptosporidium* basée sur l'analyse de la séquence complète d'ADNr 18S. La barre d'échelle indique le nombre de substitutions par site (Egyed *et al.*, 2003).

Dans cette troisième partie, nous avons eu pour objectif de mettre au point un test quantitatif utilisant la technologie TaqMan après transcription inverse des ARNr 18S (TaqMan RT-PCR).

Les séquences d'ARNr 18S des différentes espèces de *Cryptosporidium* étant bien répertoriées, nous avons décidé de construire un premier test spécifique de l'ensemble du genre *Cryptosporidium* et un second test plus spécifique de l'espèce pathogène de l'homme *C. parvum*.

Une étape d'extraction-purification des ARN des oocystes de *Cryptosporidium* a tout d'abord été mise au point. La combinaison de l'étape de transcription inverse de l'ARN en ADNc (ADN complémentaire) et de l'amplification a été évaluée.

Le test TaqMan RT-PCR ainsi développé a été évalué sur des échantillons d'eau de réseau dopée en utilisant les étapes de purification validées précédemment.

2. Matériel et Méthodes

2.1. Solutions stocks d'oocystes et d'ADN de *Cryptosporidium*.

Des suspensions d'oocystes viables de *Cryptosporidium* ont été fournies par un laboratoire américain (Waterborne, USA) :

- des oocystes de *C. parvum* (isolat Iowa),
- des oocystes de *C. muris* (isola RN66).

Ces oocystes sont purifiés et conservés en suspension à +4°C dans une solution tampon salin phosphaté à 2,5% (PBS, phosphate-buffered saline). Ces suspensions sont fournies à des concentrations de 10^5.ml^{-1} pour *C. parvum* et de $2,5 \times 10^5 \text{.ml}^{-1}$ pour *C. muris*, concentrations déterminées par le fournisseur par comptage par hématocytométrie (cellule de Neubauer). **Afin d'assurer l'état « viable » des suspensions d'oocystes, celles-ci n'ont été utilisées, selon les recommandations du fabricant, que dans les 3 mois après réception.**

Des solutions d'ADN purifié des espèces de *Cryptosporidium* suivantes ont été obtenues auprès d'un laboratoire américain du CDC (L. Xiao, Centers for Disease Control and Prevention, USA) : *C. baileyi*, *C. andersoni*, *C. felis*, *C. wrairi*, *C. serpentis* et *C. meleagridis*.

2.2. Alignements de séquences d'ARN ribosomal 18S

Le gène codant pour l'ARNr 18S de diverses espèces de *Cryptosporidium* a été séquencé entièrement ou partiellement lors de nombreuses études scientifiques afin de pouvoir déterminer et positionner l'espèce étudiée.

Dans cette étude, nous avons répertorié l'ensemble des séquences (partielles ou complètes) des ARNr 18S de *Cryptosporidium* déposées sur Internet dans la base de données GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). Des alignements de ces séquences ont été effectués à l'aide du logiciel Genedoc afin de visualiser les domaines conservés

(homologues) du genre *Cryptosporidium* et les domaines spécifiques d'espèces. Ces alignements nous ont permis de comparer 69 séquences différentes de *Cryptosporidium*, à savoir :

- 38 espèces de *C. parvum*
- 4 espèces de *C. baileyi*
- 1 espèce de *C. wrairi*
- 4 espèces de *C. felis*
- 3 espèces de *C. meleagridis*
- 7 espèces de *C. muris*
- 6 espèces de *C. serpentis*
- 5 espèces « autres » ou non identifiées: *Cryptosporidium* K1 (koala), M24 (mouse), sp CSP06 (desert monitor), Pig 1, sp.

Chaque séquence est identifiée par un numéro correspondant à son numéro d'accès dans la base GenBank.

2.3. Choix des amorces et des sondes TaqMan

Afin de disposer de deux tests TaqMan RT-PCR, l'un ciblant toutes les espèces du genre *Cryptosporidium* et l'autre ciblant spécifiquement l'espèce *C. parvum*, deux couples d'amorces associées à une sonde TaqMan ont été choisis.

Le logiciel informatique Primer Express™ a permis de les sélectionner en répondant aux contraintes de paramètres nécessaires aux tests TaqMan PCR. Ces règles générales ont été précédemment décrites dans le chapitre II. Toutes les sondes et les amorces ont été synthétisées puis purifiées par HPLC par le laboratoire Applied Biosystems.

2.3.1 Test TaqMan RT-PCR ciblant le genre *Cryptosporidium*

Un couple d'amorces et une sonde TaqMan ont été sélectionnés **au niveau d'une région de l'ARNr 18S identifiée et conservée pour toutes les espèces de *Cryptosporidium*.**

2.3.2. Test TaqMan RT-PCR ciblant l'espèce *C. parvum*

Un couple d'amorces et une sonde ont été sélectionnés de façon à être **spécifiques de l'espèce *C. parvum*.**

Dans cette région riche en AT, **seule une sonde TaqMan-MGB a pu être adaptée** (Figure 39).

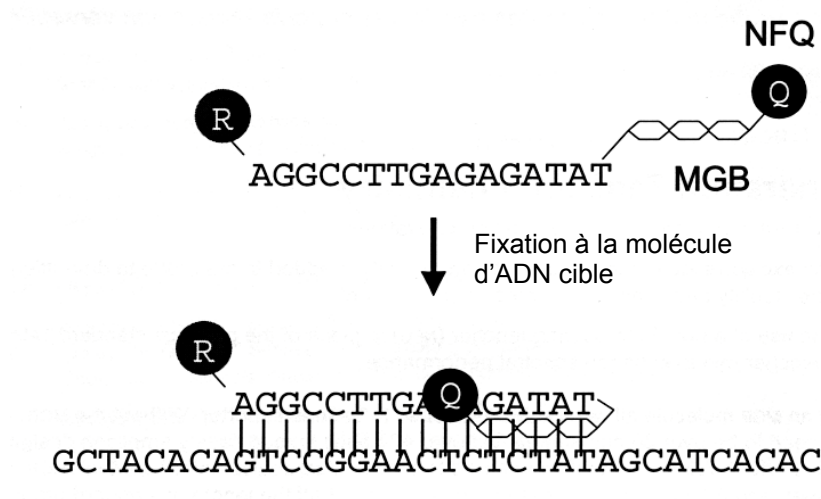


Figure 39 : Schématisation d'une sonde TaqMan-MGB (Applied Biosystems). R : fluorochrome émetteur ou Reporter, Q- NFQ : molécule « suppresser » (Quencher) Non-Fluorescente.

La sonde TaqMan-MGB a été commercialisée par les laboratoires d'Applied Biosystems en 2001.

Deux avantages caractérisent ce type de sonde :

- une molécule MGB (minor groove binder) est ajoutée à la sonde TaqMan. S'intercalant dans la double chaîne d'ADN, elle permet d'augmenter la stabilité et la spécificité d'hybridation des sondes. **L'incorporation de la molécule MGB permet aux sondes TaqMan d'être de taille plus petite** (longueur comprise entre 13 et 20 bases). Sans cette molécule, des sondes TaqMan choisies dans des séquences riches en AT ont souvent besoin d'avoir une longueur de 30 à 40 bases pour répondre aux contraintes de paramètres nécessaires pour obtenir un test TaqMan PCR,
- A l'extrémité 5', cette sonde possède un fluorochrome émetteur (Reporter) identique à une sonde TaqMan « classique ». A l'extrémité 3', cette sonde a tout d'abord la molécule MGB attachée, puis une molécule « supprimeur » (Quencher) non fluorescente (NFQ) au lieu d'un fluorochrome de type TAMRA. **Cette molécule « supprimeur » NFQ permet de diminuer la fluorescence basale du test TaqMan PCR.** Ainsi, les amplifications traduites à partir de la fluorescence du Reporter sont interprétées plus facilement.

La sonde TaqMan-MGB que nous avons sélectionnée a été marquée en 5' par le fluorochrome émetteur ou Reporter : FAM (6-carboxyfluorescein).

La spécificité du test pour *C. parvum* a été vérifiée expérimentalement sur des oocystes et de l'ADN de différentes espèces de *Cryptosporidium*.

2.4 Préparation de l'échantillon

La Figure 40 résume l'ensemble du protocole d'extraction d'ARN.

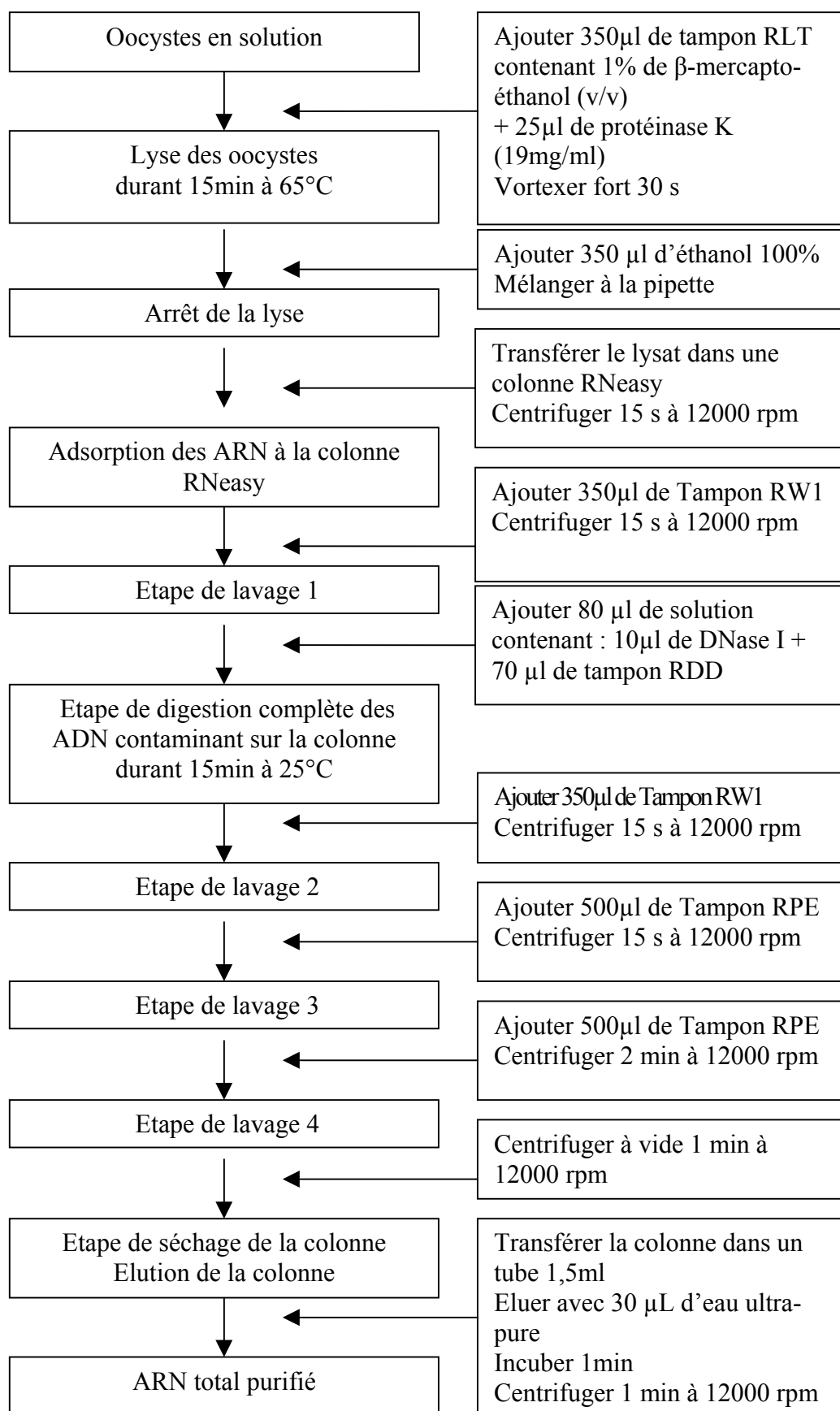


Figure 40 : Extraction et purification d'ARN à l'aide du kit de purification d'ARN total RNeasy® (Qiagen S.A., Courtaboeuf, France).

2.4.1. Lyse des oocystes et Extraction de l'ARN

L'ARNr 18S contenu dans les oocystes est extrait par l'utilisation et l'adaptation d'un kit de purification d'ARN total RNeasy® (Qiagen S.A., Courtaboeuf, France). **Le principe de ce kit est basé sur la fixation spécifique des ARN sur des colonnes en gel de silice suivi de différents lavages par centrifugation.**

Les oocystes sont lysés chimiquement à l'aide d'un tampon de lyse chimique dénaturant basé sur le thiocyanate de Guanidium fourni dans le kit.

Une optimisation de cette étape a été effectuée par ajout d'une lyse enzymatique. Vingt-cinq microlitres de protéinase K (600 U.ml^{-1} , Roche Diagnostics, Meylan, France) sont ajoutés et incubés avec les suspensions d'oocystes durant 10 minutes à 65°C . La purification et les étapes de lavage ont ensuite été appliquées selon le protocole du fournisseur.

Les ARN ont été élués par $30\mu\text{l}$ d'eau PCR (ultra pure, sans nucléase). Sept microlitres d'ARN élués ont été utilisés pour l'étape de transcription inverse.

2.4.2. Traitement DNase

Une étape de digestion des ADN a été ajoutée dans le protocole d'extraction d'ARN par l'utilisation d'une DNase directement déposée sur la colonne d'extraction RNeasy® (RNase-free DNase set, Qiagen, France). Cette étape permet d'éliminer complètement et directement l'ADN contaminant éventuellement présent.

2.4.3. Validation de l'extraction des ARN totaux extraits

Afin de valider la pureté de l'ARN extrait, un traitement avec 1U par $10 \mu\text{l}$ de RNase durant 15 min à 42°C (Invitrogen SARL, Cergy Pontoise, France) a été effectué sur les solutions d'ARN purifiés par RNeasy® lors de la mise au point du test.

2.5. Test TaqMan RT-PCR

2.5.1. Transcription inverse

Les ARN sont rétro-transcrits en ADNc par l'intermédiaire d'une transcription inverse. Cette manipulation est effectuée dans des tubes réactionnels de 18µl (volume final) préparés à partir des réactifs, selon la composition du Mix détaillé dans le Tableau XXVII (Applied Biosystems, Courtaboeuf, France).

Composants	Concentrations finales
Tampon: TaqMan RT Buffer	1 X
chaque dNTP	500 µM
MgCl ₂	5,5 mM
Amorces : Random hexamers	2,5 µM
Inhibiteur de RNase	0,4 U.µl ⁻¹
Enzyme Multiscribe reverse transcriptase	1,25 U.µl ⁻¹

Tableau XXVII : Composition des Mix de transcription inverse

Un volume de 7µl d'ARN purifié est ajouté par tube réactionnel. Les conditions de la transcription inverse sont résumées dans le Tableau XXVIII.

Durée	Température	Fonction
10 min	25°C	Période d'incubation
30 min	48°C	Transcription inverse
5 min	95°C	Inactivation de la Reverse Transcriptase

Tableau XXVIII : Conditions d'amplification en TaqMan PCR.

Cette transcription inverse s'effectue dans un appareil GeneAmp 9700 amplification system (Applied Biosystems). Des contrôles négatifs ne contenant pas d'ARN sont systématiquement effectués en parallèle.

2.5.2 Amplification des ADNc en TaqMan RT-PCR

La composition du mélange réactionnel en concentrations finales pour l'amplification est résumé dans le Tableau XXIX (volume final=50µl).

Composants (Applied Biosystems)	
Master Mix	1X Tampon ROX
	200 µM de chaque dATP, dCTP et dGTP
	400 µM de dUTP
	0,5 U d'Uracil- <i>N</i> -glycosidase (UNG)
	1 U AmpliTaq Gold DNA polymérase,
	5 mM MgCl ₂
+	MgCl ₂ supplémenté (pour obtenir une concentration finale de 6mM)
+	200 nM de Sonde TaqMan ou TaqMan-MGB
+	300 nM de chaque amorce
+	0,2 µl d'HCl

Tableau XXIX : Mix réactionnel d'amplification

La totalité du volume réactionnel de la transcription inverse (18µl) est ajouté au Mix de PCR (volume final de 50 µl). Des contrôles négatifs sans oocyste ni ADN cible (remplacé par de l'eau PCR stérile) ont été amplifiés en parallèle pour chaque série.

Les conditions d'amplification sont résumées dans le Tableau XXX

Nombre de cycles	Durée	Température	Fonction
1 cycle	2 min	50°C	Activation de l'UNG
1 cycle	10 min	95°C	Activation de l'AmpliTaq Gold
40 cycles	15 s	95°C	Cycles d'amplification (dénaturation-élongation)
	1 min	60°C	

Tableau XXX: Conditions d'amplification en TaqMan PCR.

L'amplification et la détection s'effectuent dans l'appareil ABI Prism® 7700 Sequence Detection System (Applied Biosystems, France). Les données de la PCR sont analysées par le logiciel Sequence Detector.

2.6. Adaptation du test à des échantillons d'eau

2.6.1. Dopages d'échantillons d'eau

Des échantillons d'eau de réseau (robinet, 20 l) ont été filtrés et dopés simultanément avec des suspensions d'oocystes préalablement quantifiées à 843 et $8,4.10^3$ *C. parvum*, selon le protocole décrit dans le chapitre III.

2.6.2. Capture par IMS

Une capture spécifique des oocystes de *Cryptosporidium* est réalisée selon le principe de séparation immuno-magnétique, comme décrit précédemment dans le chapitre III.

En fin de purification, les oocystes fixés aux billes magnétiques sont récupérés dans 20µl d'eau ultra-pure et soumis à la lyse des oocystes et extraction de l'ARN total. Sept microlitres du volume d'élution obtenu ont été rétro-transcrits. L'ensemble du volume réactionnel de la transcription inverse a été amplifié en TaqMan PCR.

2.6.3. Gamme étalon de référence

L'amplification d'une gamme de dilutions d'oocystes de *C. parvum* a permis d'évaluer la sensibilité du test TaqMan RT-PCR ou d'évaluer le pourcentage de récupération en oocystes après dopage d'échantillons d'eau.

Les ARN totaux ont donc été extraits et purifiés à partir de suspensions d'oocystes diluées au dixième à l'aide du kit RNeasy. Sept microlitres du volume d'élution obtenu ont été rétro-transcrits. L'ensemble du volume réactionnel de la transcription inverse a été amplifié en TaqMan PCR.

3. Résultats

3.1. Alignements des séquences d'ARNr 18S

Deux régions ont été sélectionnées pour la construction des tests TaqMan RT-PCR :

- la première, représentée dans la Figure 41, est une région conservée entre toutes les espèces de *Cryptosporidium*,
- la seconde, représentée dans la Figure 42, est une région hyper-variable entre les différentes espèces de *Cryptosporidium*.

La légende des Figure 41 et Figure 42 est décrite Tableau XXXI.

•	la base séquencée est identique à la base de la première ligne	
-	la base n'est pas connue (partie du gène non séquencée)	
Colonne jaune	séquence des amorces sélectionnées	
Colonne rose	séquence des sondes sélectionnées	
Colonne bleue	Autre séquence conservée de <i>C. parvum</i>	
N° de séquence dans Genbank :		
de AF040725 à AF 164102	turquoise	38 espèces de <i>C. parvum</i>
de AF093495 à AJ276096	vert	4 espèces de <i>C. baileyi</i>
de AF115378	rose clair	1 espèce de <i>C. wrairi</i>
de AF087577 à AF112575	orange	4 espèces de <i>C. felis</i>
de AF112574 à CME242472	bleu	3 espèces de <i>C. meleagridis</i>
de AF093476 à L19079	jaune	7 espèces <i>C. muris</i>
de AF093499 à AF108866	marron	6 espèces <i>C. serpentis</i>
de AF099666 à AF108860	fuchsia	5 espèces « autres » ou non identifiées: <i>Cryptosporidium K1</i> (koala), <i>M24</i> (mouse), <i>sp CSP06</i> (desert monitor), <i>Pig 1</i> , <i>sp.</i>

Tableau XXXI : Légende des Figure 41 et Figure 42

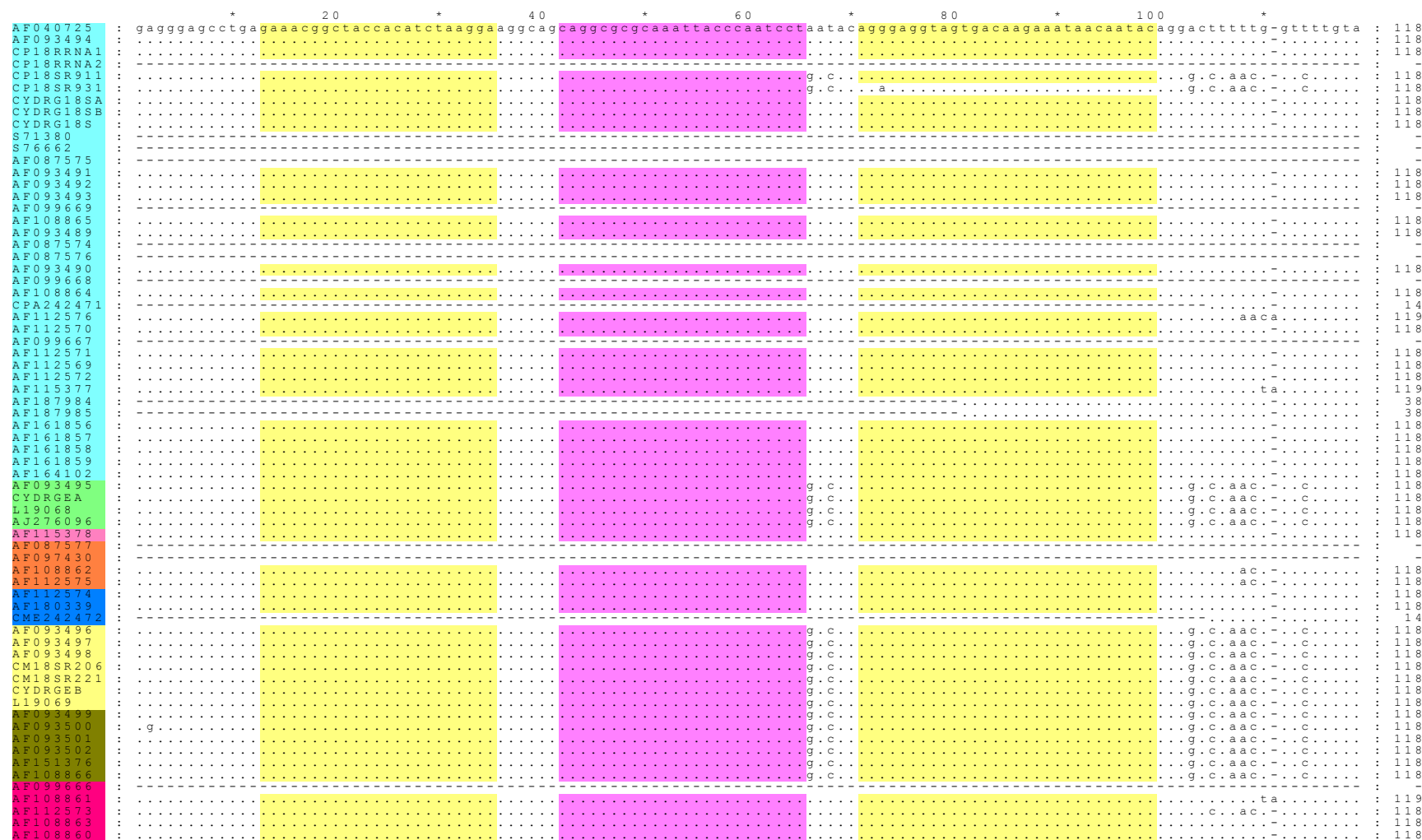


Figure 41 : Définition du couple d'amorces et de la sonde TaqMan spécifiques au genre *Cryptosporidium*.

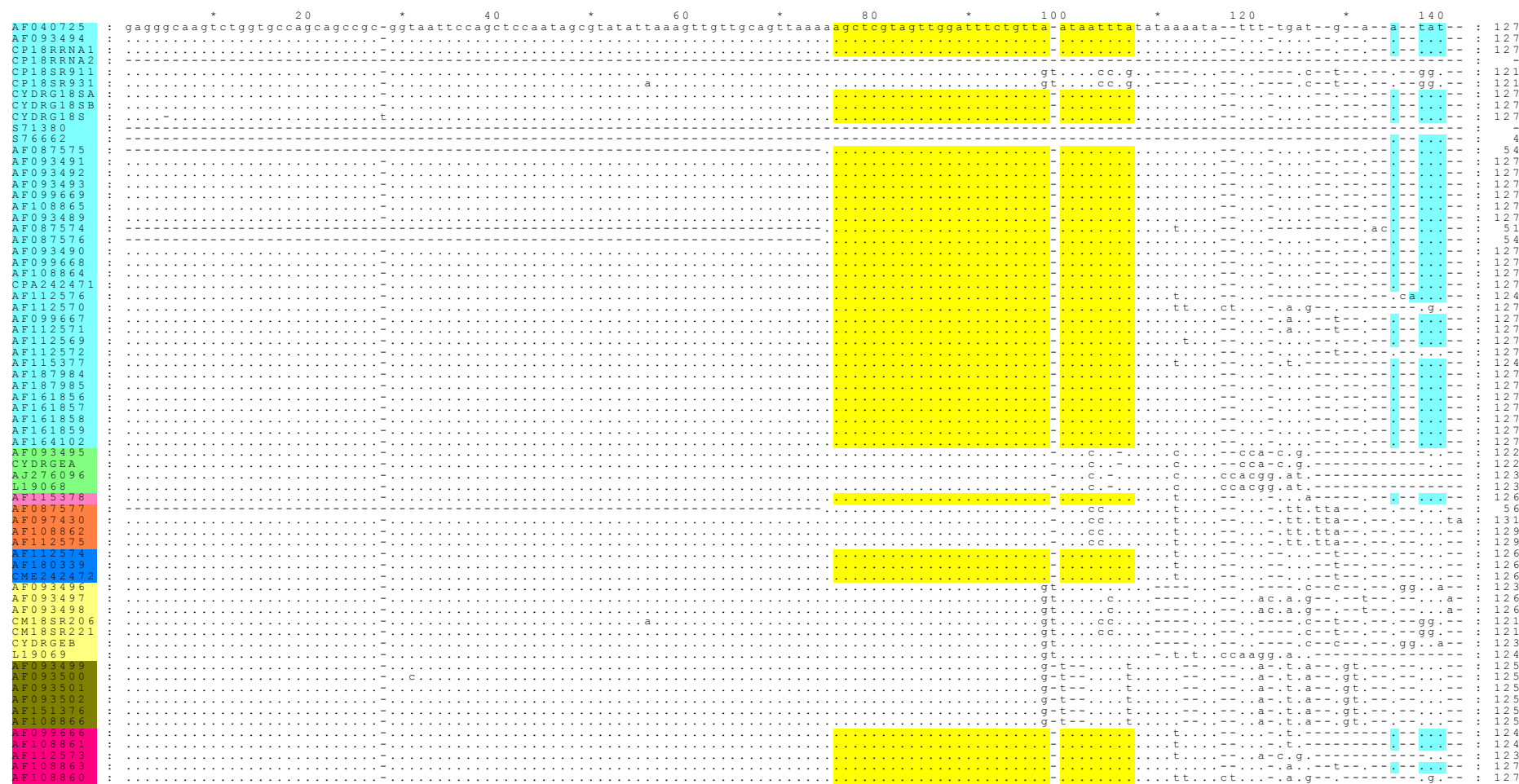


Figure 42 : Définition du couple d'amorces et de la sonde TaqMan spécifiques de l'espèce *C. parvum* .

3.2. Choix des amorces et des sondes TaqMan

La région très conservée entre les espèces de *Cryptosporidium* a été utilisée pour sélectionner, à l'aide du logiciel Primer Express™, les amorces et la sonde du test TaqMan RT-PCR spécifiques du genre *Cryptosporidium*.

Les amorces font 23 et 29 paires de bases chacune et la sonde TaqMan fait 24 paires bases, l'ensemble amplifiant un fragment de 88 paires de bases.

Le Tableau XXXII présente les amorces et la sonde retenue.

	Position	Séquence
Couple d'amorces <i>Cryptosporidium</i>	F : 380-402	5'- GAAACGGCTACCACATCTAAGGA-3'
	R : 438-466	5'-GTATTGTTATTTCTTGTCACCTCCCT-3'
Sonde TaqMan	409-433	CAGGCGCGCAAATTACCCAATCCT

Tableau XXXII : Sondes et amorces retenues pour le test TaqMan RT-PCR spécifique au genre *Cryptosporidium*.

Soixante-seize paires bases sur les 88 pb au total sont donc hybridées lors de l'amplification en TaqMan PCR conférant à ce test une importante spécificité vis-à-vis du parasite *Cryptosporidium*. Ce couple d'amorces et la sonde associée peuvent être visualisés à la Figure 41.

La région hyper-variable entre les espèces de *Cryptosporidium* a été utilisée pour sélectionner les amorces et la sonde du test TaqMan RT-PCR spécifique de l'espèce *C. parvum*.

Cette région d'environ 200 pb seulement est assez courte et elle est très riche en AT. Aussi, aucune sonde TaqMan n'a pu être adaptée (T_m trop faible ou sonde trop longue pour avoir un T_m de 10°C supérieur aux amorces comme le nécessite un test « classique »). **Une sonde TaqMan-MGB a pu être adaptée.**

Aucun couple spécifique de *C. parvum* uniquement n'a pu être sélectionné. D'après les séquences disponibles alignées, *C. meleagridis* n'a pu être différencié de *C. parvum* au niveau de cette région.

La Figure 42 montre la position **des amorces sélectionnées de 31 et 24 pb chacune** (en jaune) et de **la sonde TaqMan-MGB de 20 pb** sélectionnée (en rose). L'ensemble amplifie un fragment de 145 paires de bases.

Le Tableau XXXIII décrit les séquences des amorces et des sondes du test spécifique de *C. parvum*.

	Position	Séquence
Couple d'amorces <i>C. parvum</i>	F: 602-632	5'-AGCTCGTAGTTGGATTCTGTGAATAATTTA-3'
	R: 723-746	5'-GCATATGCCTGCTTTAAGCACTCT-3'
Sonde TaqMan-MGB	702-722	TTTCTCAAAGTAAAATTTC

Tableau XXXIII : Récapitulatif des amorces et sondes retenues.

*Deux couples d'amorces et de sondes TaqMan RT-PCR ont été sélectionnés sur les ARNr 18S permettant théoriquement de développer deux tests, l'un spécifique du genre *Cryptosporidium*, l'autre spécifique des espèces *C. parvum* et *C. meleagridis*.*

3.3. Vérification de la spécificité des tests TaqMan RT-PCR sélectionnés.

La spécificité des sondes et amorces sélectionnées dans la région conservée de l'ARNr18S des espèces de *Cryptosporidium* a été vérifiée par des amplifications en TaqMan-PCR des ADN ribosomiques 18S de différentes espèces appartenant au genre *Cryptosporidium*.

La Figure 43 présente les résultats obtenus avec le couple d'amorces et la sonde retenus pour le test spécifique au genre *Cryptosporidium*. Faute de matériel génétique suffisant, nous n'avons pu faire la manipulation qu'en une seule fois et uniquement pour les espèces *C. parvum*, *C. meleagridis*, *C. baileyi* et *C. muris*.

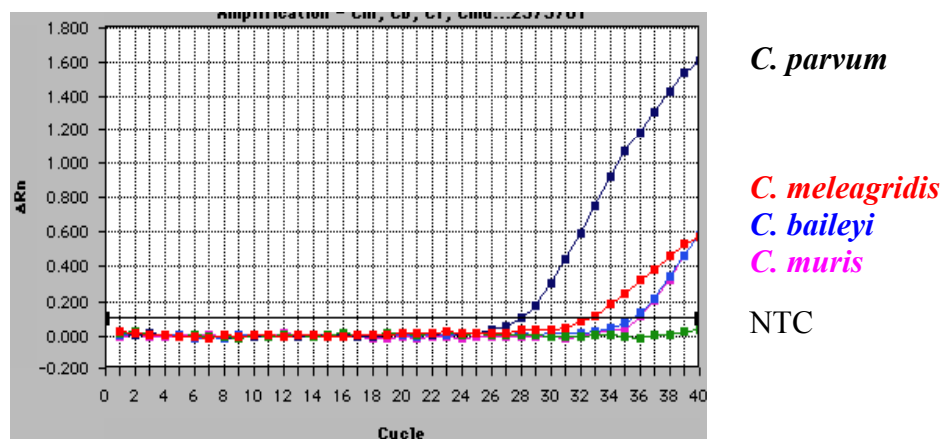


Figure 43 : Amplifications obtenues sur différentes espèces de *Cryptosporidium* pour le test TaqMan RT-PCR « *Cryptosporidium* Genre ».

Les amplifications obtenues montrent que le test TaqMan RT-PCR spécifique du genre *Cryptosporidium* reconnaît les espèces *C. parvum*, *C. meleagridis*, *C. baileyi* et *C. muris* testées.

Le « retard » d'amplification observé pour les espèces autres que *C. parvum* est dû aux quantités initiales d'ADNr plus faibles (quantités non connues).

La Figure 44 présente les résultats obtenus avec le couple d'amorces et la sonde retenus pour le test spécifique aux espèces *Cryptosporidium parvum* et *C. meleagridis*.

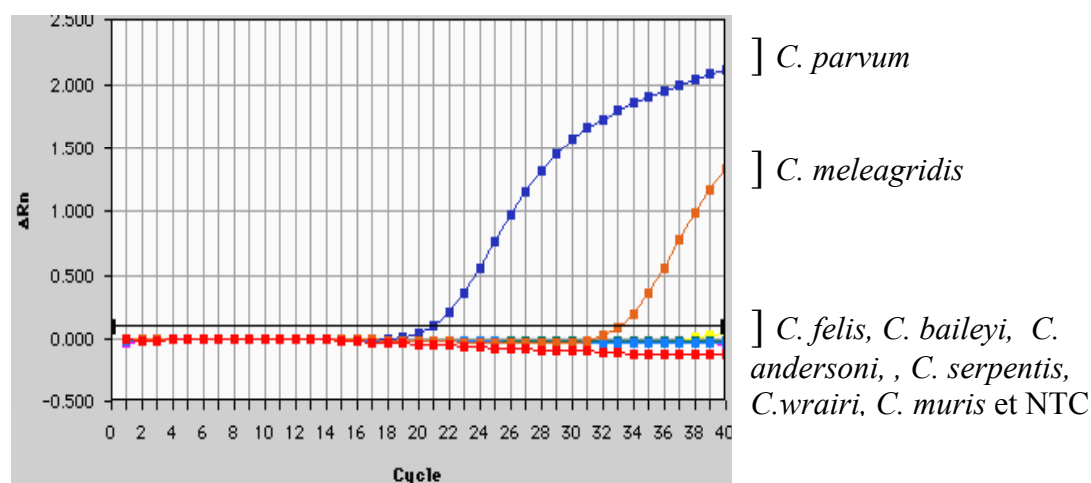


Figure 44 : Spécificité du test TaqMan RT-PCR pour l'amplification de différentes espèces de *Cryptosporidium*.

Les amplifications obtenues ont montré que seules les espèces *C. meleagridis* et *C. parvum* ont réagi avec les amorces et la sonde TaqMan-MGB sélectionnées. Aucune amplification n'a été observée avec les espèces *C. baileyi*, *C. andersoni*, *C. felis*, *C. wrairi*, *C. serpentis* et *C. muris*.

La spécificité déterminée précédemment par les alignements de séquences des ARNr 18S a été vérifiée expérimentalement pour les 2 tests envisagés

3.4. Validation de la lyse et de l'extraction des ARN par le kit RNeasy®.

Des tests TaqMan RT-PCR ont été effectués sur des ARN totaux extraits à partir de suspensions de 10^3 oocystes de *C. parvum*, par RNeasy® mini kit (les ARN ayant été rétro-transcrits en ADNc).

Afin de vérifier l'absence de résidus d'ADN, des tests en TaqMan PCR ont été effectués en parallèle. De plus, par ajout d'un traitement RNase après extraction des ARN, nous avons vérifié que seul l'ARN cible (et non de l'ARN contaminant) est amplifié par ce test TaqMan RT-PCR.

Trois répliques pour chaque test ont été réalisées. Le couple d'amorces et la sonde spécifique de l'espèce *C. parvum* (sonde TaqMan-MGB) ont été utilisés pour les amplifications. Un témoin positif d'amplification contenant de l'ADN ou de l'ARN total de *C. parvum* ont été amplifiés en parallèle pour les amplifications PCR et RT-PCR respectives. Les résultats obtenus sont résumés dans le Tableau XXXIV.

	RNeasy®-DNase	RNeasy®-DNase + RNase	Témoin positif
TaqMan PCR	-	-	+
TaqMan RT-PCR	+	-	+

Tableau XXXIV : Amplifications obtenues après extraction des ARN. Le traitement DNase est systématiquement intégré dans l'extraction par RNeasy®. Le traitement RNase a été ajouté avant l'amplification.

Les résultats obtenus ont permis d'observer que l'extraction RNeasy® associée au traitement DNase n'a donné d'amplification qu'en TaqMan RT-PCR.

Ainsi, nous pouvons en déduire que nos solutions d'élution des colonnes RNeasy® ne contenaient que de l'ARN. **Aucun résultat faux-positif en TaqMan PCR dû à la présence d'ADN contaminant n'a été observé.**

Le traitement RNase suivant cette purification n'a donné aucune amplification. Aucune contamination éventuelle après purification (lors de l'étape de transcription inverse par exemple) n'a été observée.

Ainsi, seuls les ARNr 18S issus des suspensions d'oocystes sont extraits et amplifiés par ce test TaqMan RT-PCR.

La lyse des oocystes puis l'extraction par RNeasy®-DNase permettent de purifier efficacement les ARN des Cryptosporidium. Le test TaqMan RT-PCR développé amplifie les ARNr 18S uniquement.

3.5. Sensibilité du test et gamme d'amplification TaqMan RT-PCR.

L'amplification d'une gamme de dilutions d'oocystes de *C. parvum* a permis d'évaluer la sensibilité du test TaqMan RT-PCR. Des suspensions de $8,4 \cdot 10^3$ à 5 oocystes ont été soumises à une lyse et une extraction d'ARN totaux par RNeasy®. Quatre répliques pour chaque dilution ont été effectuées. Trente micro-litres d'eau ultra-pure ont permis d'éluer les ARN fixés sur la colonne et 7 µl de cette solution d'élution ont été prélevés et ont subi une transcription inverse. La totalité des ADNc ainsi obtenus ont été amplifiés par TaqMan RT-PCR en utilisant le test *C. parvum* spécifique (sonde TaqMan-MGB).

La Figure 45 montre les courbes d'amplification obtenues pour la gamme de dilutions en série d'oocystes.

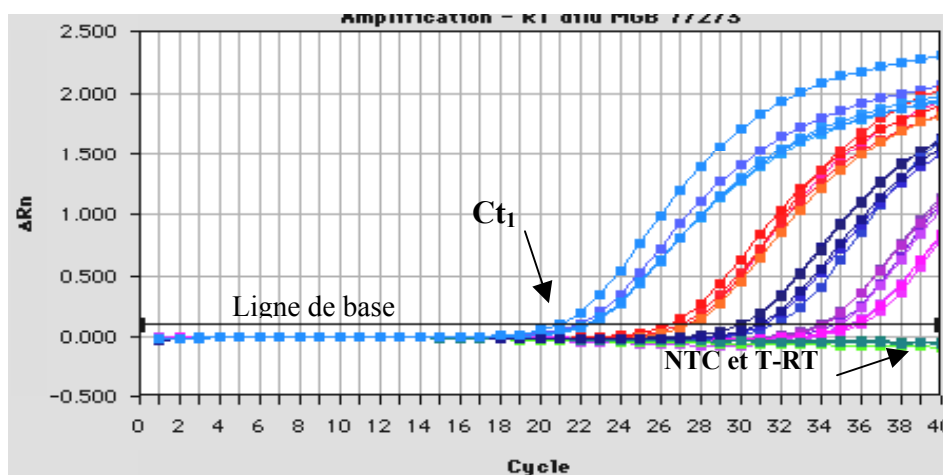


Figure 45 : Amplification d'une gamme d'oocystes de *C. parvum* correspondant à des dilutions au dixième de 8.4×10^3 à 5 oocystes. Pour chaque dilution, quatre répétitions ont été effectuées ($n=4$; $r^2=0,98$).

Les contrôles négatifs de transcription inverse (T-RT) et d'amplification (NTC) sont négatifs.

La ligne de base de détection de la fluorescence (threshold), déterminée à 0,1, a permis d'obtenir une valeur de C_t pour chaque amplification. Une gamme étalon a été générée à partir des courbes d'amplification obtenues reliant les C_t à la quantité initiale d'oocystes de *C. parvum* présents (Figure 46).

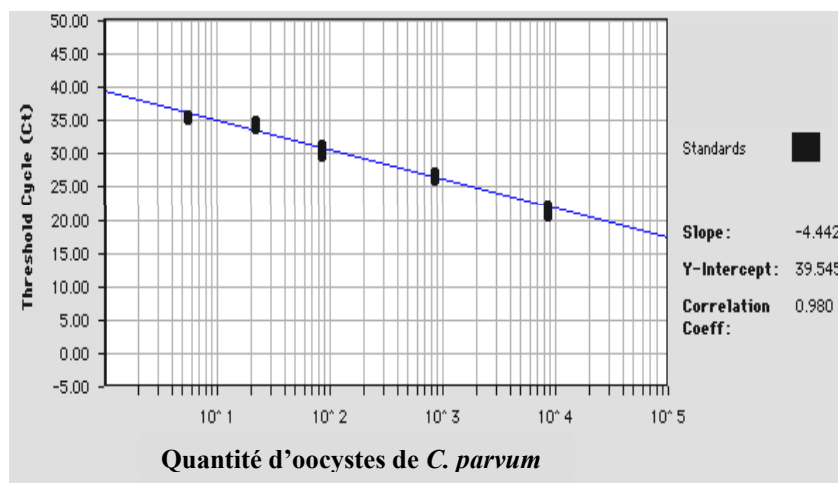


Figure 46 : Gamme étalon résultant des amplifications par TaqMan RT-PCR

La gamme étalon obtenue est **linéaire sur les 4-log testés. La pente obtenue est de 1,929. Le coefficient de corrélation de 0,98** montre que pour chaque quantité initiale d'oocystes, une même quantité d'ARNr 18S a été extraite.

A partir de la pente obtenue, l'efficacité d'amplification a été déterminée par l'utilisation de la formule $E = 10^{-1/s} - 1$ où s est la pente de la gamme étalon. Le résultat de cette **efficacité a été calculé à 0,68. Le seuil de quantification est de 5 oocystes.**

Une gamme, amplifiée dans des conditions identiques, a été obtenue avec les amorces et la sonde sélectionnées pour le test spécifique du genre *Cryptosporidium*. **Des résultats identiques ont été obtenus.**

3.6. Influence de l'addition de l'étape d'IMS au test TaqMan RT-PCR

Une gamme de dilution en série de suspensions purifiées d'oocystes de *C. parvum* allant de 5 à $8,4 \cdot 10^3$ oocystes a subi une étape de séparation immuno-magnétique (IMS) avant un traitement de lyse et une extraction d'ARN par l'utilisation du kit RNeasy®. Après transcription inverse des ARN obtenus, les tubes ont été amplifiés en TaqMan RT-PCR. Trois IMS par dilution ont été effectuées.

Parallèlement, nous avons effectué en trois répliques :

- une amplification par TaqMan RT-PCR d'une même gamme de dilution en série de suspensions d'oocystes de *C. parvum* sans traitement IMS,
- une amplification en TaqMan PCR (sans transcription inverse au préalable) après lyse par chocs thermiques des oocystes d'une même gamme de dilutions en série de suspensions d'oocystes de *C. parvum*.

La ligne de base de détection de la fluorescence (threshold) est déterminée à 0,1.

La Figure 47 présente les deux gammes de dilution générées reliant les Ct obtenus à la quantité initiale d'oocystes de *C. parvum* présents.

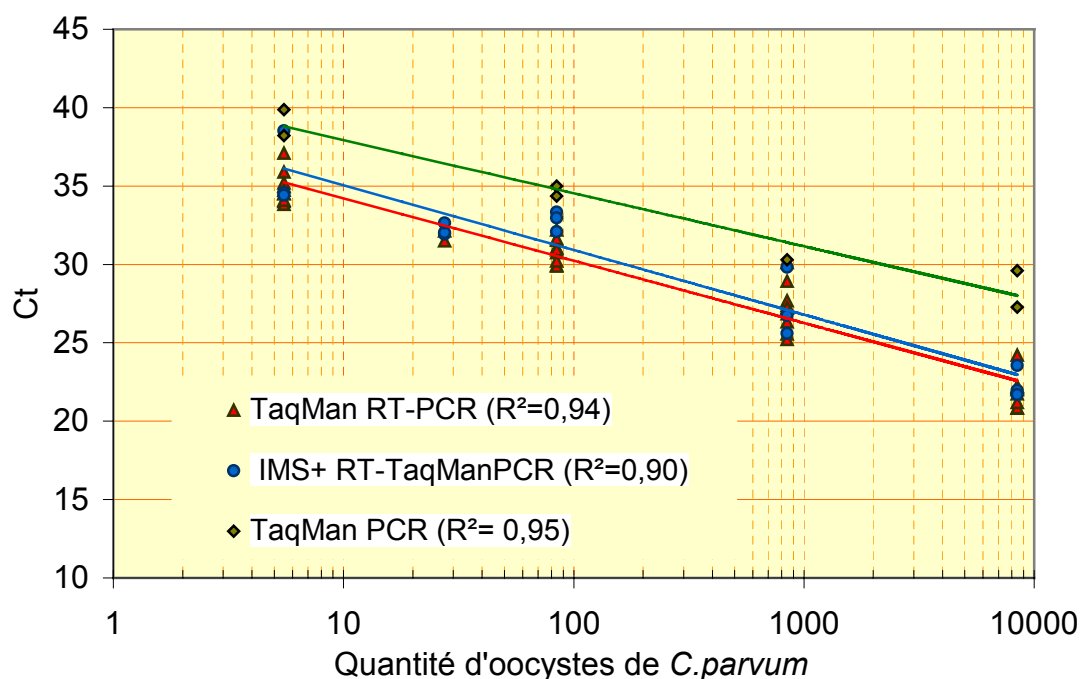


Figure 47 : Gammes d'amplification obtenues

Une réponse linéaire a été obtenue pour chaque expérience. La droite obtenue après IMS-TaqMan RT-PCR (droite bleue) est légèrement au-dessus de celle générée en TaqMan RT-PCR (droite rouge). Les équations de ces deux droites sont les suivantes :

- $y = -1,7929\text{Ln}(x) + 39,176$ pour la gamme IMS-TaqMan RT-PCR
- $y = -1,7265\text{Ln}(x) + 38,19$ pour la gamme TaqMan RT-PCR.

Ainsi, un pourcentage de récupération de 84,0 % a été calculé après IMS sur une moyenne globale pour les 15 essais testés (5 concentrations, $n=3$), soit 16% de perte en oocystes. L'efficacité des pentes obtenues est respectivement de 0,75 et 0,78.

En comparaison, la gamme TaqMan PCR obtenue par l'amplification des ADNr 18S a obtenu une pente de 1,47 et un coefficient de corrélation de 0,95 (droite verte). Le nombre de copies d'ADNr étant bien plus faible que la quantité d'ARNr 18S, cette droite se situe bien au-dessus des deux autres.

3.7. Analyse en TaqMan RT-PCR d'échantillons d'eau dopés

Des échantillons de 20l d'eau de réseau ont été dopés avec des quantités de 843 et 8433 oocystes. Trois répliques par quantité ont été analysées par TaqMan RT-PCR.

La quantité d'oocystes récupérés a été déduite des Ct obtenus après amplification par l'utilisation d'une gamme étalon TaqMan RT-PCR amplifiée en parallèle.

Le pourcentage de récupération en oocystes a été calculé (Tableau XXXV).

Quantité initiale d' oocystes (moy)	Nombre de répliques	Ct obtenus (moy)	Nombre d'oocystes quantifiés (moy)	Pourcentage d'oocystes récupérés
843	3	27,43 ± 1,08	575,7 ± 339,3	68,3 ± 40,2
8433	3	23,19 ± 0,78	6313,3 ± 2626,5	74,9 ± 31,1

Tableau XXXV : Quantités d'oocystes de *C. parvum* récupérées après dopages d'eau du robinet (20l)

Par ces résultats, nous pouvons observer que les moyennes des taux de récupération obtenus pour des quantités initiales de dopages en oocystes de 843 et 8433 sont d'environ 70% avec un écart-type d'environ 35%.

4. Discussion-Conclusion

La viabilité est un aspect important pour des échantillons environnementaux tels que l'eau, puisque de nombreux oocystes présents peuvent être morts ou abîmés et ne présentent donc aucun danger. La TaqMan PCR offre les avantages de pouvoir quantifier spécifiquement une espèce de *Cryptosporidium* dans un échantillon. L'adaptation de cette technologie TaqMan à la détection des ARN de *Cryptosporidium* pourrait alors permettre de renseigner sur l'état physiologique des oocystes.

Dans cette troisième partie de l'étude, nous avons choisi d'aligner toutes les séquences d'ARNr 18S des différentes espèces de *Cryptosporidium* actuellement disponibles sur la base internet GeneBank et ce, afin de pouvoir les comparer et de disposer de deux tests spécifiques TaqMan RT-PCR :

- le premier test cible une séquence commune à toutes les espèces de *Cryptosporidium*,
- le second test se situe dans une seule région hyper-variable entre les espèces de *Cryptosporidium*.

Pour le premier test, la sélection des sondes et amorces n'a posé aucun problème particulier sachant que nous disposions de plusieurs régions conservées. Par contre, la séquence de la région hyper variable étant à la fois courte et très riche en bases A et T, l'unique possibilité de développer un second test TaqMan RT-PCR plus spécifique a été d'utiliser une sonde TaqMan-MGB.

L'utilisation d'un conjugué MGB (minor groove binder) associé à une séquence nucléotidique existait déjà en PCR classique (Afonina *et al.*, 1997) pour les amorces d'amplification. En effet, chez les virus possédant d'importants degrés de variation au niveau de leurs séquences (notamment chez le virus HIV), les amorces ont besoin d'être très courtes et par conséquent d'être stabilisées par ce conjugué MGB.

Lors du développement de la TaqMan PCR, cette même équipe de scientifiques a adapté ce conjugué MGB non pas aux amorces mais aux sondes TaqMan dans le but d'obtenir des amplifications encore plus spécifiques et sensibles (Kutyavin *et al.*, 2000 ; Afonina *et al.*, 2002). Très innovantes, ces sondes TaqMan-MGB, commercialisées en

2002, sont encore peu utilisées mais semblent très prometteuses. Elles peuvent être utilisées non seulement lors d'amplification en TaqMan PCR classiques mais elles peuvent aussi mettre en évidence un type de mutation par hybridation ou non de la sonde lors de l'amplification en TaqMan PCR. Dans ce dernier exemple, elles permettent de remplacer une application de type PCR-RFLP (de Kok *et al.*, 2002).

Dans notre test, l'utilisation de la sonde TaqMan-MGB a permis à la fois de disposer d'une sonde de séquence courte et de pouvoir s'hybrider dans la séquence riche en A et en T à l'intérieur de la région hyper-variable de l'ARNr 18S. Sans l'existence de ce type de sonde, il aurait été impossible de construire un test spécifique de *C. parvum* au niveau de l'ARNr 18S. En effet, les tests existants spécifiques de *C. parvum* basés uniquement sur une amplification par PCR de l'ARNr 18S ont toujours nécessité l'ajout d'une RFLP ou d'une amplification par Nested PCR pour valider la spécificité envers *C. parvum* (Zhu *et al.*, 1998; Rochelle *et al.*, 1999).

La spécificité de notre test a été conférée par la sonde mais aussi par les amorces sélectionnées. L'observation des séquences alignées a de suite montré qu'il existerait une amplification croisée avec l'espèce *C. meleagridis*. Ces deux espèces étant très proches génétiquement, aucun positionnement de sonde et/ou d'amorces n'a permis de les différencier sans amplifier du même coup les autres espèces. Une équipe scientifique anglaise (Pedraza-Diaz *et al.*, 2001) a particulièrement étudié *C. meleagridis*. D'après leurs travaux, cette espèce, indifférenciée de *C. parvum* sous microscope ou par IMS, est génétiquement différente seulement au niveau de 4 locus. Cependant, comme *C. parvum*, *C. meleagridis* peut être la cause d'infections humaines. Cette double spécificité, confirmée expérimentalement par les courbes d'amplification obtenues pour ces deux espèces, permet une nouvelle fois d'assurer une protection plus large du consommateur.

Les résultats des amplifications obtenus pour les deux tests développés ont été d'emblée satisfaisants (ΔR_n supérieurs à 1, profils satisfaisants...) avec les conditions d'amplification mises au point sur oocystes pour le test TaqMan PCR (chapitre II). Afin de pouvoir dans le futur combiner ces 2 tests, nous avons trouvé intéressant d'utiliser les mêmes conditions d'amplification et, pour cette raison, nous n'avons pas cherché à optimiser les concentrations en amorces, sonde ou $MgCl_2$.

Il est important de noter que les méthodes de RT-PCR sont souvent critiquées pour leurs nombreux inconvénients (Quintero-Betancourt *et al.*, 2002), à savoir :

1. les inefficacités d'extraction des ARN des oocystes,
2. les interférences lors de l'amplification avec les constituants environnementaux ou enzymatiques,
3. la nature non-quantitative du test,
4. la nécessité de travailler avec de petits volumes.

Or, l'ensemble des résultats obtenus lors de cette étude a prouvé le contraire puisqu'un test de routine fiable pour la quantification des ARN 18S de *Cryptosporidium* a pu être mis au point.

➤ Concernant l'extraction d'ARN, les colonnes RNeasy® se sont révélées très efficaces et ont, contrairement aux colonnes de purification d'ADN QIAamp®, relargué les ARN de façon reproductible.

Ce type de purification a été choisi pour son efficacité rapportée. En effet, comparé à un autre kit de purification d'ARN: SV total RNA Isolation System (Promega, USA), cette purification avait déjà obtenu de meilleurs rendements en récupération et en pureté des ARN extraits pour des suspensions de *Clostridium* (Nuyts *et al.*, 2001). De plus, ce type d'extraction présente l'avantage d'éliminer toute utilisation laborieuse et toxique des solvants organiques utilisés dans de multiples protocoles d'extraction et de précipitation.

La sensibilité du test équivalente à 5 oocystes a permis de démontrer l'efficacité du protocole d'extraction d'ARN utilisé sachant notamment que seulement un quart du volume d'élution des colonnes RNeasy® a été amplifié. Cette sensibilité est identique à celle observée dans nos précédents tests développés en TaqMan PCR (Fontaine et Guillot, 2002). Cette efficacité d'extraction est peut être due à la rapide inhibition ou élimination des RNases intracellulaires des oocystes lors des étapes de lyse puis de purification des ARN. En effet, après mort des oocystes, les ARNr 18S ont apparemment une demi-vie très courte due à la présence de RNases intracellulaires permettant leur rapide dégradation (Vesey *et al.*, 1995; Quintero-Betancourt *et al.*, 2002). Ces résultats sont comparables à ceux d'une autre étude ayant eu de très bonnes performances pour la purification d'ARN viral par l'utilisation des colonnes RNeasy® en terme de sensibilité

(une détection limite de deux-trois copies d'ARN extrait a été obtenue) et de reproductibilité (Fischer *et al.*, 1999).

➤ Les tests d'amplification complémentaires effectués après traitement à la RNase ont permis de démontrer que seul l'ARNr 18S est amplifié par le test TaqMan RT-PCR développé et qu'aucune contamination bactérienne n'a pu être observée.

En effet, l'ARNr possède des séquences très conservées pouvant être retrouvées chez d'autres micro-organismes et il n'est pas rare d'obtenir en RT-PCR des amplifications contaminantes issues des produits utilisés lors des étapes précédentes. Les différentes enzymes utilisées lors de la purification, de la transcription inverse ou de la polymérisation telles que la Protéinase K, la Reverse transcriptase, l'UNG (Uracyl-N-glycosidase), la Taq polymérase... sont toutes produites à partir de micro-organismes (archaebactéries ou autres) et ne peuvent être purifiées complètement (Böttger, 1990; Rand et Houck, 1990; Schmidt *et al.*, 1991). Elles peuvent donc être source de contaminations et engendrer des amplifications si le test PCR n'est pas assez spécifique. Ce type de contamination a d'ailleurs déjà été observé en TaqMan PCR avec l'utilisation du MasterMix pour l'amplification de l'ARNr 16S d'*E. coli* (Corless *et al.*, 2000).

De nos deux tests développés, seul le test ciblant le genre *Cryptosporidium* a généré des petites courbes d'amplification contaminantes mais uniquement observées après le cycle 38 (cycle correspondant à 1-3 copies d'ARNr) de TaqMan RT-PCR. Les courbes obtenues après ce cycle ne sont donc pas à prendre en compte. Par contre, le test ciblant spécifiquement l'espèce *C. parvum* n'a donné aucune trace d'amplification contaminante de ce type.

Par ailleurs, l'ajout de l'étape d'IMS après concentration des oocystes issus d'échantillons d'eau permettra de faire une importante sélection initiale des interférents environnementaux. Elle ajoute l'avantage de sélectionner spécifiquement les oocystes de *Cryptosporidium* par ses anticorps monoclonaux et donc de diminuer le nombre d'organismes présents potentiellement contaminants lors de l'amplification en TaqMan RT-PCR.

➤ Des dilutions en série de suspensions d'oocystes de *C. parvum* préalablement quantifiées ont été lysées et purifiées par RNeasy®. Après TaqMan RT-PCR, la gamme étalon générée à partir des courbes d'amplification a permis d'observer une droite linéaire

et reproductible sur les 4-log d'amplification testés. La pente ($s = -1,929$) a un coefficient de corrélation de 0,98 pour les 4 répliques effectuées pour chaque dilution.

Contrairement aux amplifications obtenues avec les ADN, ce nouveau test a perdu en efficacité ($E=0,68$). Ceci peut s'expliquer par l'accumulation des différentes étapes précédant l'amplification, à savoir, l'extraction des ARN par RNeasy® ou bien l'étape de transcription inverse des ARN en ADNc qui n'est jamais totalement efficace non plus.

➤ Les 7µl utilisés pour être rétro-transcrits (7µl sur les 30 µl utilisés pour éluier les colonnes RNeasy®, soit environ $\frac{1}{4}$ des ARN récupérés) ont suffi à obtenir un test quantitatif sensible puisque l'équivalent de 5 oocystes purifiés ont pu être quantifiés.

L'application de ce test TaqMan RT-PCR à des échantillons d'eau nécessitait d'ajouter une étape d'IMS permettant de concentrer et de purifier les oocystes issus de l'élution des cartouches de filtration d'eau. Nos résultats ont montré que cette étape pouvait être directement utilisée avant le kit RNeasy®. Lors de l'élution finale des colonnes RNeasy®, les ARN purifiés sont récupérés après centrifugation alors que les billes magnétiques sont restées sur la colonne. Elles n'ont pas gêné la récupération en ARN, même lorsque les quantités en oocystes étaient importantes (de $8,4 \cdot 10^3$ oocystes). La comparaison des équations des droites des gammes étalon, avec et sans IMS, a permis d'évaluer un pourcentage de perte de rendement due à l'IMS d'environ 15%. Ce taux est, ici encore, équivalent à celui rapporté dans la littérature pour des eaux distillées (Reynolds *et al.*, 1999 ; Hsu et Huang, 2001) ou pour des eaux traitées (Stanfield *et al.*, 2000). Ces rendements sont compatibles avec la norme française qui valide les kits IMS dont le rendement est supérieur à 80% (AFNOR, 2001)

Les expériences de dopage de 20 l sur eau traitée ont montré que ce test était applicable en routine à des échantillons d'eau. Des pourcentages de récupération de **68,3** % ($\pm 40,2$ %) et **74,9%** ($\pm 31,1$ %) ont été calculés pour des quantités initiales en oocystes de 843 et $8,4 \cdot 10^3$ respectivement. Ces taux calculés sont identiques à ceux obtenus lors de notre précédent test TaqMan PCR amplifiant l'ADN des oocystes de *C. parvum*.

Ainsi, la quantification des ARNr 18S de *Cryptosporidium* et/ou de *C. parvum* dans l'eau est désormais possible par l'utilisation des 2 tests TaqMan RT-PCR développés dans cette étude. Cette technologie présente l'avantage de cibler un marqueur

de viabilité cellulaire sans nécessiter l'utilisation de processus biologiques lourds à mettre en œuvre comme dans la technique d'excystation *in vitro* ou d'infectivité (Wiedenmann *et al.*, 1998). L'ensemble de l'analyse IMS-TaqMan RT-PCR peut être effectuée en 5 heures et laisse la possibilité de traiter simultanément un grand nombre d'échantillons.

Afin de valider l'ARNr 18S comme marqueur de viabilité, nous avons effectué des expériences visant à étudier la stabilité de ces molécules après la mort des oocystes suite à un choc tel qu'un traitement par la chaleur .

Chapitre V. Etude de la stabilité des ARNr 18S et de l'ADNr 18S vis à vis de traitements à la chaleur

1. Introduction

Après avoir mis au point un test TaqMan RT-PCR ciblant les ARNr 18S d'oocystes de *Cryptosporidium* dans l'eau, nous avons décidé d'apprécier la représentativité des ARNr 18S en tant qu'indicateur de viabilité.

L'évaluation de l'effet de la chaleur sur la stabilité des ARNr 18S a déjà fait l'objet de 2 études importantes. Une première utilise la méthode FISH (Fluorescence In Situ Hybridation) (Vesey *et al.* 1995, 1998) pour déterminer la viabilité des *Cryptosporidium*. Cette technique consiste à utiliser une sonde nucléotidique fluorescente s'hybridant spécifiquement aux ARNr 18S puis à détecter la fluorescence par cytométrie de flux en particulier. C'est l'hybridation de cette sonde qui détermine l'état viable du parasite (Amann *et al.*, 1990 ; Amann *et al.*, 1995). La deuxième étude a fait l'objet de nombreuses interrogations concernant la stabilité des ARNr 18S après la mort des oocystes (Widmer *et al.*, 1999). En effet, ces derniers ont observé la présence des ARNr 18S des parasites par RT-PCR après 11 semaines à température ambiante et après inactivation des oocystes à la chaleur (65°C durant 15 minutes), ce qui semble montrer la persistance de ces molécules après la mort des oocystes.

Dans cette dernière partie de l'étude, nous avons donc choisi un stress par différents traitements thermiques pour analyser la stabilité des ARNr 18S en comparaison avec celle des ADNr 18S.

Dans la littérature, les oocystes de *Cryptosporidium* sont considérés comme inactivés (perte de leur capacité d'infectiosité) après un traitement par la chaleur de 15 minutes à 65°C (Fayer, 1994; Widmer, 1999). Différentes études ont aussi montré une

perte de viabilité des oocystes après 30 minutes à 60°C ou en moins de 5 minutes à 65°C (Fayer *et al.*, 1996; Tzipori et Ward, 2002). A 15°C, la viabilité et le caractère infectieux des oocystes ont pu être observés après 24 semaines et 7 mois (Fayer *et al.*, 1998; Jenkins *et al.*, 2003).

Dans une première partie, nous avons étudié la stabilité des ARNr 18S et des ADNr 18S face à des traitements thermiques appliqués directement à des oocystes de *C. parvum* viables. Différents temps d'exposition à une température de 65°C et de 95°C ont été comparés par analyse en TaqMan RT-PCR.

Dans un deuxième temps, la même expérience a été menée sur des oocystes préalablement lysés afin d'évaluer l'effet protecteur de la paroi. L'effet de l'ajout du Chelex-100 pendant la lyse des oocystes a été analysé en parallèle.

Pour terminer, un traitement en conditions extrêmes par autoclave à 120°C durant 20 minutes a été testé.

2. Matériel et Méthodes

2.1. Solutions stocks d'oocystes et d'ADN de *Cryptosporidium*.

Des suspensions d'oocystes viables de *C. parvum* (isolat Iowa) ont été fournies par un laboratoire américain (Waterborne, USA) et ont été utilisés dans les 3 mois après réception afin de s'assurer de leur caractère viable.

Une quantité identique de 775 oocystes a été utilisée dans toutes les expériences.

2.2. Lyse et extraction d'ADN

2.2.1. Lyse

L'ADN total des oocystes a été extrait par une série de 5 cycles de chocs thermiques (2 min à – 80°C et 2 min à 95°C) en présence ou en absence de 25% (p/v) de Chelex-100. Le lysat obtenu a été centrifugé à 10 000 x g durant 3 minutes.

2.2.2. Purification d'ADN

L'ADN contenu dans le surnageant a été purifié au travers de mini colonnes de filtration Nanosep® GHP MF de porosité 0,45µm (Pall Gelman sciences) par centrifugation durant 5 minutes à 10 000 xg. Le volume total d'éluat récupéré est amplifié en TaqMan PCR.

2.2. Lyse et extraction d'ARN

La lyse et l'extraction d'ARN ont été effectuées grâce à l'utilisation du kit commercial RNeasy® (Qiagen S.A., France). Le principe de ce kit est basé sur la fixation spécifique des ARN sur des colonnes en gel de silice suivi de différents lavages par centrifugation.

Le protocole est appliqué selon les conditions décrites dans la partie Matériel et Méthodes du Chapitre IV. Un volume de 7µl d'ARN purifié est prélevé du volume d'élution final pour être rétro-transcrit.

2.3. Transcription inverse des ARN

La transcription inverse de l'ARN en ADNc est effectuée selon les conditions décrites chapitre IV. Un volume de 7µl d'ARN purifié est ajouté par tube réactionnel.

Des contrôles négatifs ne contenant pas d'ARN sont systématiquement réalisés en parallèle.

2.4. Conditions d'amplification en TaqMan PCR

Sont ajoutés au Mix de PCR décrit dans le Tableau XXXVI :

- soit la totalité des ADNc obtenus de l'étape de transcription inverse,
- soit la totalité des ADN obtenus après lyse-extraction des ADN.

Composants (Applied Biosystems)	
Master Mix	1X Tampon ROX
	200 µM de chaque dATP, dCTP et dGTP
	400 µM de dUTP
	0,5 U d'Uracil- <i>N</i> -glycosidase (UNG)
	1 U AmpliTaq Gold DNA polymérase,
	5 mM MgCl ₂
+	MgCl ₂ supplémenté (pour obtenir une concentration finale de 6mM)
+	200 nM de Sonde TaqMan ou TaqMan-MGB
+	300 nM de chaque amorce
+	0,2 µl d'HCl

Tableau XXXVI : Mix réactionnel d'amplification (Volume final de 50µl).

Des contrôles négatifs sans oocyste ni ADN cible (remplacé par de l'eau PCR ultra-pure) ont été amplifiés en parallèle pour chaque série de réactions.

Les conditions d'amplification sont résumées dans le Tableau XXXVII.

Nombre de cycles	Durée	Température	Fonction
1 cycle	2 min	50°C	Activation de l'UNG
1 cycle	10 min	95°C	Activation de l'AmpliTaq Gold polymérase
40 cycles	15 s	95°C	Cycles d'amplification (dénaturation-élongation)
	1 min	60°C	

Tableau XXXVII : Conditions d'amplification en TaqMan PCR.

L'amplification et la détection s'effectuent dans l'appareil ABI Prism® 7700 Sequence Detection System (Applied Biosystems, France). Les données de la PCR sont analysées par le logiciel Sequence Detector.

2.5 Plan d'expérience

La Figure 48 présente le plan d'expérience réalisé afin de tester la stabilité des ADN et ARNr 18S vis-à-vis de traitements thermiques.

Trois répliques par temps d'exposition et par type d'analyse (ARNr 18S et ADNr18S) ont été effectuées.

NB : Pour la suite de ce chapitre, le terme général de « TaqMan PCR » sera utilisé pour l'ensemble des amplifications ADNr 18S mais aussi ARNr 18S (l'étape de rétro-transcription étant implicite pour la TaqMan RT-PCR).

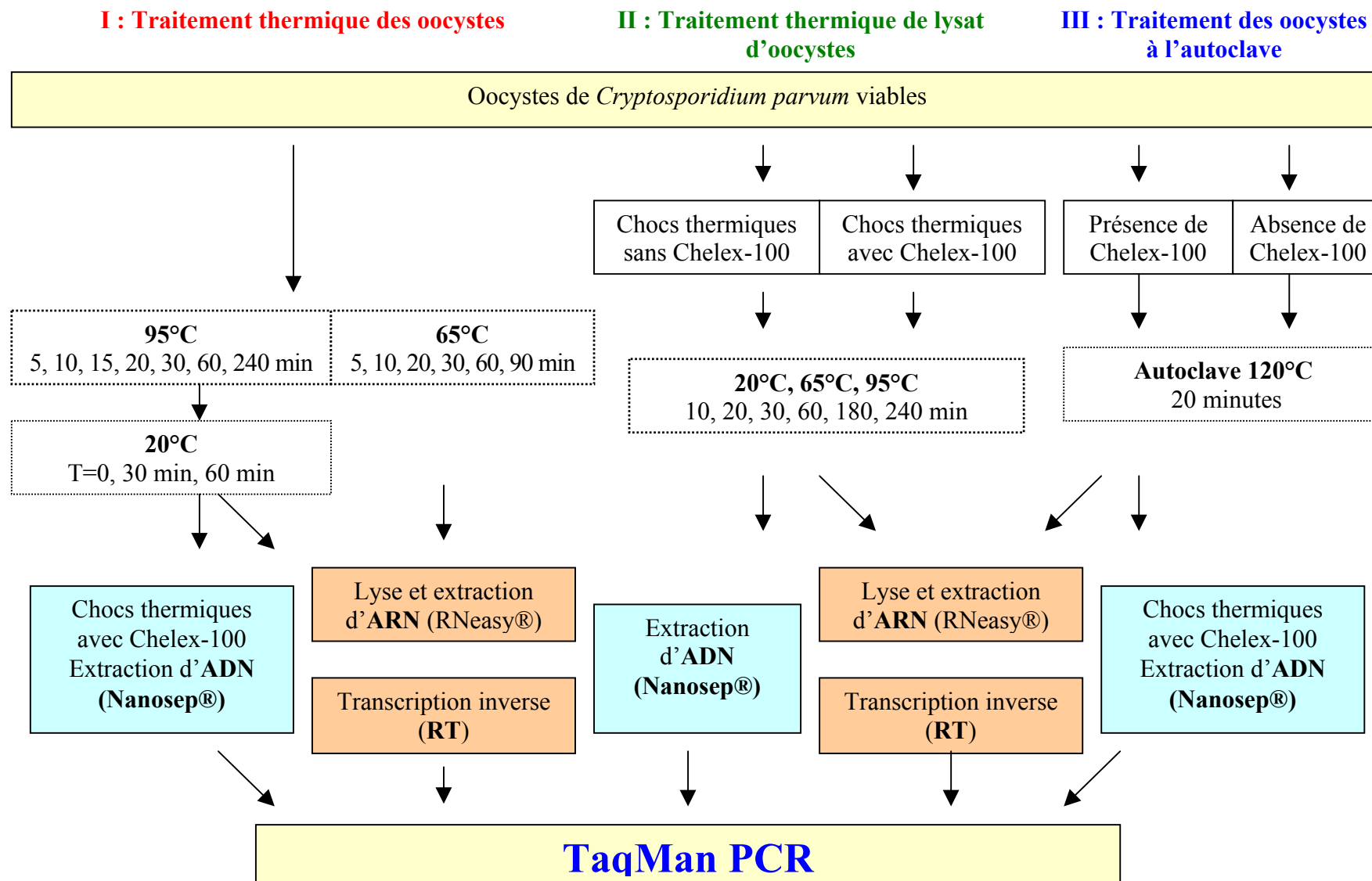


Figure 48 : Résumé du plan d'expérience pour les tests par traitements thermiques

2.5.1. Analyse d'ADNr et d'ARNr 18S après traitements d'oocystes de *C. parvum* à la chaleur.

Des suspensions d'oocystes de *C. parvum* ont été chauffées à 95°C durant 0, 5, 10, 15, 20, 30, 60 et 240 minutes. Dix-huit répliques pour chaque temps d'exposition ont été effectuées et réparties comme suit :

- six répliques ont été traitées immédiatement après le traitement thermique à 95°C,
- six répliques ont été traitées après 30 minutes à 20°C après le traitement thermique à 95°C,
- six répliques ont été traitées après 1 heure à 20°C après le traitement thermique à 95°C.

Le traitement de l'échantillon a consisté ensuite en :

- une lyse et extraction d'ADN (trois répliques par temps d'exposition),
- une lyse et extraction d'ARN suivie d'une transcription inverse (trois répliques par temps d'exposition).

Les échantillons ont été analysés par une amplification en TaqMan PCR (Figure 48, I).

Des suspensions d'oocystes de *C. parvum* ont été chauffées à 65°C durant 0, 10, 20, 30, 60 et 90 minutes et traitées immédiatement par une lyse et une extraction d'ARN suivie d'une transcription inverse.

Trois répliques par temps d'exposition à 65°C ont été effectuées.

Les échantillons ont ensuite été analysés par une amplification en TaqMan PCR (Figure 48, I).

2.5.2. Analyse d'ADNr et d'ARNr 18S à différentes températures après lyse des oocystes de *C. parvum* par chocs thermiques

Des suspensions d'oocystes de *C. parvum* ont été lysées par chocs thermiques :

- soit en présence de Chelex-100 25% (p/v),
- soit en l'absence de Chelex-100 25% (p/v).

Les échantillons obtenus sont :

- stockés à température ambiante (20°C),
- chauffés à 65°C,
- chauffés à 95°C

durant 0, 10, 20, 30, 60, 120 et 240 minutes pour chaque température.

Cinq répliques ont été effectuées par temps de chauffage et par temps d'exposition.

Chaque échantillon est traité :

- par une extraction d'ADN (deux répliques par temps d'exposition),
- par une lyse et extraction d'ARN suivie d'une transcription inverse (trois répliques par temps d'exposition).

Les échantillons ont ensuite été analysés par une amplification en TaqMan PCR (Figure 48, II).

2.5.3. Analyse d'ADNr et d'ARNr 18S après traitement par autoclave d'oocystes de *C. parvum*.

Des suspensions d'oocystes de *C. parvum* sont chauffées à l'autoclave à une température de 120°C durant 20 minutes :

- dix répliques ont été mises en présence de Chelex-100 25% (p/v),
- dix répliques ont été effectuées en l'absence de Chelex-100 25% (p/v).

Les échantillons obtenus sont traités :

- par une lyse et extraction d'ADN (cinq répliques de chaque type de suspension autoclavée),
- par une lyse et une extraction d'ARN suivie d'une transcription inverse (5 répliques de chaque type de suspension autoclavée).

Les échantillons sont ensuite analysés par une amplification en TaqMan PCR (Figure 48, III).

3. Résultats

3.1. Etude de la stabilité des ADNr et ARNr 18S issus d'oocystes traités à la chaleur

Des suspensions d'oocystes ont été traitées à une température de 95°C durant différents temps. Pour chaque analyse (ARNr 18S et ADNr 18S), trois échantillons ont été traités immédiatement, trois après un temps de latence de 30 minutes à température ambiante (20°C), les trois autres après 60 minutes à température ambiante (Figure 49). Chaque point représente la moyenne des trois Ct obtenus.

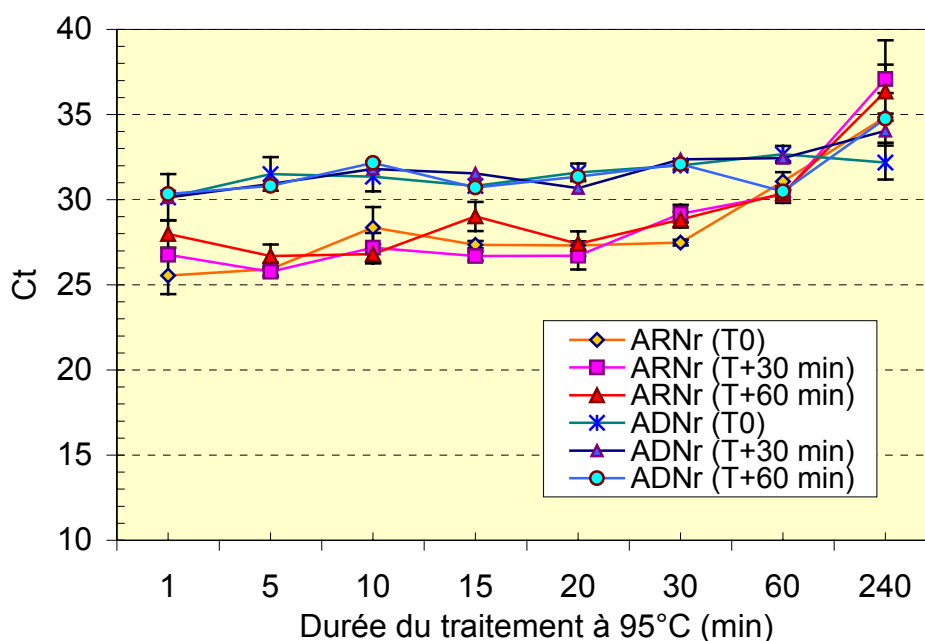


Figure 49 : Ct obtenus résultant d'amplifications en TaqMan PCR. Les oocystes en suspension ont été chauffés à 95°C puis traités immédiatement ou après 30 ou 60 minutes par une lyse-extraction d'ADN ou d'ARN.

Les résultats obtenus après amplification en TaqMan PCR ont permis d'obtenir une valeur de Ct correspondant à une quantité initiale de copies d'ADNr ou d'ARNr 18S. Ainsi, ces Ct obtenus indiquent si le traitement thermique appliqué aux oocystes a eu un impact sur la quantité d'ARNr 18S ou d'ADNr 18S intracellulaires présente.

Avec cette Figure 49, nous pouvons observer que les trois droites reliant les Ct des ADNr (droites bleues) se confondent. Il en est de même pour les trois droites reliant les Ct des ARNr 18S (droites rouges) qui se superposent aussi. Aucune différence n'a donc été observée sur la réalisation de l'extraction immédiatement ou après 30 minutes ou 1 heure à 20°C après le traitement par la chaleur.

Afin de comparer ces derniers résultats à ceux obtenus par un chauffage à 65°C des oocystes et d'étudier ainsi la dégradation des ARNr 18S par les RNases intracellulaires des oocystes, nous avons rassemblé dans une seule moyenne les Ct obtenus des oocystes chauffés à 95°C. L'ensemble des résultats (9 répliques à 95°C et 3 répliques à 65°C) par durée de chauffage est présenté à la Figure 50.

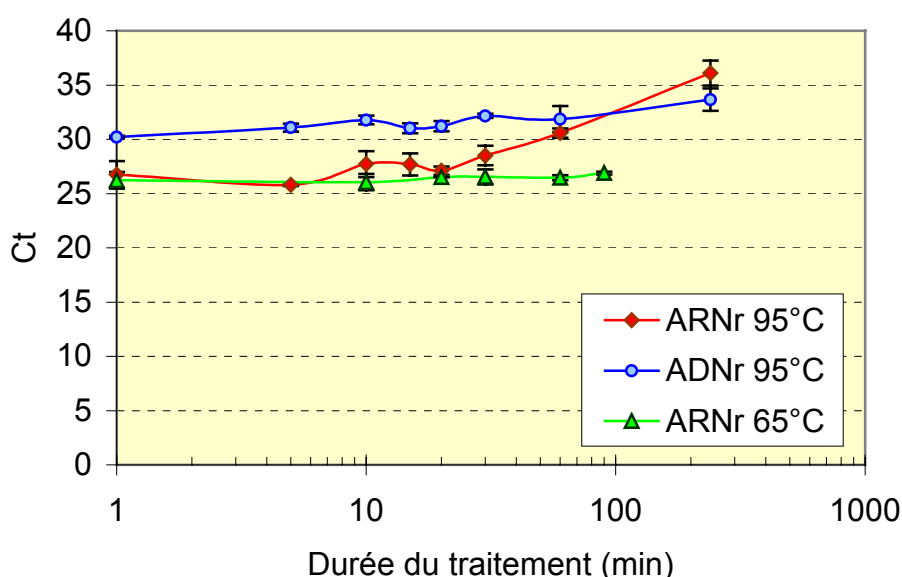


Figure 50 : Comparaison des valeurs de Ct obtenues après amplification en TaqMan RT-PCR de suspensions d'oocystes chauffées à 95°C ou 65°C.

Concernant les ADNr 18S à 95°C, les résultats montrent que le Ct initial de $30,2 \pm 1,2$ augmente à $32,2 \pm 1,0$ après 60 minutes de chauffage à 95°C puis à $33,7 \pm 1,3$ après 4 heures à 95°C. Ces résultats suggèrent que les molécules d'ADNr 18S ont été dégradées mais sont restées relativement stables durant les 4 heures de traitement des oocystes à 95°C.

Concernant les ARNr 18S à 95°C, les moyennes des Ct obtenues ont été relativement stables durant les vingt premières minutes à 95°C (Ct de $27,0 \pm 0,8$). Ces Ct ont ensuite augmenté linéairement jusqu'à une valeur de $36,1 \pm 1,8$ après 4 heures de traitement montrant une apparente dégradation de ARNr 18S. Malgré une légère détection des ARNr 18S après 4 heures de chauffage des oocystes à 95°C, ces molécules ont été beaucoup plus dégradées que les ADNr 18S.

En comparaison avec le chauffage des oocystes à 65°C, les ARNr 18S extraits et analysés en TaqMan RT-PCR ont donné des Ct résultants stables durant les 90 minutes de chauffage (Ct de $26,45 \pm 0,5$). La quantité d'ARNr 18S n'a donc pas subi de dégradation durant la période de chauffage à 65°C étudiée.

Alors que les ADNr 18S sont relativement stables à 95°C, les ARNr 18S présentent une bonne dégradation à cette température, dégradation qui n'a pas du tout été observée à 65°C.

L'observation microscopique des oocystes après 4 heures de traitement thermique à 95°C a montré qu'ils étaient toujours marqués par immunofluorescence et présentaient une forme caractéristique.

3.2. Evaluation de la stabilité des ARNr 18S et ADNr 18S issus d'oocystes lysés par chocs thermiques

Après avoir étudié la stabilité des ARNr 18S et des ADNr 18S intracellulaires à 95°C et à 65°C, nous avons effectué une seconde évaluation de leur stabilité en étudiant l'effet de différents traitements thermiques sur des oocystes déjà lysés par une série de cinq chocs thermiques à -80°, 2 min et 95°C, 2 min.

De plus, nous avons profité de cette étude pour évaluer l'effet protecteur de la présence de Chelex-100 sur la stabilité de ces molécules.

En l'absence de Chelex-100 durant les chocs thermiques et l'étape de traitement par chauffage, les résultats obtenus sont schématisés par la Figure 51. Chaque point représente la moyenne de trois répliques pour l'ARNr 18S et de 2 répliques pour l'ADNr.

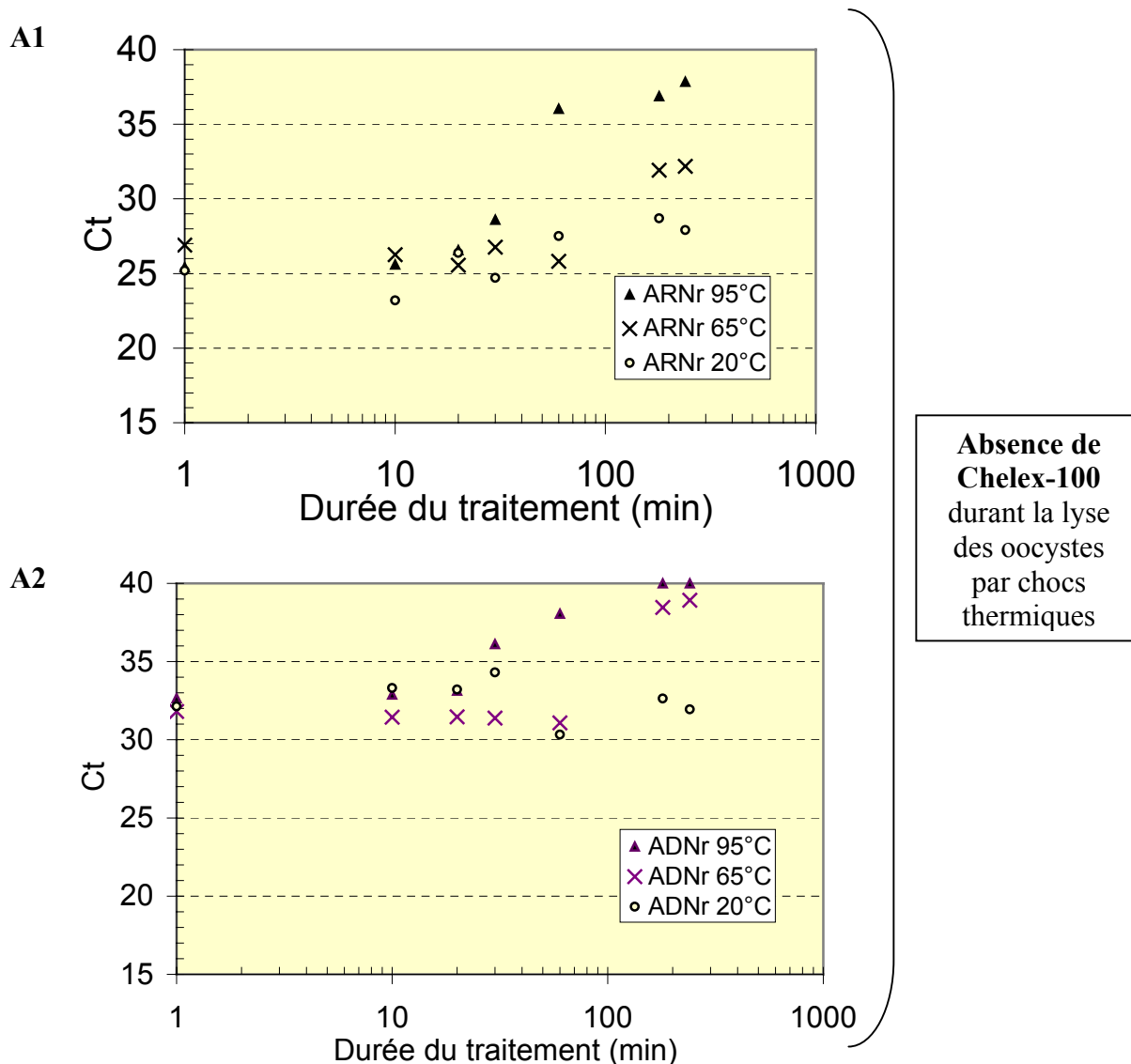


Figure 51 : Comparaison des valeurs de Ct (moyennes) obtenues par RT-TaqMan PCR pour des oocystes de *C. parvum* lysés préalablement par chocs thermiques en absence de Chelex-100.

L'ADNr a donné des Ct de $32,6 (\pm 1,2)$ à 20°C durant 4 heures indiquant que cette molécule est stable à température ambiante après chocs thermiques des oocystes de *C. parvum*. Néanmoins, après 180 minutes à 65°C et à 95°C suivant les chocs thermiques, l'ADNr est dégradé. Les Ct moyens obtenus sont de 38,7 et 40 respectivement. Le début de cette dégradation est observée après 60 minutes de chauffage à 65°C et après 20 minutes de chauffage à 95°C.

Pour l'ARNr 18S, les valeurs de Ct observées ont été stables durant la première heure à 20°C et 65°C (moyenne des Ct de $25,8 \pm 1,5$). Après 4 heures, ces valeurs ont augmenté à $27,9 (\pm 0,6)$ à 20°C et $32,2 (\pm 0,7)$ à 65°C. A 95°C, les valeurs de Ct ont été stables durant les 20 premières minutes (moyenne des Ct de $25,9 \pm 0,6$) puis ont augmenté jusqu'à $36,0 (\pm 0,8)$ après 1 heure et à $37,8 (\pm 0,3)$ après 4 heures indiquant une dégradation quasi-totale des molécules d'ARNr 18S.

Les molécules d'ARNr 18S et d'ADNr 18S obtenues suite à la lyse des oocystes ont été très sensibles au traitement thermique en se dégradant proportionnellement à la température du traitement thermique.

De plus, il est important de noter une différence significative entre les résultats obtenus à 65°C sur l'ADNr 18S avec ou sans lyse préalable.

Les résultats de la présence de Chelex-100 durant la lyse sont schématisés dans la Figure 52. Chaque point représente la moyenne de 3 répliques pour l'ARNr 18S et de 2 répliques pour l'ADNr 18S.

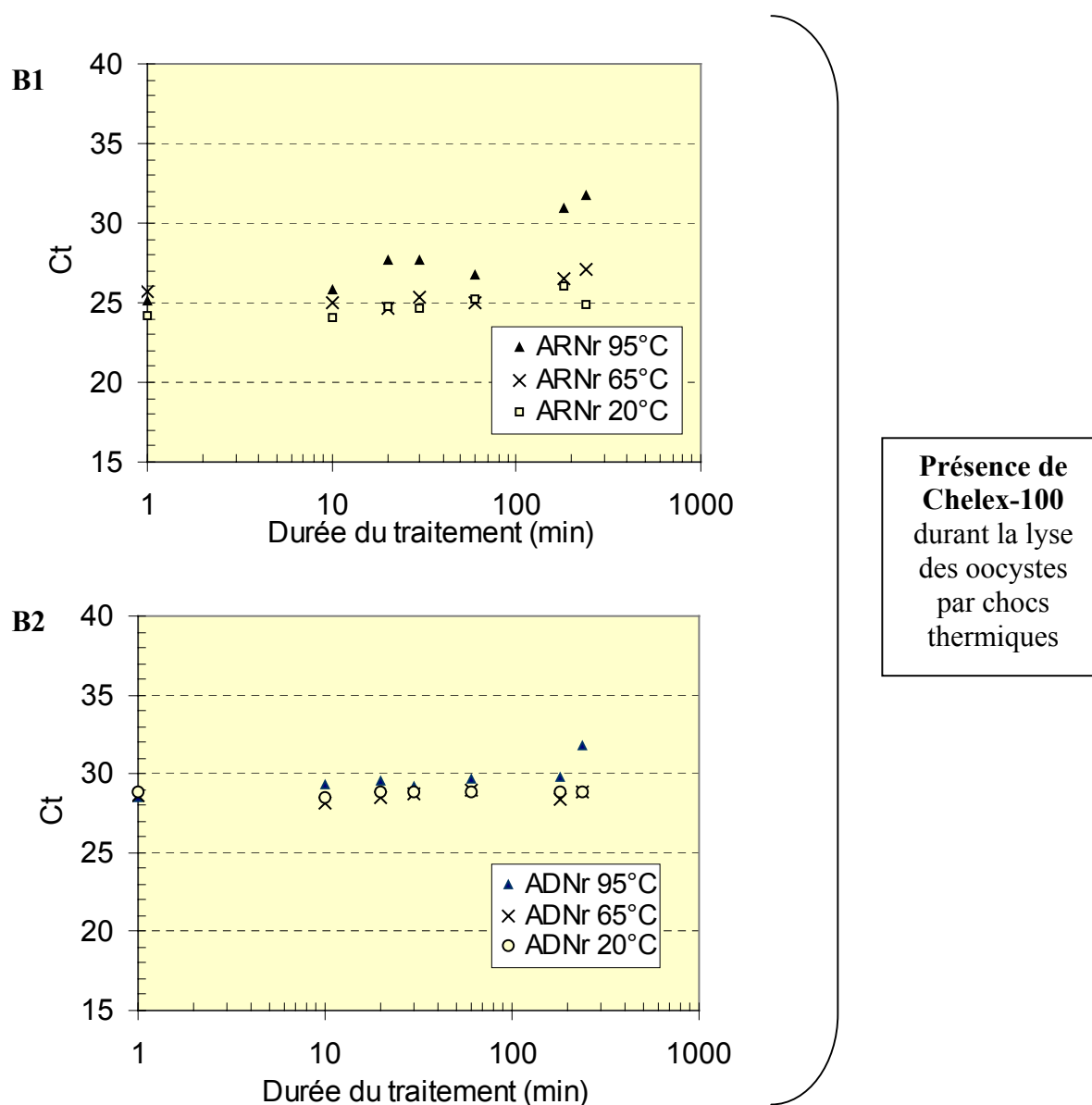


Figure 52 : Comparaison des valeurs de Ct (moyennes) obtenues par RT-TaqMan PCR pour des oocystes de *C. parvum* lysés préalablement par chocs thermiques en présence de Chelex-100.

Les molécules d'ADNr, à 20°C et 65°C, ont obtenu des valeurs de Ct identiques sur la période de 4 heures (moyenne des Ct obtenus de $28,7 \pm 0,2$). A 95°C, l'ADNr a aussi été stable durant les 4 heures de chauffage et, seule une valeur de Ct légèrement augmentée à $31,8 \pm 0,9$ est observée après 4 heures.

Pour l'ARNr 18S, les valeurs de Ct sont stables sur les 4 heures de traitement à 20°C (moyenne des Ct de $24,8 \pm 0,7$). A 65°C et 95°C, les valeurs de Ct générées ont augmenté respectivement de 25,7 ($\pm 0,1$) à 27,1 ($\pm 0,8$) et de 25,1 ($\pm 0,8$) à 31,7 ($\pm 0,5$) en 4 heures de chauffage. Cette dégradation est très faible comparée à la dégradation observée lors des traitements à la chaleur sans présence de Chelex-100.

Ces résultats montrent l'effet protecteur du Chelex-100 sur la dégradation par la chaleur des 2 molécules, en particulier sur la molécule d'ADNr 18S.

3.3. Etude de la dégradation des ADNr et des ARNr18S après traitement des oocystes par autoclave

Des évaluations de la stabilité des ARNr 18S et des ADNr issus d'oocystes de *C. parvum* traités à l'autoclave à 120°C durant 20 minutes en présence ou en absence de Chelex-100 ont été effectuées. Les Ct obtenus à partir de la moyenne de 5 répliques sont résumés par la Figure 53.

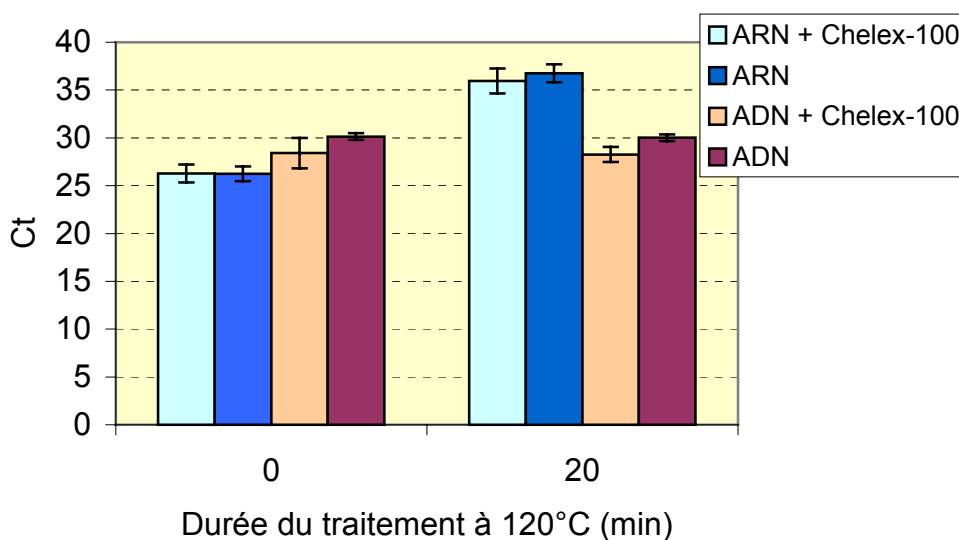


Figure 53 : Moyenne des Ct obtenus pour chaque essai sur des oocystes traités à l'autoclave. Chaque point représente la moyenne de 5 répliques.

Par ces résultats, nous pouvons observer que les oocystes traités par l'autoclave n'ont pas eu leurs molécules d'ADNr dégradées. Des Ct de 28,26 ($\pm 0,79$) et de 30,14 ($\pm 0,35$) ont été obtenus en présence et en absence de Chelex-100 respectivement après traitement alors qu'initialement, les Ct étaient de 28,32 ($\pm 0,93$) et de 30,01 ($\pm 0,34$).

En revanche, les molécules d'ARNr 18S ont été bien dégradées par ce traitement. Les Ct ont augmenté de 26,23 ($\pm 0,77$) à 36,75 ($\pm 0,94$) et de 26,28 ($\pm 0,94$) à 35,96 ($\pm 1,31$) après traitement par autoclave (sans et avec Chelex-100 respectivement). Ce type de traitement a donc été très efficace et suggère une bonne dégradation de ARNr 18S. Une faible détection est malgré tout observée après traitement à l'autoclave.

Les résultats obtenus avec ou sans Chelex-100 sont comparables à la fois pour l'ADNr 18S et l'ARNr 18S.

*Après autoclave, les ARNr 18S ont été quasiment dégradés alors
que les ADNr18S ont montré une très bonne stabilité.*

4. Discussion-Conclusion

Cette étude a montré l'utilité de la TaqMan RT-PCR pour observer la dégradation des ARNr 18S ou des ADN 18S. En effet, cette méthode s'est révélée beaucoup plus adéquate qu'une simple méthode de PCR ou RT-PCR car la simple lecture de la présence/absence de bandes obtenues après électrophorèse ne peut nous indiquer précisément si une dégradation des molécules s'est amorcée.

Dans un premier temps, l'effet de traitements thermiques directement appliqués à des oocystes viables a été évalué.

Lors du traitement thermique à 95°C des oocystes viables de *C. parvum*, nous avons pu étudier la dégradation des ARNr 18S et des ADNr 18S intracellulaires. Aucune différence entre les échantillons traités immédiatement et les échantillons traités après un temps de latence de 30 minutes ou d'1 heure à 20°C n'a été observée. En conséquence, nous en avons déduit que les molécules d'ARNr 18S et d'ADNr étaient stables pendant au moins une heure à température ambiante après un traitement thermique à 95°C. Cette constatation a son importance pour la suite des résultats obtenus compte tenu du nombre important d'échantillons traités simultanément et du temps pouvant séparer l'extraction du premier et celle du dernier échantillon.

Nous avons pu observer, par les Ct obtenus générés à partir des oocystes traités à 95°C, une importante stabilité des ADNr durant les 4 heures de traitement. A cette température, les ARNr 18S se sont montrés moins stables puisque, après 20 minutes de chauffage, une dégradation linéaire a été observée. Nous pouvons donc supposer qu'après 20 minutes de chauffage, le nombre d'oocystes morts augmente de façon régulière.

Malgré tout, il est important de noter qu'après 4 heures de traitement à 95°C, des molécules d'ARNr 18S ont toujours été détectées (mais en quantité beaucoup plus faible que l'ADNr) montrant ainsi leur stabilité. Une observation sous microscope optique a révélé que les oocystes, après traitement thermique, avaient conservé leur forme et leur marquage immunofluorescent caractéristiques révélant une relative intégrité de la paroi. Ces résultats sont confortés par les observations rapportées par Wiedenmann (Wiedenmann *et al.*, 1998) signalant qu'un changement de température ne suffit pas à relarguer les acides nucléiques même après avoir fait bouillir les oocystes. Des

amplifications PCR directement appliquées à ces oocystes ont été généralement négatives montrant la robustesse de la paroi, même vis à vis des changements de température lors des cycles de PCR.

En partant de l'idée que les RNases intracellulaires peuvent digérer les ARNr 18S présents après la perte de viabilité des oocystes (Vesey *et al.* 1995; Quintero-Betancourt *et al.*, 2002) et observant la persistance des ARNr 18S, nous avons pensé que la dénaturation des enzymes à 95°C pouvait être la cause de cette persistance. Nous avons donc effectué un traitement thermique des oocystes à 65°C. A cette température, les oocystes sont considérés comme inactivés (perte de leur capacité d'infectiosité) après 15 minutes (Fayer, 1994, Widmer *et al.*, 1999) et en voie de dégradation par leurs enzymes intracellulaires (Vesey *et al.*, 1995).

Or, aucune dégradation des ARNr 18S n'a été observée durant les 90 minutes de traitement thermique (Ct stables). Cette stabilité des ARNr est en corrélation avec l'étude de Widmer (Widmer *et al.*, 1999). Après inactivation des oocystes 15 minutes à 65°C, cette équipe a mis en évidence la persistance de ces ARNr 18S de *Cryptosporidium* après au moins 11 semaines par RT-PCR. Contrairement à ces résultats, la méthode FISH a démontré une bonne corrélation entre la présence des ARNr 18S et la viabilité du parasite déterminée par la méthode d'excystation. En FISH, les ARNr 18S ne sont plus détectés avec la perte de viabilité des parasites : un traitement à 65°C durant 15 minutes donne un signal négatif (Vesey *et al.*, 1995). Nous pouvons essayer d'expliquer cette différence de résultats entre ces 2 méthodes essentiellement en terme de sensibilité. La RT-PCR amplifie de façon exponentielle la quantité d'ARNr 18S initialement présente offrant un seuil de sensibilité beaucoup plus faible que la méthode FISH basée sur une détection de la fluorescence des ARNr 18S sans amplification préalable. Par comparaison de méthodes de détermination de viabilité des *Cryptosporidium*, une équipe a montré que la méthode FISH pouvait surestimer la présence d'oocystes viables (Jenkins *et al.*, 2003). En effet, elle a signalé, que pour des oocystes conservés huit mois à 15°C, des résultats positifs étaient obtenus en FISH (20% des 10⁴ oocystes testés) alors que ces mêmes suspensions d'oocystes présentaient des résultats négatifs en culture cellulaire ou en infectiosité chez la souris. Les auteurs ont donc aussi émis l'hypothèse d'une persistance des ARNr 18S après la perte de viabilité des oocystes.

Compte tenu de l'ensemble de ces observations, nous avons jugé opportun de réaliser ces mêmes traitements thermiques appliqués cette fois-ci à des oocystes déjà lysés. Les résultats ont montré que les ARNr 18S et les ADNr 18S donnaient des amplifications nulles ou quasi-nulles après 4h à 95°C. De même, une bonne dégradation a été observée à 65°C en comparaison au traitement effectué à 20°C n'ayant donné qu'une faible augmentation des Ct. L'intégrité des parois des oocystes ayant sûrement été affectée par les chocs thermiques, les deux molécules ont été beaucoup plus exposées et par conséquent plus sensibles aux traitements thermiques effectués. La paroi joue donc un rôle protecteur très important dans la résistance des oocystes.

En présence du Chelex-100 lors de la lyse des oocystes, les ARNr 18S et les ADNr ont présenté une bien meilleure résistance face à ces mêmes traitements thermiques. Cette résine étant définie comme protectrice des acides nucléiques vis-à-vis de la chaleur, cette augmentation de stabilité des ARNr 18S et des ADNr indique que c'est l'action du traitement thermique, plus que l'action des nucléases intracellulaires, qui les dégrade. Par ailleurs, l'addition de la résine Chelex-100 a montré un effet protecteur non seulement pour l'ADNr 18S mais aussi pour l'ARNr 18S, la dégradation de ces molécules ayant été beaucoup plus faible. Pour l'ADNr, l'effet protecteur de la résine Chelex-100 a été observé d'une part, durant la lyse par chocs thermiques des oocystes de *C. parvum* et, d'autre part, lors des traitements thermiques suivant la lyse des oocystes. Concernant l'ARNr 18S, l'effet protecteur du Chelex-100 a été uniquement observé durant le traitement thermique après la lyse.

Pour terminer, un traitement extrême à l'autoclave, associant une haute température à une mise en pression, a été évalué sur des oocystes viables. Par ce traitement, nous avons pu observer un comportement bien différent entre les 2 molécules d'ADNr 18S et d'ARNr 18S. En effet, alors que les molécules d'ADNr 18S ont été peu dégradées, une quasi-dégradation de tous les ARNr 18S a été obtenue. L'impact sur la dégradation des ARNr 18S a donc été beaucoup plus rapide.

L'ensemble de ces résultats a montré que les molécules d'ARNr 18S étaient beaucoup plus sensibles au traitement thermique que les molécules d'ADNr 18S. Néanmoins, l'importante résistance des ARNr 18S observée dans cette étude ne semble pas favoriser l'idée que ces molécules peuvent être utilisées comme marqueurs de viabilité des oocystes en TaqMan RT-PCR. Cette résistance des ARNr vis-à-vis de

traitements thermiques a aussi été mise en évidence chez les bactéries. Les ARNr 16S d'*E.coli* traités à 100°C, 80°C et 60°C ont été détectés par RT-PCR 16 heures après traitement (Sheridan *et al.*, 1998). Une autre étude sur *Campylobacter jejuni* a ciblé spécifiquement l'ARNr de la bactérie après un traitement à 100°C et a mis en évidence que ces molécules étaient toujours détectées 5 heures plus tard (Uyttendaele *et al.*, 1997).

Nous pouvons émettre l'hypothèse que les ARNr 18S sont très protégés de la dégradation par leur structure secondaire associée à des protéines ribosomiques. Cette structure très compacte confère à ces sous-unités ribosomiques d'ARNr 18S une bonne résistance. Lors des traitements à haute température, l'intégrité des parois des oocystes ainsi que l'intégrité de ces structures sont endommagées et ces ribosomes sont alors beaucoup plus exposés à la dégradation. Par cette hypothèse, nous pouvons peut être expliquer la dégradation brutale et linéaire des ARNr 18S après 20 minutes de traitement à 95°C. Cet effet protecteur de leur structure compacte a déjà été observé pour des ARNr 16S d'*E.coli* traités à 80°C et détectés après 48H après inactivation (McKillip *et al.*, 1998). Cette équipe a d'ailleurs souligné qu'aucune activité des RNAses endogènes modifiant l'intégrité des ARNr 16S bactériens n'avait été observée à cette température.

Ces molécules présentent malgré tout l'avantage d'être exprimées de façon constitutive et d'être beaucoup moins stables que les ADN. En conditions environnementales, des oocystes morts sont peut-être détruits beaucoup plus rapidement par l'accumulation de facteurs (pH, nucléases, ions...). Ainsi, quantifier les ARNr 18S semble beaucoup plus représentatif que les ADNr 18S vis-à-vis du risque à *Cryptosporidium*.

Afin de valider ou non l'ARNr 18S comme marqueur de viabilité en PCR, il serait nécessaire d'envisager des tests complémentaires avec d'autres types de traitements par exemple, le traitement thermique n'étant peut-être pas le plus efficace pour entraîner la mort des oocystes. De plus, des perspectives avec d'autres ARN pourront être envisagées puisque notre test est désormais facilement transposable car les colonnes RNeasy® purifient la totalité des ARN. En effet, dernièrement, une étude du CIRSEE a montré que les ARNm codant pour les protéines HSP 70 de *Cryptosporidium* n'étaient plus détectés après 20 minutes à 95°C (Hallier-Soulier et Guillot, 2003). Ces ARNm étant malheureusement induits et non exprimés de façon constitutive dans les cellules de *Cryptosporidium*, d'autres ARNm présents de façon constitutive pourraient être choisis.

Conclusion et Perspectives

Au démarrage de cette étude, aucune méthode moléculaire à la fois quantitative, sensible et spécifique n'était disponible pour quantifier les oocystes de *C. parvum*. Or, il existe toujours un réel besoin d'analyser précisément ces parasites soit dans les eaux de distribution afin d'évaluer le risque sanitaire, soit dans les ressources, afin de mettre en place les traitements adéquats. Les travaux présentés au cours de ce rapport ont donc eu pour objectif de développer un test moléculaire quantitatif ciblant spécifiquement l'espèce *C. parvum* par TaqMan PCR. Cette technique, encore très récente mais ayant déjà fait ses preuves pour quantifier certains micro-organismes présents dans l'environnement (McAvin *et al.*, 2001; Bach *et al.*, 2002; Brunk *et al.*, 2002; Haugland *et al.*, 2002), n'avait jamais été appliquée à la quantification de ce parasite dans des échantillons d'eau.

Le test TaqMan PCR développé ici a été optimisé puis appliqué à des suspensions purifiées d'oocystes de *C. parvum*. Après amélioration des conditions de lyse du parasite, une évaluation du test en terme de répétabilité, de sensibilité et de spécificité a été effectuée. Les essais de spécificité ont montré une seule réaction croisée avec l'espèce *C. meleagridis*, espèce reconnue proche de *C. parvum* et déjà retrouvée lors d'épidémies de cryptosporidiose. La méthode a révélé une bonne linéarité (coefficients de corrélation de 0,99) et une limite de quantification évaluée à 5 oocystes tout en sachant que la limite de détection est inférieure à ce seuil. La validation du mélange réactionnel prêt à l'emploi « Master Mix » a apporté à la méthode une plus grande facilité de mise en œuvre et une reproductibilité supérieure dans le but d'une meilleure standardisation. De plus, nous avons pu observer l'avantage de pouvoir quantifier, de façon automatisée, 96 échantillons simultanément. Aucune manipulation post-PCR n'étant nécessaire, le temps de manipulation et les risques de contaminations sont considérablement diminués. Ainsi, nous avons obtenu un test TaqMan PCR spécifique, répétable et applicable à la quantification rapide de *C. parvum* sur une gamme dynamique d'au moins 6 log de concentration en lysat d'oocystes amplifiés.

L'adaptation de cette TaqMan PCR à des échantillons d'eaux a nécessité la mise au point d'un protocole de pré-traitement spécifique nécessitant, après filtration de l'eau, une combinaison de plusieurs étapes de purification. Dans un premier temps, nous avons tenté d'utiliser les techniques récentes ou fréquemment utilisées dans les laboratoires pour la purification d'ADN génomique issus de micro-organismes provenant d'échantillons contaminés. Aucune n'a permis de répondre à la problématique pour des raisons de reproductibilité, incompatibles avec une quantification ultérieure, ou pour des problèmes de résistance importante de *Cryptosporidium* vis-à-vis de la lyse. Au vu de ces résultats, la méthode de séparation immuno-magnétique s'est donc révélée indispensable pour concentrer et purifier spécifiquement les oocystes. Nous l'avons donc combinée à une étape de purification d'ADN par filtration sur colonne Nanosep® faisant suite à une lyse thermique des oocystes. Ainsi, cette méthode originale de purification nous a permis de minimiser les problèmes d'interférences ou d'inhibitions si fréquemment rencontrés en PCR (Rochelle *et al.*, 1999, Lowery *et al.*, 2001).

L'application de cette méthode de purification à la quantification moléculaire par TaqMan PCR s'est révélée satisfaisante pour quantifier des oocystes dans des eaux traitées ou des eaux brutes. Des rendements allant respectivement de 69,7 % ($\pm 22,3$ %) à 84,5 % ($\pm 9,7$ %) et de 46,4 % ($\pm 7,3$ %) à 57,6 % ($\pm 10,7$ %) pour des eaux propres destinées à la consommation et pour des eaux de surface (eau de Seine) ont été obtenus. L'ensemble de cette méthode a obtenu des rendements supérieurs à ceux évalués pour la méthode de référence 1622 de l'US Environmental Protection Agency (USEPA) ou la méthode française normalisée NF T 90-455.

L'ensemble de cette méthode d'analyse de *C. parvum* issus d'échantillons d'eau est présentée dans la Figure 54 .

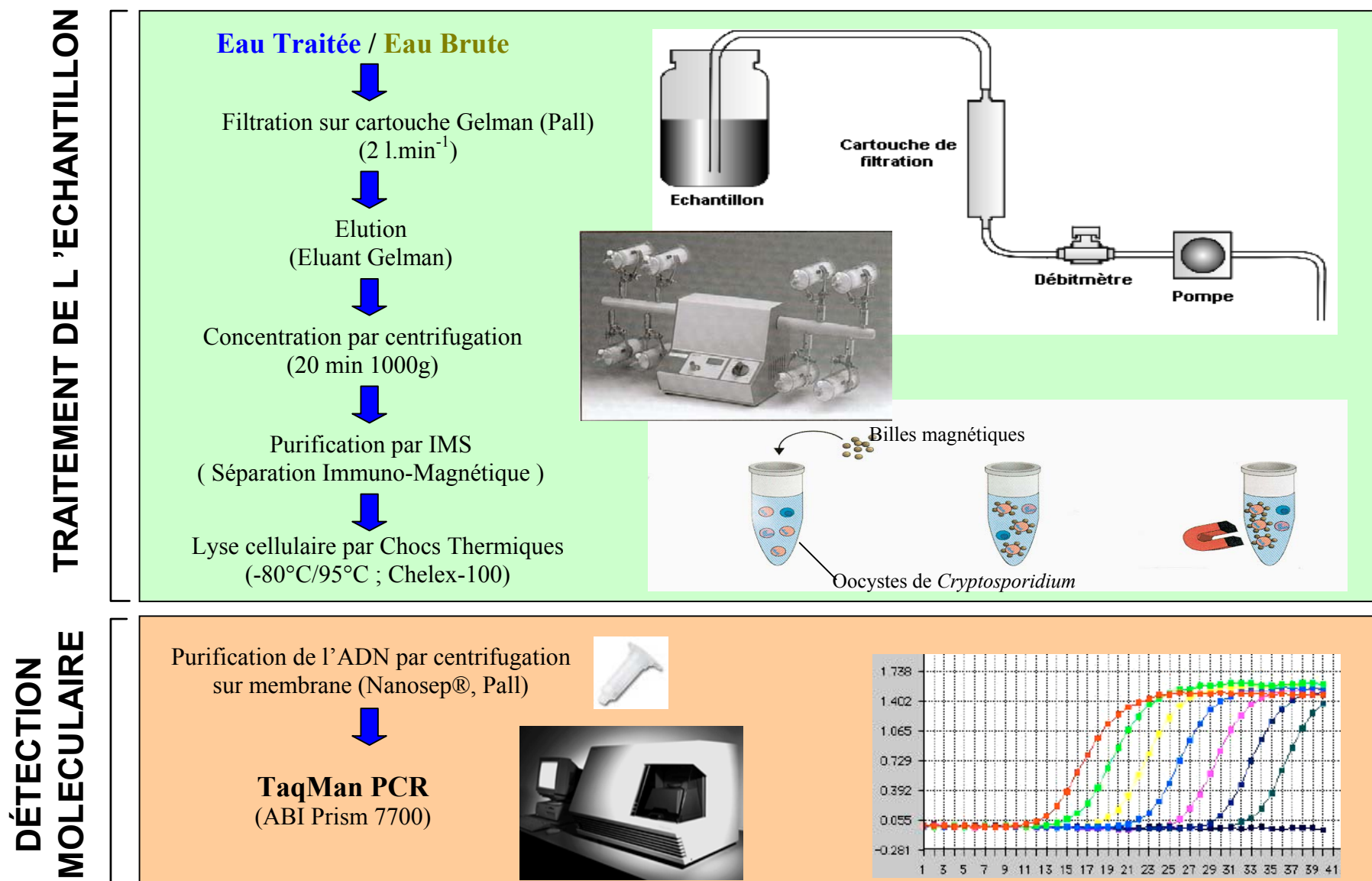


Figure 54 : Récapitulatif de la méthode TaqMan PCR

Comparé aux méthodes normalisées, ce nouveau test quantitatif par TaqMan PCR présente les avantages d'être :

- **spécifique** de l'espèce pathogène pour l'homme *C. parvum*,
- **plus précis**, le risque de faux positifs dûs la présence de débris, d'algues ou autres micro-organismes réagissant avec les anticorps fluorescents et visibles sous microscope ne sont pas quantifiés en TaqMan PCR,
- **plus reproductible et plus objectif**, la détection au microscope étant difficile et dépendante de l'œil du technicien.
- **rapide, simple et automatisée**; aucun technicien expérimenté pour la détection sous microscope du parasite n'est nécessaire. De plus, 96 échantillons peuvent être quantifiés en 2 heures alors que les observations microscopiques ne peuvent s'effectuer simultanément.
- **efficace** pour la quantification d'une large gamme logarithmique d'oocystes. Alors que sous microscope des valeurs supérieures à 1000 cellules sont très difficilement énumérables, la quantification en TaqMan PCR peut être effectuée sur au moins 6 log de concentrations. Cette méthode peut donc être plus facilement utilisable pour évaluer des efficacités de traitement.

Ainsi, mis à part l'important investissement nécessaire à l'achat de l'équipement, cette méthode peut répondre de façon adéquate au besoin de quantification de ce parasite dans des échantillons d'eau. L'ensemble des résultats obtenus avec ce test quantitatif permettent d'envisager plusieurs perspectives à ce travail.

Au niveau du laboratoire le nouveau test TaqMan PCR, ciblant spécifiquement *C. parvum*, peut désormais passer du stade « prototype » au stade « développement ». Pour ce faire, une validation « en conditions réelles » sur des échantillons d'eaux traitées pourra être effectuée. Les résultats obtenus sur au moins une cinquantaine d'échantillons seront comparés aux résultats obtenus sur ces mêmes échantillons analysés en parallèle avec la méthode classique. Si cette étude se révèle satisfaisante, ce test pourra alors être proposé pour être « industrialisé » pour l'analyse d'eaux potables ou d'efficacité de traitement. Ce travail est actuellement envisagé et sera probablement effectué au CIRSEE durant l'année 2004. Par la suite, une seconde évaluation du test sur des eaux plus chargées (eaux de surfaces, eaux usées épurées...) pourra être envisagée.

Après cette validation interne, des essais inter-laboratoires devraient être aussi envisagés pour évaluer l'ensemble de la méthode dans des conditions de reproductibilité

encore plus importantes : différents laboratoires, différents manipulateurs, différents « Master mix » réactionnels, différents appareils... En effet, actuellement, cette nouvelle technique de TaqMan PCR est de plus en plus développée et nous arrivons à une phase de robotisation maximale où chaque société développe sa propre approche (Bustin, 2002). Les appareils de PCR quantitative en temps réel se multiplient et nécessitent d'être comparés dans la même mesure que la méthode analytique. En effet, les performances des deux principaux appareils, l'ABI Prism 7700 avec sa nouvelle version ABI Prism 7000 (Applied Biosystems) et le Lightcycler (Roche Molecular), ont été largement rapportées. Cependant, il est désormais possible de trouver une multitude d'appareils encore peu décrits et apparus récemment sur le marché comme le iCycler (Biorad), le Mx4000 (Stratagène), le Smartcycler (Smartcycler), le Rotor Gene 2000 (Corbet research) et les derniers-nés comme le Chimaera Quantitative PCR system (ThermoHybaid) et le DNA Engine Opticon Continuous Fluorescence Detection System (MJ Research). Ainsi, un travail comparatif afin de pouvoir déterminer les performances de cette méthode sur ces différents systèmes et une homogénéisation (protocoles universels, approche uniforme...) devront être imposés.

Au vu des résultats inter-laboratoires, cette méthode TaqMan PCR de *C. parvum* pourrait être alors proposée comme « candidate » à la Normalisation en tant qu'alternative à la méthode de détection sous microscope. En effet, l'AFNOR a ouvert la voie ces dernières années à la normalisation de méthodes alternatives (exemple : projet de norme pour la détection des légionnelles dans l'eau par PCR) quand celles-ci apportent un plus en terme d'évaluation du risque sanitaire et de délai de réponse en cas de crise. Notre méthode présente ces avantages par sa spécificité et sa rapidité pour l'analyse d'un grand nombre d'échantillons.

Un second test quantitatif TaqMan RT-PCR ciblant spécifiquement les ARNr 18S des oocystes a été développé. Deux types de spécificité ont été obtenues par l'alignement des séquences d'ADNr 18S des différentes espèces de *Cryptosporidium* actuellement disponibles : l'une ciblant le genre *Cryptosporidium* et l'autre ciblant l'espèce *C. parvum*. Cette spécificité pour l'espèce *C. parvum* n'a pu aboutir qu'avec les avantages de l'utilisation des sondes TaqMan-MGB dernièrement commercialisées. Ces sondes ont la capacité de pouvoir être de séquence courte et de s'hybrider à des séquences riches en A et T ce qui a permis d'obtenir une hybridation dans la région hyper-variable différenciant

les espèces de *Cryptosporidium*. Comme attendu en théorie, l'espèce *C. meleagridis*, de par sa séquence identique à *C. parvum* au niveau de cette région, a été amplifiée en parallèle lors des tests de spécificité. Après validation d'une extraction efficace de l'ARN total et de la transcription inverse, un test de quantification des oocystes de *C. parvum* par TaqMan RT-PCR a été évalué. Une gamme linéaire d'amplification présentant une bonne reproductibilité (coefficient de corrélation de 0,97) et une sensibilité de quantification équivalente à 5 oocystes a été obtenue. L'adaptation de ce test à des échantillons d'eau a été évaluée par des expériences de dopage. Les pourcentages de récupération calculés se sont révélés équivalents à ceux trouvés pour le test TaqMan PCR précédent. Ce test TaqMan RT-PCR ciblant l'ARNr 18S, molécules indicatrices de viabilité pouvant nous renseigner sur l'état physiologique des parasites, est donc désormais applicable à des échantillons d'eau.

Des tests évaluant la stabilité des ARNr 18S par TaqMan RT-PCR face à des traitements thermiques ont été mis en place. L'ensemble des résultats a montré que les molécules d'ARNr 18S étaient beaucoup plus sensibles au traitement thermique que les molécules d'ADNr 18S. Cependant, l'application de ces traitements à des suspensions d'oocystes viables en comparaison à des lysats d'oocystes nous a permis d'observer le rôle protecteur très important que joue la paroi dans la robustesse des oocystes. Celle-ci pourrait être responsable de l'importante résistance de ces molécules d'ARNr 18S à la chaleur.

Compte tenu de cette stabilité apparente des ARNr 18S face à la chaleur, il est encore difficile de s'assurer que ces molécules sont de « bons » marqueurs de viabilité. Des analyses complémentaires devront être mises en place afin de lever le doute sur cette interrogation. Dans un premier temps, le même type d'expérience avec d'autres types de traitements appliqués à des oocystes tels que des chlorations, traitements UV, ozonations... devra être effectué. En effet, le traitement thermique, bien que facile à mettre en place, n'est peut-être pas le plus efficace pour entraîner la mort des oocystes. Dans un deuxième temps, il serait intéressant de réaliser des expériences similaires sur des échantillons d'eau, ces derniers travaux n'étant peut-être pas assez représentatifs des conditions naturelles. En effet, nous avons travaillé avec des suspensions d'oocystes « jeunes » (de moins de trois mois) et très pures. Il serait donc intéressant d'envisager de se rapprocher des conditions environnementales (c'est à dire en présence d'autres micro-organismes, d'ions, d'enzymes extracellulaires,...) et de vérifier ainsi si une dégradation

plus rapide de ces molécules est observée. En définitive, si les ARNr 18S ne s'avéraient pas pouvoir être de bons marqueurs de viabilité, un nouveau test, basé sur ce modèle TaqMan RT-PCR, pourrait être rapidement construit sur d'autres ARN. En effet, le kit RNeasy®, permettant d'extraire la totalité des ARN, seule l'étape d'amplification sera à redéfinir. Le choix pourra s'orienter, par exemple, sur des ARNm présents de façon constitutive (ARN codant pour des protéines de la β -tubuline par exemple, Widmer *et al.*, 1999) et la différence de stabilité entre les ARNr 18S et ces ARNm pourra de nouveau être étudiée.

Pour terminer, il est important de remarquer que le développement de ces 2 méthodes originales et en particulier la TaqMan RT-PCR nous permet désormais d'avoir plus d'informations sur la biologie de ces parasites en associant **performances** (efficacités de rendement de récupération, reproductibilité, sensibilité...) et **significations** (intégrité des oocystes, viabilité...). Aussi, ces méthodes TaqMan PCR et TaqMan RT-PCR, de par leur spécificité et leur capacité de quantification sur une large gamme dynamique, pourraient être mises à contribution dans :

- **l'étude de la résistance** du parasite par rapport à différents traitements de désinfection. La TaqMan PCR pourrait permettre d'optimiser les stratégies de traitement,
- **l'évaluation** des taux de *Cryptosporidium* dans les différents écosystèmes et sa dissémination par le biais des eaux. Cette stratégie pourrait permettre d'évaluer les sources à risques,
- **la prévention** contre la cryptosporidiose en appréciant l'occurrence de ce parasite dans les eaux. Par exemple, les eaux récréationnelles ou les piscines ont souvent été la cause d'épidémies à *Cryptosporidium* après contamination. La détection et à la quantification du parasite pourrait permettre d'évaluer les risques de transmission et d'adopter une stratégie prédictive vis-à-vis du danger. De plus elles pourraient permettre un meilleur contrôle de l'exposition des immunodéprimés face au danger de cryptosporidiose.

Références bibliographiques

- AFNOR.** 2001. Qualité de l'eau: Recherche et dénombrement d'oocystes de *Cryptosporidium* et de kystes de *Giardia*. NF T 90-455. Association Française de Normalisation. Saint-Denis la Plaine.
- Afonina, I. A., Reed, M. W., Lusby, E., Shishkina, I. G., et Belousov, Y. S.** 2002. Minor Groove Binder-conjugated DNA probes for quantitative DNA detection by hybridation-triggered fluorescence. *Biotechniq.* **32**:940-949.
- Afonina, I. A., Zivarts, M., Kutyavin, I. V., Lukhtanov, E. A., Gamper, H., et Meyer, R. B.** 1997. Efficient priming of PCR with short oligonucleotides conjugated to a minor groove binder. *Nucleic Acids Res.* **25**:2657-2660.
- Amann, R. I., Binder, B. J., Olson, E. J., Chisholm, S. W., Devereux, R., et Stahl, D. A.** 1990. Combination of 16S rRNA-targeted oligonucleotide probes with flow cytométrie for analysing mixed microbial populations. *Appl Environ Microbiol.* **56**:1919-1925.
- Amann, R. I., Ludwig, V., et Schleifer, K. H.** 1995. Phylogenic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiol Rev.* **59**:143-169.
- Amar L., Dumoutier N.,** 1992. Quantification de *Giardia* et *Cryptosporidium* dans les eaux. Etude interne CIRSEE.
- Anusz, K. Z., Mason, P. H., Riggs, M. W., et Perryman, L. E.** 1990. Detection of *Cryptosporidium parvum* oocysts in bovine feces by monoclonal antibody capture enzyme-linked immunosorbent assay. *J Clin Microbiol.* **28**:2770-2774.
- Bach, H. J., Tomanova, J., Schlöter, M., et Munch, J. C.** 2002. Enumeration of total bacteria and bacteria with genes for proteolytic activity in pure cultures and in environmental samples by quantitative PCR mediated amplification. *J Microbiol Methods.* **49**:235-245.
- Balatbat, A. B., Jordan, G. W., Tang, Y. J., et Silva, J., Jr.** 1996. Detection of *Cryptosporidium parvum* DNA in human feces by nested PCR. *J Clin Microbiol.* **34**:1769-1772.
- Barany, F.** 1991. The ligase chain reaction in a PCR world. *PCR Methods Appl.* **1**:5-16.
- Barwick, R. S., Levy, D. A., Craun, G. F., Beach, M. J., et Calderon, R. L.** 2000. Surveillance for waterborne-disease outbreaks--United States, 1997-1998. *Mor Mortal Wkly Rep CDC Surveill Summ.* **49**:1-21.
- Baudin, I., Gabard, N., Bernazeau, F., et Lainé, J.M.,** 2001. Suivi et optimisation des procédés de clarification pour l'élimination de *Cryptosporidium*. *Tech Sc Methodes.* **12**: 41-47.
- Baumgartner, A., Marder, H. P., Munzinger, J., et Siegrist, H. H.** 2000. Frequency of *Cryptosporidium* spp. as cause of human gastrointestinal disease in Switzerland and possible sources of infection. *Schweiz Med Wochenschr.* **130**:1252-1258.
- Black, E. K., Finch, G. R., Taghi-Kilani, R., et Belosevic, M.** 1996. Comparison of assays for *Cryptosporidium parvum* oocysts viability after chemical disinfection. *FEMS Microbiol Lett.* **135**:187-189.
- Blagburn, B. L., et Soave, R.** 1997. Prophylaxis and chemotherapy: human and animal. *Cryptosporidium* and cryptosporidiosis, Fayer, R. ed., Boca Raton (USA), CRC Press:111-128.

- Blanshard, C., Shanson, D. C., et Gazzard, B. G.** 1997. Pilot studies of azithromycin, letrozuril and paromomycin in the treatment of cryptosporidiosis. *Int J STD AIDS*. **8**:124-129.
- Bonnin, A., Fourmaux, M. N., Dubremetz, J. F., Nelson, R. G., Gobet, P., Harly, G., Buisson, M., Puygauthier-Toubas, D., Gabriel-Pospisil, G., Naciri, M., et Camerlynck, P.** 1996. Genotyping human and bovine isolates of *Cryptosporidium parvum* by polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism analysis of a repetitive DNA sequence. *FEMS Microbiol Lett*. **137**:207-211.
- Böttger, E. C.** 1990. Frequent contamination of Taq DNA polymerase with DNA. *Clin Chem*. **36**:1258-1259.
- Brunk, C. F., Li, J., et Avaniss-Aghajani, E.** 2002. Analysis of specific bacteria from environmental samples using a quantitative polymerase chain reaction. *Curr Issues Mol Biol*. **4**:13-18.
- Brasseur, P., Uguen, C., Moreno-Sabater, A., Favennec, L., et Ballet, J. J.** 1998. Viability of *Cryptosporidium parvum* oocysts in natural waters. *Folia Parasitol*. **45**:113-116.
- Bukhari, Z., McCuin, R. M., Fricker, C. R., et Clancy, J. L.** 1998. Immunomagnetic separation of *Cryptosporidium parvum* from source water samples of various turbidities. *Appl Environ Microbiol*. **64**:4495-4499.
- Bustin, S. A.** 2002. Quantification of mRNA using real-time reverse transcription PCR (RT-PCR): trends and problems. *J Mol Endocrinol*. **29**:23-39.
- Campbell, A. T., Robertson, L. J., et Smith, H. V.** 1992. Viability of *Cryptosporidium parvum* oocysts: correlation of in vitro excystation with inclusion or exclusion of fluorogenic vital dyes. *Appl. Environ. Microbiol*. **58**:132-136.
- Casemore, D. P.** 1990. Epidemiological aspects of human cryptosporidiosis. *Epidemiol Infect*. **104**:1-28.
- Casemore, D. P.** 1993. Is human cryptosporidiosis a zoonotic disease? *Lancet*. **342**:312.
- Casemore, D. P.** 1998. *Cryptosporidium* and the safety of our water supplies. *Commun Dis Public Health*. **1**:218-219.
- CCN.** *Cryptosporidium* Capsule newsletters, FS publishing, NY (USA).
- CDC.** 2000. Outbreak of gastroenteritis associated with an interactive water fountain at a beachside park-Florida, 1999. Centers for Disease Control and Prevention. *Jama*. **284**:688-690.
- CDC.** 2001. Protacted outbreaks of cryptosporidiosis associated with swimming pool use – Ohio and Nebraska 2000. Centers for Disease Control and Prevention. *Mor Mortal Wkly Rep*. **50**:406-412.
- Champlaud, D., Gobet, P., Naciri, M., Vagner, O., Lopez, J., Buisson, J. C., Varga, I., Harly, G., Mancassola, R., et Bonnin, A.** 1998. Failure to differentiate *Cryptosporidium parvum* from *C. meleagridis* based on PCR amplification of eight DNA sequences. *Appl Environ Microbiol*. **64**:1454-1458.
- Charles, P., Laîné, J. M., et Renaud, P.** 2000. Estimation du risque potentiel dû à la présence d'oocystes de *Cryptosporidium* dans l'eau. L'approche Lyonnaise des eaux. Présentation lors du congrès APTEN, Poitiers, France.
- Chesnot, T., Marly, X., Chevalier, S., Estevenon, O., Bues, M., et Schwartzbrod, J.** 2002. Optimised immunofluorescence procedure for enumeration of *Cryptosporidium parvum* oocyst suspensions. *Water Res*. **36**:3283-3288.
- Chrisp, C. E., et LeGendre, M.** 1994. Similarities and differences between DNA of *Cryptosporidium parvum* and *Cryptosporidium wrairi* detected by the polymerase chain reaction. *Folia Parasitol*. **41**:97-100.

- Chung, E., Aldom, J. E., Carreno, R. A., Chagla, A. H., Kostrzynska, M., Lee, H., Palmateer, G., Trevors, J. T., Unger, S., Xu, R., et De Grandis, S. A.** 1999. PCR-based quantitation of *Cryptosporidium parvum* in municipal water samples. *J Microbiol Methods*. **38**:119-130.
- Cirioni, O., Giacometti, A., Balducci, M., Drenaggi, D., Del Prete, M. S., et Scalise, G.** 1995. Anticryptosporidial activity of paromomycin. *J Infect Dis*. **172**:1169-1170.
- Clancy, J. L., Hargy, T. M., Marshall, M. M., et Dyksen, J. E.** 1998. UV light inactivation of *Cryptosporidium* oocysts. *J. AWWA*. **90**:92-102.
- Comes, A. M., Humbert, J. F., Cabaret, J., et Elard, L.** 1996. Using molecular tools for diagnosis in veterinary parasitology. *Vet Res*. **27**:333-342.
- Connolly, G. M., Forbes, A., Gleeson, J. A., et Gazzard, B. G.** 1990. The value of barium enema and colonoscopy in patients infected with HIV. *Aids*. **4**:687-689.
- Corless, C. E., Guiver, M., Borrow, R., Edwards-Jones, V., Kaczmarek, E. B., et Fox, A. J.** 2000. Contamination and sensitivity issues with a real-time universal 16S rRNA PCR. *J Clin Microbiol*. **38**:1747-1752.
- Cox, P., Fisher, I., Kastl, G., Jegatheesan, V., Warnecke, M., Angles, R., Bustamante, H. A., Chiffings, T., et Hawkins, P. R.** 2003. Sydney 1998 - lessons from a drinking water crisis. *Jour. AWWA*. **95**:147-161.
- Craik, S. A., Weldon, D., Finch, G. R., Bolton, J. R., et Belosevic, M.** 2001. Inactivation of *Cryptosporidium parvum* oocysts using medium- and low- pressure ultraviolet radiation. *Water Res*. **35**:1387-1398.
- Current, W. L., Reese, N. C., Ernst, J. V., Bailey, W. S., Heyman, M. B., et Weinstein, W. M.** 1983. Human cryptosporidiosis in immunocompetent and immunodeficient persons. Studies of an outbreak and experimental transmission. *N Engl J Med*. **308**:1252-1257.
- Current, W. L., et Garcia, L. S.** 1991. Cryptosporidiosis. *Clin Lab Med*. **11**:873-897.
- Dahlen, P., Iitia, A., Mukkala, V. M., Hurskainen, P., et Kwiatkowski, M.** 1991. The use of europium (Eu³⁺) labelled primers in PCR amplification of specific target DNA. *Mol Cell Probes*. **5**:143-149.
- D'Antonio, R. G., Winn, R. E., Taylor, J. P., Gustafson, T. L., Current, W. L., Rhodes, M. M., Gary, G. W., Jr., et Zajac, R. A.** 1985. A waterborne outbreak of cryptosporidiosis in normal hosts. *Ann Intern Med*. **103**:886-888.
- Datry, A., Sarfati, C., et Derouin, F.** 2000. "Enquête nationale de prévalence des microsporidioses, cryptosporidioses et giardiasis". Actes du Symposium International "L'eau, la santé et l'environnement", Rennes, 23-24 février. 1372-1376.
- Décret n° 2001-1220.** 2001. Décret du 20 décembre 2001 relatif aux eaux destinées à la consommation humaine, à l'exclusion des eaux minérales naturelles. *JO RF*. 20381-20399.
- De Graaf, D. C., Vanopdenbosch, E., Ortega-Mora, L. M., Abbassi, H., et Peeters, J. E.** 1999. A review of the importance of cryptosporidiosis in farm animals. *Int J Parasitol*. **29**:1269-1287.
- De Kok, J. B., Wiegerinck, E. T., Giesendorf, B. A., et Swinkels, D. W.** 2002. Rapid genotyping of single nucleotide polymorphisms using novel minor groove binding DNA oligonucleotides (MGB probes). *Hum Mutat*. **19**:554-559.
- Delaunay, A., Gargala, G., Li, X., Favennec, L., et Ballet, J. J.** 2000. Quantitative flow cytometric evaluation of maximal *Cryptosporidium parvum* oocyst infectivity in a neonate mouse model. *Appl Environ Microbiol*. **66**:4315-4317.
- De Roubin, M. R., Pharamond, J. S., Zanelli, F., Poty, F., Houdart, S., Laurent, F., Drocourt, J. L., et Van Poucke, S.** 2002. Application of laser scanning cytometry followed by epifluorescent and differential interference contrast microscopy for the detection and enumeration of *Cryptosporidium* and *Giardia* in raw and potable waters. *J Appl Microbiol*. **93**:599-607.

- Deng, M. Q., Cliver, D. O., et Mariam, T. W.** 1997. Immunomagnetic capture PCR to detect viable *Cryptosporidium parvum* oocysts from environmental samples. *Appl Environ Microbiol.* **63**:3134-3138.
- Deng, M. Q., et Cliver, D. O.** 1999. *Cryptosporidium parvum* studies with dairy products. *Int J Food Microbiol.* **46**:113-121.
- Desjardin, L. E., Chen, Y., Perkins, M. D., Teixeira, L., Cave, M. D., et Eisenach, K. D.** 1998. Comparison of the ABI 7700 system (TaqMan) and competitive PCR for quantification of IS6110 DNA in sputum during treatment of tuberculosis. *J Clin Microbiol.* **36**:1964-1968.
- Di Giovanni, G. D., Denhart, M., LeChevallier, M. W., et Abbaszadegan, M.** 1999. Presented at the Ninety-ninth general meeting, Chicago, Illinois.
- DiDomenico, N., Link, H., Knobel, R., Caratsch, T., Weschler, W., Loewy, Z. G., et Rosenstraus, M.** 1996. Cobas Amplicor: fully automated RNA and DNA amplification and detection system for routine diagnostic PCR. *Clin Chem.* **42**:1915-1923.
- Directive 98/83/CE.** 1998. Directive du conseil du 3 novembre 1998 relative à la qualité des eaux destinées à la consommation humaine. *JO C.L330*:32-54
- Drescher, A. C., Greene, D. M., et Gadgil, A. J.** 2001. *Cryptosporidium* inactivation by low-pressure UV in a water disinfection device. *J Environ Health.* **64**:31-35.
- Driscoll, M. S., Thomas, V. L., et Sanford, B. A.** 1988. Comment: *Cryptosporidium* infection in day-care centers. *Drug Intell Clin Pharm.* **22**:636.
- DuPont, H. L., Chappell, C. L., Sterling, C. R., Okhuysen, P. C., Rose, J. B., et Jakubowski, W.** 1995. The infectivity of *Cryptosporidium parvum* in healthy volunteers. *N Engl J Med.* **332**:855-859.
- DWI,** 1998. Standard operating protocol for the monitoring of *Cryptosporidium* oocysts in treated water supplies to satisfy water supply (water quality) (amendment) regulations. SI No. 1524. Drinking Water Inspectorate. UK.
- Egyed, Z., Sreter, T., Szell, Z., et Varga, I.** 2003. Characterization of *Cryptosporidium* spp.-recent developments and futur needs. *Vet Parasitol.* **111**:103-114.
- Fayer, R., et Leek, R. G.** 1984. The effects of reducing conditions, medium, pH, temperature, and time on in vitro excystation of *Cryptosporidium*. *J Protozool.* **31**:567-569.
- Fayer, R., et Ungar, B. L.** 1986. *Cryptosporidium* spp. and cryptosporidiosis. *Microbiol Rev.* **50**:458-483.
- Fayer, R.** 1994. Effects of high temperature on infectivity of *Cryptosporidium parvum* oocysts in water. *Appl Environ Microbiol.* **60**:2732-2735.
- Fayer, R., et Nerad, T.** 1996. Effects of low temperatures on viability of *Cryptosporidium parvum* oocysts. *Appl Environ Microbiol.* **62**:1431-1433.
- Fayer, R., Trout, J., et Nerad, T.** 1996. Effects of a wide range of temperatures on infectivity of *Cryptosporidium parvum* oocysts. *J Eukaryot Microbiol.* **43**:64S.
- Fayer, R. (ed.).** 1997. *Cryptosporidium and Cryptosporidiosis*, Boca Raton, CRC Press, New York, USA.
- Fayer, R., Morgan, U., et Upton, S. J.** 2000. Epidemiology of *Cryptosporidium*: transmission, detection and identification. *Int J Parasitol.* **30**:1305-1322.
- Finch, G. R., Black, E. K., Gyurek, L., et Belosevic, M.** 1993a. Ozone inactivation of *Cryptosporidium parvum* in demand-free phosphate buffer determined by in vitro excystation and animal infectivity. *Appl Environ Microbiol.* **59**:4203-4210.
- Finch, G. R., Daniels, C. W., Black, E. K., Schaefer, F. W., 3rd, et Belosevic, M.** 1993b. Dose response of *Cryptosporidium parvum* in outbred neonatal CD-1 mice. *Appl Environ Microbiol.* **59**:3661-3665.

- Fischer, M., Huber, W., Kallivroussis, A., Ott, P., Opravil, M., Luthy, R., Weber, R., et Cone, R. W.** 1999. Highly sensitive methods for quantitation of human immunodeficiency virus type 1 RNA from plasma, cells, and tissues. *J Clin Microbiol.* **37**:1260-1264.
- Fontaine, M., et Guillot, E.** 2002. Development of a TaqMan quantitative PCR assay specific for *Cryptosporidium parvum*. *FEMS Microbiol Lett.* **214**:13.
- Forgacs, P., Tarshis, A., Ma, P., Federman, M., Mele, L., Silverman, M. L., et Shea, J. A.** 1983. Intestinal and bronchial cryptosporidiosis in an immunodeficient homosexual man. *Ann Intern Med.* **99**:793-794.
- Freire-Santos, F., Oteiza-Lopez, A. M., Vergara-Castiblanco, C. A., et Ares-Mazas, E.** 2000. Study of the combined influence of environmental factors on viability of *Cryptosporidium parvum* oocysts in water evaluated by fluorogenic vital dyes and excystation techniques. *Vet Parasitol.* **89**:253-259.
- Frost, F. J., Calderon, R. L., Muller, T. B., Curry, M., Rodman, J. S., Moss, D. M., et de la Cruz, A. A.** 1998. A two-year follow-up survey of antibody to *Cryptosporidium* in Jackson County, Oregon following an outbreak of waterborne disease. *Epidemiol Infect.* **121**:213-217.
- Furtado, M. R., Murphy, R., et Wolinsky, S. M.** 1993. Quantification of human immunodeficiency virus type 1 tat mRNA as a marker for assessing the efficacy of antiretroviral therapy. *J Infect Dis.* **167**:213-216.
- Garcia, L. S., Brewer, T. C., et Bruckner, D. A.** 1988. Incidence of *Cryptosporidium* in all patients submitting stool specimens for ova and parasite examination: monoclonal antibody IFA method. *Diagn Microbiol Infect Dis.* **11**:25-27.
- Giacometti, A., Cirioni, O., Barchiesi, F., et Scalise, G.** 2000. Anticryptosporidial activity of ranalexin, lasalocid and azithromycin alone and in combination in cell lines. *J Antimicrob Chemother.* **45**:375-377.
- Gibbons, C. L., et Awad-El-Kariem, F. M.** 1999. Nested PCR for the detection of *Cryptosporidium parvum*. *Parasitol Today.* **15**:345.
- Glaberman, S., Moore, J. E., Lowery, C. J., Chalmers, R. M., Sulaiman, I., Elwin, K., Rooney, P. J., Millar, B. C., Dooley, J. S., Lal, A. A., et Xiao, L.** 2002. Three drinking-water-associated cryptosporidiosis outbreaks, Northern Ireland. *Emerg Infect Dis.* **8**:631-633.
- Gomez-Bautista, M., Ortega-Mora, L. M., Tabares, E., Lopez-Rodas, V., et Costas, E.** 2000. Detection of infectious *Cryptosporidium parvum* oocysts in mussels (*Mytilus galloprovincialis*) and cockles (*Cerastoderma edule*). *Appl Environ Microbiol.* **66**:1866-1870.
- Goodgame, R. W., Genta, R. M., White, A. C., et Chappell, C. L.** 1993. Intensity of infection in AIDS-associated cryptosporidiosis. *J Infect Dis.* **167**:704-709.
- Gooze, L., Kim, K., Petersen, C., Gut, J., et Nelson, R. G.** 1991. Amplification of a *Cryptosporidium parvum* gene fragment encoding thymidylate synthase. *J Protozool.* **38**:56S-58S.
- Glaser, C. A., Safrin, S., Reingold, A., et Newman, T. B.** 1998. Association between *Cryptosporidium* infection and animal exposure in HIV-infected individuals. *J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol.* **17**:79-82.
- Graczyk, T. K., Cranfield, M. R., et Fayer, R.** 1996. Evaluation of commercial enzyme immunoassay (EIA) and immunofluorescent antibody (FA) test kits for detection of *Cryptosporidium* oocysts of species other than *Cryptosporidium parvum*. *Am J Trop Med Hyg.* **54**:274-279.

Guyonnet, J. P., et Claudet, J., 2002. Epidémie de gastro-entérite aiguë à *Cryptosporidium* liée à la pollution des eaux d'alimentation de la ville de Sète. Tech Sc Méthodes. **1**:23-29

Guyot, K., Follet-Dumoulin, A., Recourt, C., Lelievre, E., Cailliez, J. C., et Dei-Cas, E. 2002. PCR-restriction fragment length polymorphism analysis of a diagnostic 452-base-pair DNA fragment discriminates between *Cryptosporidium parvum* and *C. meleagridis* and between *C. parvum* isolates of human and animal origin. Appl Environ Microbiol. **68**:2071-2076.

Haas, C. N. 1994. Reconciliation of microbial risk models and outbreaks epidemiology: the case of the Milwaukee outbreak. Presented at the Proc. Ann. Conf. AWWA, New York, 5-9 June:517-522.

Haberhausen, G., Pinsl, J., Kuhn, C. C., et Markert-Hahn, C. 1998. Comparative study of different standardization concepts in quantitative competitive reverse transcription-PCR assays. J Clin Microbiol. **36**:628-633.

Hallier-Soulier, S., et Guillot, E. 1999. An immunomagnetic separation polymerase chain reaction assay for rapid and ultra-sensitive detection of *Cryptosporidium parvum* in drinking water. FEMS Microbiol Lett. **176**:285-289.

Hallier-Soulier, S., et Guillot, E. 1999b. Presented at the 99th general meeting of American Society for Microbiology, Chicago, I.L.

Hallier-Soulier, S., et Guillot, E. 2000. Detection of cryptosporidia and *Cryptosporidium parvum* oocysts in environmental water samples by immunomagnetic separation-polymerase chain reaction. J Appl Microbiol. **89**:5-10.

Hallier-Soulier, S., et Guillot, E. 2003. An immunomagnetic separation-reverse transcription- PCR (IMS RT-PCR) test for sensitive and rapid detection of viable waterborne *Cryptosporidium parvum*. Environ Microbiol. **5**:592-598.

Haugland, R. A., Vesper, S. J., et Wymer, L. J. 1999. Quantitative measurement of *Stachybotrys chartarum* conidia using real time detection of PCR products with the TaqMan(TM)fluorogenic probe system. Mol Cell Probes. **13**:329-340.

Haugland, R. A., Brinkman, N., et Vesper, S. J. 2002. Evaluation of rapid DNA extraction methods for the quantitative detection of fungi using real-time PCR analysis. J Microbiol Methods. **50**:319-323.

Hayes, E. B., Matte, T. D., O'Brien, T. R., McKinley, T. W., Logsdon, G. S., Rose, J. B., Ungar, B. L., Word, D. M., Pinsky, P. F., Cummings, M. L. 1989. Large community outbreak of cryptosporidiosis due to contamination of a filtered public water supply. N Engl J Med. **320**:1372-1376.

Heid, C. A., Stevens, J., Livak, K. J., et Williams, P. M. 1996. Real time quantitative PCR. Genome Res. **6**:986-994.

Herman, L. 1997. Detection of viable and dead *Listeria monocytogenes* by PCR. Food Microbiol. **14**:103-110.

Higgins, J. A., Fayer, R., Trout, J. M., Xiao, L., Lal, A. A., Kerby, S., et Jenkins, M. C. 2001. Real-time PCR for the detection of *Cryptosporidium parvum*. J Microbiol Methods. **47**:323-337.

Higuchi, R., Dollinger, G., Walsh, P. S., et Griffith, R. 1992. Simultaneous amplification and detection of specific DNA sequences. Biotechnology (NY). **10**:413-417.

Higuchi, R., Fockler, C., Dollinger, G., et Watson, R. 1993. Kinetic PCR analysis: real-time monitoring of DNA amplification reactions. Biotechnology (NY). **11**:1026-1030.

- Holland, P. M., Abramson, R. D., Watson, R., et Gelfand, D. H.** 1991. Detection of specific polymerase chain reaction product by utilizing the 5'-3' exonuclease activity of *Thermus aquaticus* DNA polymerase. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **88**:7276-7280.
- Howe, A. D., Forster, S., Morton, S., Marshall, R., Osborn, K. S., Wright, P., et Hunter, P. R.** 2002. *Cryptosporidium* oocysts in a water supply associated with a cryptosporidiosis outbreak. *Emerg Infect Dis.* **8**:619-624.
- Holland, J. L., Louie, L., Simor, A. E., et Louie, M.** 2000. PCR detection of *Escherichia coli* O157:H7 directly from stools: evaluation of commercial extraction methods for purifying fecal DNA. *J Clin Microbiol.* **38**:4108-4113.
- Hsu, B. M., et Huang, C.** 2001. Performances of the immunomagnetic separation method for *Cryptosporidium* in water under various operation conditions. *Biotechnol Prog.* **17**:1114-1118.
- Jauregui, L. H., Higgins, J., Zarlenga, D., Dubey, J. P., et Lunney, J. K.** 2001. Development of a real-time PCR assay for detection of *Toxoplasma gondii* in pig and mouse tissues. *J Clin Microbiol.* **39**:2065-2071.
- Jenkins, M. C., Trout, J., Abrahamsen, M. S., Lancto, C. A., Higgins, J., et Fayer, R.** 2000. Estimating viability of *Cryptosporidium parvum* oocysts using reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR) directed at mRNA encoding amyloglucosidase. *J Microbiol Methods.* **43**:97-106.
- Jenkins, M., Trout, J. M., Higgins, J., Dorsch, M., Veal, D., et Fayer, R.** 2003. Comparison of tests for viable and infectious *Cryptosporidium parvum* oocysts. *Parasitol Res.* **89**:1-5.
- Jin, C. F., Mata, M., et Fink, D. J.** 1994. Rapid construction of deleted DNA fragments for use as internal standards in competitive PCR. *PCR Methods Appl.* **3**:252-255.
- Johnson, D. W., Pieniazek, N. J., et Rose, J. B.** 1993. DNA probe hybridization and PCR detection of *Cryptosporidium* compared to immunofluorescence assay. *Wat Sci Tech* **27**:77-84.
- Johnson, D. W., Pieniazek, N. J., Griffin, D. W., Misener, L., et Rose, J. B.** 1995. Development of a PCR protocol for sensitive detection of *Cryptosporidium* oocysts in water samples. *Appl Environ Microbiol.* **61**:3849-3855.
- Jokipii, L., Pohjola, S., et Jokipii, A. M.** 1983. *Cryptosporidium*: a frequent finding in patients with gastrointestinal symptoms. *Lancet.* **2**:358-361.
- Joseph, C., Hamilton, G., O'Connor, M., Nicholas, S., Marshall, R., Stanwell-Smith, R., Sims, R., Ndawula, E., Casemore, D., Gallagher, P.** 1991. Cryptosporidiosis in the Isle of Thanet; an outbreak associated with local drinking water. *Epidemiol Infect.* **107**:509-519.
- Kafatos, F. C., Jones, C. W., et Efstratiadis, A.** 1979. Determination of nucleic acid sequence homologies and relative concentrations by a dot hybridization procedure. *Nucleic Acids Res.* **7**:1541-1552.
- Kaucner, C., et Stinear, T.** 1998. Sensitive and rapid detection of viable *Giardia* cysts and *Cryptosporidium parvum* oocysts in large-volume water samples with wound fiberglass cartridge filters and reverse transcription-PCR. *Appl Environ Microbiol.* **64**:1743-1749.
- Keegan, A. R., Fanok, S., Monis, P., et Saint, C. P.** 2003. Cell culture-TaqMan PCR assay for evaluation of *Cryptosporidium parvum* Disinfection. *Appl Environ Microbiol.* **69**:2505-2511.
- Kofler, B. et Klausegger, A.** 1999. Simplified PCR set-up using a frozen preformulated mix for detection of *Cytomegalovirus*. *Diagn Microbiol Infect Dis.* **1**:33-35.

- Korich, D. G., Mead, J. R., Madore, M. S., Sinclair, N. A., et Sterling, C. R.** 1990. Effects of ozone, chlorine dioxide, chlorine, and monochloramine on *Cryptosporidium parvum* oocyst viability. *Appl Environ Microbiol.* **56**:1423-1428.
- Kostrzynska, M., Sankey, M., Haack, E., Power, C., Aldom, J. E., Chagla, A. H., Unger, S., Palmateer, G., Lee, H., Trevors, J. T., et De Grandis, S. A.** 1999. Three sample preparation protocols for polymerase chain reaction based detection of *Cryptosporidium parvum* in environmental samples. *J Microbiol Methods.* **35**:65-71.
- Koudela, B., et Modry, D.** 1998. New species of *Cryptosporidium* (Apicomplexa, *Cryptosporidiidae*) from lizards. *Folia Parasitol.* **45**:273-281.
- Kramer, M. H., Herwaldt, B. L., Craun, G. F., Calderon, R. L., et Juranek, D. D.** 1996. Surveillance for waterborne-disease outbreaks--United States, 1993-1994. *Mor Mortal Wkly Rep CDC Surveill Summ.* **45**:1-33.
- Kuroki, T., Watanabe, Y., Asai, Y., Yamai, S., Endo, T., Uni, S., Kimata, I., et Iseki, M.** 1996. An outbreak of waterborne Cryptosporidiosis in Kanagawa, Japan. *Kansenshogaku Zasshi.* **70**:132-140.
- Kutyavin, I. V., Afonina, I. A., Mills, A., Gorn, V. V., Lukhtanov, E. A., Belousov, E. S., Singer, M. J., Walburger, D. K., Lokhov, S. G., Gall, A. A., Dempcy, R., Reed, M. W., Meyer, R. B., et Hedgpeth, J.** 2000. 3'-minor groove binder-DNA probes increase sequence specificity at PCR extension temperatures. *Nucleic Acids Res.* **28**:655-661.
- Laberge, I., et Griffiths, M. W.** 1996. Prevalence, detection and control of *Cryptosporidium parvum* in food. *Int J Food Microbiol.* **32**:1-26.
- Laxer, M. A., Timblin, B. K., et Patel, R. J.** 1991. DNA sequences for the specific detection of *Cryptosporidium parvum* by the polymerase chain reaction. *Am J Trop Med Hyg.* **45**:688-694.
- Lebbad, M., Norrgren, H., Naucier, A., Dias, F., Andersson, S., et Linder, E.** 2001. Intestinal parasites in HIV-2 associated AIDS cases with chronic diarrhoea in Guinea-Bissau. *Acta Trop.* **80**:45-49.
- LeChevallier, M. W., Norton, W. D., et Lee, R. G.** 1991. Occurrence of *Giardia* and *Cryptosporidium* spp. in surface water supplies. *Appl Environ Microbiol.* **57**:2610-2616.
- LeChevallier, M. W., Norton, W. D., Siegel, J. E., et Abbaszadegan, M.** 1995. Evaluation of the immunofluorescence procedure for detection of *Giardia* cysts and *Cryptosporidium* oocysts in water. *Appl Environ Microbiol.* **61**:690-697.
- Lee, M. A., Brightwell, G., Leslie, D., Bird, H., et Hamilton, A.** 1999. Fluorescent detection techniques for real-time multiplex strand specific detection of *Bacillus anthracis* using rapid PCR. *J Appl Microbiol.* **87**:218-223.
- Lesné, J.** 2001. Cryptosporidiose et usage de l'eau: point sur le risque sanitaire. *Tech sc Methodes.* **12**:24-31.
- Leutenegger, C. M., Pusterla, N., Mislin, C. N., Weber, R., et Lutz, H.** 1999. Molecular evidence of coinfection of ticks with *Borrelia burgdorferi* sensu lato and the human *granulocytic ehrlichiosis* agent in Switzerland. *J Clin Microbiol.* **37**:3390-3391.
- Levine, N. D.** 1984. Taxonomy and review of the coccidian genus *Cryptosporidium* (Protozoa, Apicomplexa). *J Protozool.* **31**:94-98.
- Limor, J. R., Lal, A. A., et Xiao, L.** 2002. Detection and differentiation of *Cryptosporidium* parasites that are pathogenic for humans by real-time PCR. *J Clin Microbiol.* **40**:2335-2338.
- Lindsay, D. S., Upton, S. J., Owens, D. S., Morgan, U. M., Mead, J. R., et Blagburn, B. L.** 2000. *Cryptosporidium andersoni* n. sp. (Apicomplexa: *Cryptosporidiidae*) from cattle, *Bos taurus*. *J Eukaryot Microbiol.* **47**:91-95.
- Lisle, J. T., et Rose, J. B.** 1995. *Cryptosporidium* contamination of water in the USA and UK: a mini-review. *J. Water Supply Res. Technol.-Aqua.* **44**:103-117.

- Livak, K. J., Flood, S. J. A., Marmaro, J., Giusti, W., et Deetz, K.** 1995. Oligonucleotides with fluorescent dyes at opposite ends provide a quenched probe system useful for detecting PCR product and nucleic acid hybridization. *PCR Methods Appl.* **4**:357-362.
- Loge, F. J., Thompson, D. E., et Call, D. R.** 2002. PCR detection of specific pathogens in water: a risk-based analysis. *Environ Sci Technol.* **36**:2754-2759.
- Lorthioy, A., et Dumoutier, N.** 1999. Méthode de détection de *Giardia* et *Cryptosporidium* dans les eaux. Etude interne CIRSEE. ref: PFA/REP/99.010:1-13.
- Lowery, C. J., Moore, J. E., Millar, B. C., Burke, D. P., McCorry, K. A., Crothers, E., et Dooley, J. S.** 2000. Detection and speciation of *Cryptosporidium* spp. in environmental water samples by immunomagnetic separation, PCR and endonuclease restriction. *J Med Microbiol.* **49**:779-785.
- Lowery, C. J., Nugent, P., Moore, J. E., Millar, B. C., Xiru, X., et Dooley, J. S.** 2001. PCR-IMS detection and molecular typing of *Cryptosporidium parvum* recovered from a recreational river source and an associated mussel (*Mytilus edulis*) bed in Northern Ireland. *Epidemiol Infect.* **127**:545-553.
- Lyons, S. R., Griffen, A. L., et Leys, E. J.** 2000. Quantitative real-time PCR for *Porphyromonas gingivalis* and total bacteria. *J Clin Microbiol.* **38**:2362-2365.
- Ma, P., et Soave, R.** 1983. Three-step stool examination for cryptosporidiosis in 10 homosexual men with protracted watery diarrhea. *J Infect Dis.* **147**:824-828.
- Mackay, I. M., Arden, K. E., et Nitsche, A.** 2002. Real time PCR in virology. *Nucleic Acids Res.* **30**:1292-1305.
- MacKenzie, W. R., Hoxie, N. J., Proctor, E. M., Gradus, M. S., Blari, K., Peterson, D. E., Kazmierczak, J. J., et Davis, J. P.** 1994. A massive outbreak in Milwaukee of *Cryptosporidium* infection transmitted through the public water supply. *New Eng. J. Med.* **331**:161-167.
- MacKenzie, W. R., Schell, W. L., Blair, K. A., Addiss, D. G., Peterson, D. E., Hoxie, N. J., Kazmierczak, J. J., et Davis, J. P.** 1995. Massive outbreak of waterborne *Cryptosporidium* infection in Milwaukee, Wisconsin: recurrence of illness and risk of secondary transmission. *Clin Infect Dis.* **21**:57-62.
- MacPherson, D. W., et McQueen, R.** 1993. Cryptosporidiosis: multiattribute evaluation of six diagnostic methods. *J Clin Microbiol.* **31**:198-202.
- Manganelli, R., Dubnau, E., Tyagi, S., Kramer, F. R., et Smith, I.** 1999. Differential expression of 10 sigma factor genes in *Mycobacterium tuberculosis*. *Mol Microbiol.* **31**:715-724.
- Marshall, A. T., et LaMont, J. T.** 1997. Cryptosporidiosis and public health. *Hosp Pract Off Ed.* **32**:11, 15-16, 23.
- Martell, M., Gomez, J., Esteban, J. I., Sauleda, S., Quer, J., Cabot, B., Esteban, R., et Guardia, J.** 1999. High-throughput real-time reverse transcription-PCR quantitation of hepatitis C virus RNA. *J Clin Microbiol.* **37**:327-332.
- Mayer, C. L., et Palmer, C. J.** 1996. Evaluation of PCR, nested PCR, and fluorescent antibodies for detection of *Giardia* and *Cryptosporidium* species in wastewater. *Appl Environ Microbiol.* **62**:2081-2085.
- McAvin, J. C., Reilly, P. A., Roudabush, R. M., Barnes, W. J., Salmen, A., Jackson, G. W., Beninga, K. K., Astorga, A., McCleskey, F. K., Huff, W. B., Niemeyer, D., et Lohman, K. L.** 2001. Sensitive and specific method for rapid identification of *Streptococcus pneumoniae* using real-time fluorescence PCR. *J Clin Microbiol.* **39**:3446-3451.

- McDonald, L. M., Sargent, K., Armson, A., Thompson, R. C., et Reynoldson, J. A.** 2002. The development of a real-time quantitative-PCR method for characterisation of a *Cryptosporidium parvum* in vitro culturing system and assessment of drug efficacy. *Mol Biochem Parasitol.* **121**:279-282.
- McKillip, J. L., Jaykus, L. A., et Drake, M.** 1998. rRNA stability in heat-killed and UV-irradiated enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* O157:H7. *Appl Environ Microbiol.* **64**:4264-4268.
- McKillip, J. L., Jaykus, L. A., et Drake, M.** 1999. Nucleic acid persistence in heat-killed *Escherichia coli* O157:H7 from contaminated skim milk. *J Food Prot.* **62**:839-844.
- McLauchlin, J., Pedraza-Diaz, S., Amar-Hoetzeneder, C., et Nichols, G. L.** 1999. Genetic characterization of *Cryptosporidium* strains from 218 patients with diarrhea diagnosed as having sporadic cryptosporidiosis. *J Clin Microbiol.* **37**:3153-3158.
- Medema, G. J.** (ed.) 1999. *Cryptosporidium* and *Giardia*: new challenges to the water industry. Ipskamp, Amsterdam.
- Meisel, J. L., Perera, D. R., Meligro, C., et Rubin, C. E.** 1976. Overwhelming watery diarrhea associated with a *Cryptosporidium* in an immunosuppressed patient. *Gastroenterology.* **70**:1156-1160.
- Meuten, D. J., Van Kruiningen, H. J., et Lein, D. H.** 1974. Cryptosporidiosis in a calf. *J Am Vet Med Assoc.* **165**:914-917.
- Miller, N. M., et van den Ende, J.** 1986. Seasonal prevalence of *Cryptosporidium* associated diarrhoea in young children. *S Afr Med J.* **70**:636-637.
- Miller, T. L., Winter, H. S., Luginbuhl, L. M., Orav, E. J., et McIntosh, K.** 1992. Pancreatitis in pediatric human immunodeficiency virus infection. *J Pediatr.* **120**:223-227.
- Mohandas, Sehgal, R., Sud, A., et Malla, N.** 2002. Prevalence of intestinal parasitic pathogens in HIV-seropositive individuals in Northern India. *Jpn J Infect Dis.* **55**:83-84.
- Monis, P. T., et Saint, C. P.** 2001. Development of a nested-PCR assay for the detection of *Cryptosporidium parvum* in finished water. *Water Res.* **35**:1641-1648.
- Monteiro, L., Gras, N., Vidal, R., Cabrita, J., et Megraud, F.** 2001. Detection of *Helicobacter pylori* DNA in human feces by PCR: DNA stability and removal of inhibitors. *J Microbiol Methods.* **45**:89-94.
- Moore, A. C., Herwaldt, B. L., Craun, G. F., Calderon, R. L., Highsmith, A. K., et Juranek, D. D.** 1993. Surveillance for waterborne disease outbreaks--United States, 1991-1992. *Mor Mortal Wkly Rep CDC Surveill Summ.* **42**:1-22.
- Moreti, T., Koons, B., et Budowle, B.** 1998. Enhancement of PCR amplification yield and specificity using AmpliTaq Gold DNA polymerase. *Biotechniques.* **25**:716-722.
- Morgan, U. M., Constantine, C. C., O'Donoghue, P., Meloni, B. P., O'Brien, P. A., et Thompson, R. C.** 1995. Molecular characterization of *Cryptosporidium* isolates from humans and other animals using random amplified polymorphic DNA analysis. *Am J Trop Med Hyg.* **52**:559-564.
- Morgan, U. M., et Thompson, R. C.** 1998. PCR detection of *Cryptosporidium*: the way forward? *Parasitol. Today.* **14**:241-245.
- Morgan, U. M., Deplazes, P., Forbes, D. A., Spano, F., Hertzberg, H., Sargent, K. D., Elliot, A., et Thompson, R. C.** 1999a. Sequence and PCR-RFLP analysis of the internal transcribed spacers of the rDNA repeat unit in isolates of *Cryptosporidium* from different hosts. *Parasitology.* **118**:49-58.
- Morgan, U. M., et Thompson, R. C.** 1999. The importance of genotyping isolates before assigning species. *Parasitol Today.* **15**:80-81.

- Morgan, U. M., Monis, P. T., Fayer, R., Deplazes, P., et Thompson, R. C.** 1999b. Phylogenetic relationships among isolates of *Cryptosporidium*: evidence for several new species. *J Parasitol.* **85**:1126-1133.
- Morgan, U. M., Xiao, L., Fayer, R., Lal, A. A., et Thompson, R. C.** 1999b. Variation in *Cryptosporidium*: towards a taxonomic revision of the genus. *Int J Parasitol.* **29**:1733-1751.
- Morgan, U. M., Xiao, L., Hill, B. D., O'Donoghue, P., Limor, J., Lal, A., et Thompson, R. C.** 2000. Detection of the *Cryptosporidium parvum* "human" genotype in a dugong (Dugong dugon). *J Parasitol.* **86**:1352-1354.
- Morgan, U., Xiao, L., Sulaiman, I., Weber, R., Lal, A. A., Thompson, R. C., et Deplazes, P.** 1999a. Which genotypes/species of *Cryptosporidium* are humans susceptible too? *J Eukaryot Microbiol.* **46**:42S-43S.
- Musial, C. E., Arrowood, M. J., Sterling, C. R., et Gerba, C. P.** 1987. Detection of *Cryptosporidium* in water by using polypropylene cartridge filters. *Appl Environ Microbiol.* **53**:687-692.
- Nahrstedt, A., et Gimbel, R.** 1996. A statistical method for determining the reliability of the analytical results in the detection of *Cryptosporidium* and *Giardia* in water. *J. Water SRT-Aqua.* **45**:101-111.
- Navin, T. R., et Juranek, D. D.** 1984. Cryptosporidiosis: clinical, epidemiologic, and parasitologic review. *Rev Infect Dis.* **6**:313-327.
- Neumann, N. F., Gyurek, L. L., Finch, G. R., et Belosevic, M.** 2000a. Intact *Cryptosporidium parvum* oocysts isolated after in vitro excystation are infectious to neonatal mice. *FEMS Microbiol Lett.* **183**:331-336.
- Neumann, N. F., Gyurek, L. L., Gammie, L., Finch, G. R., et Belosevic, M.** 2000b. Comparison of animal infectivity and nucleic acid staining for assessment of *Cryptosporidium parvum* viability in water. *Appl Environ Microbiol.* **66**:406-412.
- Newman, R. D., Jaeger, K. L., Wuhib, T., Lima, A. A., Guerrant, R. L., et Sears, C. L.** 1993. Evaluation of an antigen capture enzyme-linked immunosorbent assay for detection of *Cryptosporidium* oocysts. *J Clin Microbiol.* **31**:2080-2084.
- Nieminski, E. C., Schaefer, F. W., 3rd, et Ongerth, J. E.** 1995. Comparison of two methods for detection of *Giardia* cysts and *Cryptosporidium* oocysts in water. *Appl Environ Microbiol.* **61**:1714-1719.
- Nime, F. A., Burek, J. D., Page, D. L., Holscher, M. A., et Yardley, J. H.** 1976. Acute enterocolitis in a human being infected with the protozoan *Cryptosporidium*. *Gastroenterology.* **70**:592-598.
- Nutrition.** 1992 (révisé le 7 janvier 2003), posting date. *Cryptosporidium parvum* in: Foodborne Pathogenic Microorganisms and Natural Toxins Handbook. Center for Food Safety & Applied Nutrition U.S. Food & Drug Administration. [<http://vm.cfsan.fda.gov/~mow/chap24.html>].
- Nuyts, S., Van Mellaert, L., Lambin, P., et Anné, J.** 2001. Efficient isolation of total RNA from *Clostridium* without DNA contamination. *J Microbiol Methods.* **44**:235-238.
- O'Donoghue, P. J.** 1995. *Cryptosporidium* and cryptosporidiosis in man and animals. *Int J Parasitol.* **25**:139-195.
- Okhuysen, P. C., Chappell, C. L., Crabb, J. H., Sterling, C. R., et DuPont, H. L.** 1999. Virulence of three distinct *Cryptosporidium parvum* isolates for healthy adults. *J Infect Dis.* **180**:1275-1281.
- Okhuysen, P. C., et Chappell, C. L.** 2002. *Cryptosporidium* virulence determinants--are we there yet? *Int J Parasitol.* **32**:517-525.
- Ongerth, J. E., et Stibbs, H. H.** 1987. Identification of *Cryptosporidium* oocysts in river water. *Appl Environ Microbiol.* **53**:672-676.

- Patel, S., Pedraza-Diaz, S., McLauchlin, J., et Casemore, D. P.** 1998. Molecular characterisation of *Cryptosporidium parvum* from two large suspected waterborne outbreaks. Outbreak Control Team South and West Devon 1995, Incident Management Team and Further Epidemiological and Microbiological Studies Subgroup North Thames 1997. *Commun Dis Public Health*. **1**:231-233.
- Pedraza-Diaz, S., Amar, C. F., McLauchlin, J., Nichols, G. L., Cotton, K. M., Godwin, P., Iversen, A. M., Milne, L., Mulla, J. R., Nye, K., Panigrahl, H., Venn, S. R., Wiggins, R., Williams, M., et Youngs, E. R.** 2001. *Cryptosporidium meleagridis* from humans: molecular analysis and description of affected patients. *J Infect*. **42**:243-250.
- Peng, M. M., Xiao, L., Freeman, A. R., Arrowood, M. J., Escalante, A. A., Weltman, A. C., Ong, C. S., Mac Kenzie, W. R., Lal, A. A., et Beard, C. B.** 1997. Genetic polymorphism among *Cryptosporidium parvum* isolates: evidence of two distinct human transmission cycles. *Emerg Infect Dis*. **3**:567-573.
- Pezzana, A., Sarrette, B., Lefebvre, L., Lesne, J., André, J., Chambon, P., et Vilagines, R.** 1997. Evaluation des cartouches en polyethersulfone " envirochek " pour la concentration d'oocystes de *Cryptosporidium parvum* à partir des échantillons de 100 litres d'eau de distribution. *Journal européen d'hydrologie*. **28**:141-153.
- Pieniazek, N. J., Bornay-Llinares, F. J., Slemenda, S. B., da Silva, A. J., Moura, I. N., Arrowood, M. J., Ditrich, O., et Addiss, D. G.** 1999. New *Cryptosporidium* genotypes in HIV-infected persons. *Emerg Infect Dis*. **5**:444-449.
- Pokorny, N. J., Weir, S. C., Carreno, R. A., Trevors, J. T., et Lee, H.** 2002. Influence of temperature on *Cryptosporidium parvum* oocyst infectivity in river water samples as detected by tissue culture assay. *J Parasitol*. **88**:641-643.
- Puech, M. C., McAnulty, J. M., Lesjak, M., Shaw, N., Heron, L., et Watson, J. M.** 2001. A statewide outbreak of cryptosporidiosis in New South Wales associated with swimming at public pools. *Epidemiol Infect*. **126**:389-396.
- Pusterla, N., Huder, J. B., Leutenegger, C. M., Braun, U., Madigan, J. E., et Lutz, H.** 1999. Quantitative real-time PCR for detection of members of the *Ehrlichia phagocytophila* genogroup in host animals and *Ixodes ricinus* ticks. *J Clin Microbiol*. **37**:1329-1331.
- Quintero-Betancourt, W., Peele, E. R., et Rose, J. B.** 2002. *Cryptosporidium parvum* and *Cyclospora cayetanensis*: a review of laboratory methods for detection of these waterborne parasites. *J Microbiol Methods*. **49**:209-224.
- Rand, K. H., et Houck, H.** 1990. Taq polymerase contains bacterial DNA of unknown origin. *Mol. Cell. Probes*. **4**:445-450.
- Reynolds, D. T., Slade, R. B., Sykes, N. J., Jonas, A., et Fricker, C. R.** 1999. Detection of *Cryptosporidium* oocysts in water: techniques for generating precise recovery data. *J Appl Microbiol*. **87**:804-813.
- Richardson, A. J., Frankenberg, R. A., Buck, A. C., Selkon, J. B., Colbourne, J. S., Parsons, J. W., et Mayon-White, R. T.** 1991. An outbreak of waterborne cryptosporidiosis in Swindon and Oxfordshire. *Epidemiol Infect*. **107**:485-495.
- Rimhanen-Finne, R., Ronkainen, P., et Hanninen, M. L.** 2001. Simultaneous detection of *Cryptosporidium parvum* and *Giardia* in sewage sludge by IC-PCR. *J Appl Microbiol*. **91**:1030-1035.
- Robertson, L. J., Campbell, A. T., et Smith, H. V.** 1992. Survival of *Cryptosporidium parvum* oocysts under various environmental pressures. *Appl Environ Microbiol*. **58**:3494-3500.
- Robertson, L. J., Campbell, A. T., et Smith, H. V.** 1993. In vitro excystation of *Cryptosporidium parvum*. *Parasitology*. **106**:13-19.

- Robertson, L. J., Campbell, A. T., et Smith, H. V.** 1998. Viability of *Cryptosporidium parvum* oocysts: assessment by the dye permeability assay. *Appl Environ Microbiol.* **64**:3544-3545.
- Rochelle, P. A., Ferguson, D. M., Handojo, T. J., De Leon, R., Stewart, M. H., et Wolfe, R. L.** 1996. Development of a rapid detection procedure for *Cryptosporidium*, using *in vitro* cell culture combined with PCR. *J. Euk. Microbiol.* **43**:72S.
- Rochelle, P. A., De Leon, R., Stewart, M. H., et Wolfe, R. L.** 1997a. Comparison of primers and optimization of PCR conditions for detection of *Cryptosporidium parvum* and *Giardia lamblia* in water. *Appl Environ Microbiol.* **63**:106-114.
- Rochelle, P. A., Ferguson, D. M., Handojo, T. J., De Leon, R., Stewart, M. H., et Wolfe, R. L.** 1997b. An assay combining cell culture with reverse transcriptase PCR to detect and determine the infectivity of waterborne *Cryptosporidium parvum*. *Appl Environ Microbiol.* **63**:2029-2037.
- Rochelle, P. A., De Leon, R., Johnson, A., Stewart, M. H., et Wolfe, R. L.** 1999. Evaluation of immunomagnetic separation for recovery of infectious *Cryptosporidium parvum* oocysts from environmental samples. *Appl Environ Microbiol.* **65**:841-845.
- Rochelle, P. A., De Leon, R., Stewart, M. H., et Wolfe, R. L.** 1999. Detection, viability and infectivity of waterborne *Cryptosporidium*. *Recent Res. Devel. Microbiol.* **3**:41-54.
- Rochelle, P. A., Marshall, M. M., Mead, J. R., Johnson, A. M., Korich, D. G., Rosen, J. S., et De Leon, R.** 2002. Comparison of *in vitro* cell culture and a mouse assay for measuring infectivity of *Cryptosporidium parvum*. *Appl Environ Microbiol.* **68**:3809-3817.
- Rodgers, M. R., Flanagan, D. J., et Jakubowski, W.** 1995. Identification of algae which interfere with the detection of *Giardia* cysts and *Cryptosporidium* oocysts and a method for alleviating this interference. *Appl Environ Microbiol.* **61**:3759-3763.
- Rose, J. B., Kaye, D., Madore, M.S., Gerba, C.P., Arrowood, M.J. et Sterling, C.R.** 1988. Methods for the recovery of *Giardia* and *Cryptosporidium* from environmental waters and their comparative occurrence. Calgary (Canada), University of Calgary Press: 205-209.
- Rose, J. B., Lisle, J. T., et LeChevallier, M. W.** 1997. Waterborne cryptosporidiosis: incidence, outbreaks, and treatment strategies. *Cryptosporidium* and cryptosporidiosis, Fayer, R. ed., Boca Raton (USA), CRC Press:100.
- Rushton, P., Place, B. M., et Lightfoot, N. F.** 2000. An evaluation of a laser scanning device for the detection of *Cryptosporidium parvum* in treated water samples. *Lett Appl Microbiol.* **30**:303-307.
- Ryncarz, A. J., Goddard, J., Wald, A., Huang, M. L., Roizman, B., et Corey, L.** 1999. Development of a high-throughput quantitative assay for detecting herpes simplex virus DNA in clinical samples. *J Clin Microbiol.* **37**:1941-1947.
- Saiki, R. K., Scharf, S., Faloona, F., Mullis, K. B., Horn, G. T., Erlich, H. A., et Arnheim, N.** 1985. Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science.* **230**:1350-1354.
- Saiki, R. K., Walsh, P. S., Levenson, C. H., et Erlich, H. A.** 1989. Genetic analysis of amplified DNA with immobilized sequence-specific oligonucleotide probes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **86**:6230-6234.
- Saksirisampant, W., Eampokalap, B., Rattanasrithong, M., Likansakul, S., Wiwanitkit, V., Nasingkarn, A., et Denmasae, N.** 2002. A prevalence of *Cryptosporidium* infections among Thai HIV-infected patients. *J Med Assoc Thai.* **85 Suppl 1**:S424-428.
- Schmidt, T. M., Pace, B., et Pace, N.** 1991. Detection of DNA contamination in Taq DNA polymerase. *Biotechniques.* **11**:176-177.
- Schwartzbrod, L.** 1991. Virus et milieu hydrique, Lavoisier ed., Paris (France).

- Shepherd, K. M., et Wyn-Jones, A. P.** 1996. An evaluation of methods for the simultaneous detection of *Cryptosporidium* oocysts and *Giardia* cysts from water. *Appl Environ Microbiol.* **62**:1317-1322.
- Sheridan, G. E., Masters, C. I., Shallcross, J. A., et Mackey, B. M.** 1998. Detection of RNA by reverse-transcription-PCR as an indicator of viability in *Escherichia coli* cells. *Appl Environ Microbiol.* **64**:1313-1318.
- Simmons, O. D., 3rd, Sobsey, M. D., Heaney, C. D., Schaefer, F. W., 3rd, et Francy, D. S.** 2001. Concentration and detection of *Cryptosporidium* oocysts in surface water samples by method 1622 using ultrafiltration and capsule filtration. *Appl Environ Microbiol.* **67**:1123-1127.
- Singh, B.** 1997. Molecular methods for diagnosis and epidemiological studies of parasitic infections. *Int J Parasitol.* **27**:1135-1145.
- Slavin, D.** 1955. *Cryptosporidium meleagridis* sp. *J Pathol Ther.* **65**:262-266.
- Slifko, T. R., Friedman, D., Rose, J. B., et Jakubowski, W.** 1997. An in vitro method for detecting infectious *Cryptosporidium* oocysts with cell culture. *Appl Environ Microbiol.* **63**:3669-3675.
- Slifko, T. R., et Kose, J. B.** 1998. Comparison of 4 *Cryptosporidium parvum* viability assays: DAPI/PI, excystation, cell culture, and animal infectivity. American Water Works Association ed., Presented at the Water Quality Technology Conference, San Diego, CA.
- Slifko, T. R., Smith, H. V., et Rose, J. B.** 2000. Emerging parasite zoonoses associated with water and food. *Int J Parasitol.* **30**:1379-1393.
- Sluter, S. D., Tzipori, S., et Widmer, G.** 1997. Parameters affecting polymerase chain reaction detection of waterborne *Cryptosporidium parvum* oocysts. *Appl Microbiol Biotechnol.* **48**:325-330.
- Smetzers, T. F. C. M., Stevens, E., van de Locht, L., et Mensink, E.** 1998. Freezing of PCR master mixture retains full amplification activity and facilitates PCR standardisation for molecular diagnostics and real-time quantitative PCR. *Leukemia.* **12**:1324-1332.
- Smith, H. V., Patterson, W. J., Hardie, R., Greene, L. A., Benton, C., Tulloch, W., Gilmour, R. A., Girdwood, R. W., Sharp, J. C., et Forbes, G. I.** 1989. An outbreak of waterborne cryptosporidiosis caused by post-treatment contamination. *Epidemiol Infect.* **103**:703-715.
- Smith, H. V.** 1990. Environmental aspects of *Cryptosporidium* species: a review. *J R Soc Med.* **83**:629-631.
- Smith, H. V., et Rose, J. B.** 1990. Waterborne cryptosporidiosis. *Parasitology Today.* **6**:8-12.
- Sorvillo, F. J., Fujioka, K., Nahlen, B., Tormey, M. P., Kebabjian, R., et Mascola, L.** 1992. Swimming-associated cryptosporidiosis. *Am J Public Health.* **82**:742-744.
- Spano, F., Putignani, L., McLauchlin, J., Casemore, D. P., et Crisanti, A.** 1997. PCR-RFLP analysis of the *Cryptosporidium* oocyst wall protein (COWP) gene discriminates between *C. wrairi* and *C. parvum*, and between *C. parvum* isolates of human and animal origin. *FEMS Microbiol Lett.* **150**:209-217.
- Spano, F., Putignani, L., Guida, S., et Crisanti, A.** 1998. *Cryptosporidium parvum*: PCR-RFLP analysis of the TRAP-C1 (thrombospondin-related adhesive protein of *Cryptosporidium*-1) gene discriminates between two alleles differentially associated with parasite isolates of animal and human origin. *Exp Parasitol.* **90**:195-198.
- Sprinz, E., Mallman, R., Barcellos, S., Silbert, S., Schestatsky, G., et Bem David, D.** 1998. AIDS-related cryptosporidial diarrhoea: an open study with roxithromycin. *J Antimicrob Chemother.* **41 Suppl B**:85-91.

- Stafford, R., Neville, G., Towner, C., et McCall, B.** 2000. A community outbreak of *Cryptosporidium* infection associated with a swimming pool complex. *Commun Dis Intell.* **24**:236-239.
- Stanfield, G., Carrington, E. G., Albinet, F., Compagnon, B., Dumoutier, N., Hamsch, B., Lorthioy, A., Medema, G. J., Pezoldt, H., De Roubin, M. R., De Lohman, A., et Whitmore, T.** 2000. An optimised and standardised test to determine the presence of the protozoa *Cryptosporidium* and *Giardia* in water. *Wat. Sci. Tech.* **14**:103-110.
- Stinear, T., Matusan, A., Hines, K., et Sandery, M.** 1996. Detection of a single viable *Cryptosporidium parvum* oocyst in environmental water concentrates by reverse transcription-PCR. *Appl Environ Microbiol.* **62**:3385-3390.
- Sturbaum, G. D., Klonicki, P. T., Marshall, M. M., Jost, B. H., Clay, B. L., et Sterling, C. R.** 2002. Immunomagnetic separation (IMS)-fluorescent antibody detection and IMS-PCR detection of seeded *Cryptosporidium parvum* oocysts in natural waters and their limitations. *Appl Environ Microbiol.* **68**:2991-2996.
- Sulaiman, I. M., Xiao, L., Yang, C., Escalante, L., Moore, A., Beard, C. B., Arrowood, M. J., et Lal, A. A.** 1998. Differentiating human from animal isolates of *Cryptosporidium parvum*. *Emerg Infect Dis.* **4**:681-685.
- Sulaiman, I. M., Xiao, L., et Lal, A. A.** 1999. Evaluation of *Cryptosporidium parvum* genotyping techniques. *Appl Environ Microbiol.* **65**:4431-4435.
- Sulaiman, I. M., Morgan, U. M., Thompson, R. C., Lal, A. A., et Xiao, L.** 2000. Phylogenetic relationships of *Cryptosporidium* parasites based on the 70- kilodalton heat shock protein (HSP70) gene. *Appl Environ Microbiol.* **66**:2385-2391.
- Tamburrini, A., et Pozio, E.** 1999. Long-term survival of *Cryptosporidium parvum* oocysts in seawater and in experimentally infected mussels (*Mytilus galloprovincialis*). *Int J Parasitol.* **29**:711-715.
- Tangermann, R. H., Gordon, S., Wiesner, P., et Kreckman, L.** 1991. An outbreak of cryptosporidiosis in a day-care center in Georgia. *Am J Epidemiol.* **133**:471-476.
- Tanriverdi, S., Tanyeli, A., Baslamisli, F., Koksali, F., Kilinc, Y., Feng, X., Batzer, G., Tzipori, S., et Widmer, G.** 2002. Detection and genotyping of oocysts of *Cryptosporidium parvum* by real- time PCR and melting curve analysis. *J Clin Microbiol.* **40**:3237-3244.
- Taylor, D. N., Echeverria, P., Pitarangsi, C., Seriwatana, J., Sethabutr, O., Bodhidatta, L., Brown, C., Herrmann, J. E., et Blacklow, N. R.** 1988. Application of DNA hybridization techniques in the assessment of diarrheal disease among refugees in Thailand. *Am J Epidemiol.* **127**:179-187.
- Tiangtip, R., et Jongwutiwes, S.** 2002. Molecular analysis of *Cryptosporidium* species isolated from HIV- infected patients in Thailand. *Trop Med Int Health.* **7**:357-364.
- Tyzzar, E. E.** 1907. A sporozoon found in the peptic glands of the common mouse. *Proc Soc Exp Biol Med.* **5**:12-13.
- Tzipori, S., Smith, M., Birch, C., Barnes, G., et Bishop, R.** 1983. Cryptosporidiosis in hospital patients with gastroenteritis. *Am J Trop Med Hyg.* **32**:931-934.
- Tzipori, S., et Ward, H.** 2002. Cryptosporidiosis: biology, pathogenesis and disease. *Microbes Infect.* **4**:1047.
- Udeh, P., Veenstra, J., Abraham, A. J., et John, G. H.** 2000. Quantitative polymerase chain (QPCR) reaction using the MIMIC approach to estimate *Cryptosporidium parvum* oocysts, an intestinal pathogen, in municipal water treatment sludge samples. *Mol Cell Probes.* **14**:121-126.
- Uip, D. E., Lima, A. L., Amato, V. S., Boulos, M., Neto, V. A., et Bem David, D.** 1998. Roxithromycin treatment for diarrhoea caused by *Cryptosporidium* spp. in patients with AIDS. *J Antimicrob Chemother.* **41 Suppl B**:93-97.

- Upton, S. J., Tilley, M., et Brillhart, D. B.** 1995. Effects of select medium supplements on in vitro development of *Cryptosporidium parvum* in HCT-8 cells. *J Clin Microbiol.* **33**:371-375.
- USEPA.** 1999. Standard Method 1622: *Cryptosporidium* in water by Filtration/IMS/FA. EPA 821-R-99-001. US Environmental Protection Agency. Washington, DC.
- USEPA.** 1999. Standard Method 1623: *Cryptosporidium* and *Giardia* in water by Filtration/IMS/FA. EPA 821-R-99-006. US Environmental Protection Agency. Washington, DC
- Uyttendaele, M., Biastiaansen, A., et Debevere, J.** 1997. Evaluation of the NASBA nucleic acid amplification system for assessment of the viability of *Campilobacter jejuni*. *Int J Food Microbiol.* **37**:134-142.
- Van Asperen, A., Mank, T. G., Medema, G. J., Stijnen, C., de Boer, A. S., Groot, J. F., ten Ham, P., Sluiter, J. F., et Borgdorff, M. W.** 1996. An outbreak of cryptosporidiosis in the Netherlands. *Eur. Comm. Dis. Bull.* **2**:11-12.
- Vandenberg, N., et van Oorschot, R. A.** 2002. Extraction of human nuclear DNA from feces samples using the QIAamp DNA Stool Mini Kit. *J Forensic Sci.* **47**:993-995.
- Vesey, G., Ashbolt, N., Fricker, E. J., Deere, D., Williams, K. L., Veal, D. A., et Dorsch, M.** 1998. The use of a ribosomal RNA targeted oligonucleotide probe for fluorescent labelling of viable *Cryptosporidium parvum* oocysts. *J Appl Microbiol.* **85**:429-440.
- Vesey, G., Slade, J. S., Byrne, M., Shepherd, K., et Fricker, C. R.** 1993b. A new method for the concentration of *Cryptosporidium* oocysts from water. *J Appl Bacteriol.* **75**:82-86.
- Vesey, G., Slade, J. S., Byrne, M., Shepherd, K., Dennis, P. J., et Fricker, C. R.** 1993a. Routine monitoring of *Cryptosporidium* oocysts in water using flow cytometry. *J Appl Bacteriol.* **75**:87-90.
- Vesey, G., Ashbolt, N., G., W., Dorsch, M., Williams, K. L., et Veal, D. A.** 1995. Assessing *Cryptosporidium parvum* oocysts viability with fluorescent in situ hybridisation using ribosomal RNA probes and flow cytometry, Royal Society of Chemistry ed., Betts WB *et al.* **168**:133-138.
- Vetterling, J. M., Jervis, H. R., Merrill, T. G., et Sprinz, H.** 1971. *Cryptosporidium* wrairi sp. n. from the guinea pig *Cavia porcellus*, with an emendation of the genus. *J Protozool.* **18**:243-247.
- Viriyavejakul, P., Rojanasunan, P., Viriyavejakul, A., Khachansaksumet, V., Punpoowong, B., et Riganti, M.** 1999. *Cytomegalovirus* and *Cryptosporidium* infections in AIDS: a necropsy study. *Southeast Asian J Trop Med Public Health.* **30**:257-258.
- Wagner-Wiening, C., et Kimmig, P.** 1995. Detection of viable *Cryptosporidium parvum* oocysts by PCR. *Appl Environ Microbiol.* **61**:4514-4516.
- Walker, M. J., Montemagno, C., Bryant, J. C., et Ghiorse, W. C.** 1998. Method detection limits of PCR and immunofluorescence assay for *Cryptosporidium parvum* in soil. *Appl Environ Microbiol.* **64**:2281-2283.
- Walsh, P. S., Metzger, D. A., et Higuchi, R.** 1991. Chelex 100 as a medium for simple extraction of DNA for PCR-based typing from forensic material. *Biotechniques.* **10**:506-513.
- Weber, R., Bryan, R. T., Bishop, H. S., Wahlquist, S. P., Sullivan, J. J., et Juranek, D. D.** 1991. Threshold of detection of *Cryptosporidium* oocysts in human stool specimens: evidence for low sensitivity of current diagnostic methods. *J Clin Microbiol.* **29**:1323-1327.

- Weber, R., Sauer, B., Luthy, R., et Nadal, D. 1993. Intestinal coinfection with *Enterocytozoon bieneusi* and *Cryptosporidium* in a human immunodeficiency virus-infected child with chronic diarrhea. *Clin Infect Dis.* **17**:480-483.
- Weikel, C., Lazenby, A., Belitsos, P., McDewitt, M., Fleming, H. E., Jr., et Barbacci, M. 1991. Intestinal injury associated with spiramycin therapy of *Cryptosporidium* infection in AIDS. *J Protozool.* **38**:147S.
- Weir, S. C., Pokorny, N. J., Carreno, R. A., Trevors, J. T., et Lee, H. 2001. Improving the rate of infectivity of *Cryptosporidium parvum* oocysts in cell culture using centrifugation. *J Parasitol.* **87**:1502-1504.
- Widmer, G., Tchack, L., Spano, F., et Tzipori, S. 1998. A study of *Cryptosporidium parvum* genotypes and population structure. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* **93**:685-686.
- Widmer, G., Orbach, E. A., et Tzipori, S. 1999. beta-tubulin mRNA as a marker of *Cryptosporidium parvum* oocyst viability. *Appl Environ Microbiol.* **65**:1584-1588.
- Wiedenmann, A., Krüger, P., et Botzenhart, K. 1998. PCR detection of *Cryptosporidium parvum* in environmental samples -a review of published protocols and current developments. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology* *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology.* **21**:150-166.
- Xiao, L., Sulaiman, I., Fayer, R., et Lal, A. A. 1998. Species and strain-specific typing of *Cryptosporidium* parasites in clinical and environmental samples. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* **93**:687-691.
- Xiao, L., Limor, J. R., Li, L., Morgan, U., Thompson, R. C., et Lal, A. A. 1999a. Presence of heterogeneous copies of the small subunit rRNA gene in *Cryptosporidium parvum* human and marsupial genotypes and *Cryptosporidium felis*. *J Eukaryot Microbiol.* **46**:44-45.
- Xiao, L., Morgan, U. M., Limor, J., Escalante, A., Arrowood, M., Shulaw, W., Thompson, R. C., Fayer, R., et Lal, A. A. 1999b. Genetic diversity within *Cryptosporidium parvum* and related *Cryptosporidium* species. *Appl Environ Microbiol.* **65**:3386-3391.
- Xiao, L., Escalante, L., Yang, C., Sulaiman, I., Escalante, A. A., Montali, R. J., Fayer, R., et Lal, A. A. 1999c. Phylogenetic analysis of *Cryptosporidium* parasites based on the small- subunit rRNA gene locus. *Appl Environ Microbiol.* **65**:1578-1583.
- Xiao, L., Singh, A., Limor, J., Graczyk, T. K., Gradus, S., et Lal, A. 2001. Molecular characterization of *Cryptosporidium* oocysts in samples of raw surface water and wastewater. *Appl Environ Microbiol.* **67**:1097-1101.
- Yamamoto, N., Urabe, K., Takaoka, M., Nakazawa, K., Gotoh, A., Haga, M., Fuchigami, H., Kimata, I., et Iseki, M. 2000. Outbreak of cryptosporidiosis after contamination of the public water supply in Saitama Prefecture, Japan, in 1996. *Kansenshogaku Zasshi.* **74**:518-526
- Zhu, G., Marchewka, M. J., Ennis, J. G., et Keithly, J. S. 1998. Direct isolation of DNA from patient stools for polymerase chain reaction detection of *Cryptosporidium parvum*. *J Infect Dis.* **177**:1443-1446.
- Zhu, G., Keithly, J. S., et Philippe, H. 2000. What is the phylogenetic position of *Cryptosporidium*? *Int J Syst Evol Microbiol.* **50 Pt 4**:1673-1681.

Annexes

Composition des Milieux

PREPARATION DE REACTIF

TAMPON TRIS 1 M, pH 7.4 (*Giardia* / *Cryptosporidium*)

Ce réactif entre dans la composition de l'éluant Gelman

COMPOSITION: pour 1 litre

- | | | |
|----------------------|-------|----|
| - Tris base | 121,1 | g |
| - Eau ultra-pure QSP | 1000 | ml |

PREPARATION:

- Dissoudre 121,1 g de Tris dans 700 ml d'eau ultra pure
- Ajuster à pH $7,40 \pm 0,05$ avec le l'HCl à 32 % ou NaOH à 1N
- Stériliser par filtration sur une membrane de 0,22 μm

CONSERVATION:

6 mois à 5 ± 3 °C

FOURNISSEUR :

Tris base (Trizma base)

SIGMA

Réf : T6791

Note: Les références indiquées sont celles que nous recommandons. Il reste toujours possible d'utiliser d'autres produits chez un autre fournisseur à qualité équivalente garantie et vérifiée.

PREPARATION DE REACTIF

TAMPON EDTA, 2 Na, 0.5 M, pH 8.0
(*Giardia* / *Cryptosporidium*)

Ce réactif entre dans la composition de l'éluant Gelman

COMPOSITION: pour 1 litre

- | | | |
|----------------------|-------|----|
| - EDTA | 186,1 | g |
| - Eau ultra-pure QSP | 1000 | ml |

PREPARATION:

- Dissoudre 186,1 g d' EDTA dans 800 ml d'eau ultra pure
- Ajuster à pH $8,00 \pm 0,05$ avec le l'HCl à 32% ou NaOH à 1N
- Ajuster au fur et à mesure pour obtenir une bonne dilution

CONSERVATION:

6 mois à $5 \pm 3^{\circ}\text{C}$

FOURNISSEUR :

EDTA	SIGMA	Réf : E7889
------	-------	-------------

Note: Les références indiquées sont celles que nous recommandons. Il reste toujours possible d'utiliser d'autres produits chez un autre fournisseur à qualité équivalente garantie et vérifiée.

PREPARATION DE REACTIF

ELUANT GELMAN

(*Giardia / Cryptosporidium*)

EPA 1622, 1623

NF T 90-455 si rendements d'élution sont équivalents à leur solution

COMPOSITION

	pour 1 litre		pour 5 litres	
- Laureth-12	1	g	5	g
- Tris 1M, pH 7,4 *	10	ml	50	ml
- EDTA, 2 Na, 0.5 M, pH 8.0 *	2	ml	10	ml
- Antimousse B (10% d'Antimousse A)	1,5	ml	7,5	ml
- Eau ultra-pure QSP	1000	ml	5000	ml

NOTE : ces solutions sont prêtes à l'emploi et conservées à 4°C.

PREPARATION: (pour 1 litre)

- Peser 1 g de Laureth-12 dans un becher et ajouter 100 ml d'eau ultra pure.
- Chauffer le becher sur une plaque chauffante pour mélanger le Laureth-12 et transférer la solution dans une éprouvette de 1000 ml
- Rincer plusieurs fois le becher pour s'assurer que tout a bien été transféré.
- Ajouter 10 ml de tampon Tris, pH 7,4, et 2 ml d' EDTA, pH 8.0, et 1,5 ml d'Antimousse B (ou 0,15 ml d'Antimousse A).
- Compléter la solution à 1000 ml avec de l'eau ultra pure. L'éluant doit avoir une apparence opaque.

CONSERVATION:

6 mois à température ambiante

FOURNISSEUR :

-Antifoam B (10 ml) : anti mousse	SIGMA	Réf : A5757
-Laureth-12	PALL-GELMAN	Réf : 06194

Note: Les références indiquées sont celles que nous recommandons. Il reste toujours possible d'utiliser d'autres produits chez un autre fournisseur à qualité équivalente garantie et vérifiée.

Protocole de Séparation Immuno-magnétique (IMS)

Dynabeads® anti-*Cryptosporidium* (DynaL, Compiègne, France)

- 1) Sortir les échantillons ainsi que les tampons à température ambiante suffisamment tôt avant la manipulation
- 2) Ajouter par tube Leighton :
 - 1 ml de tampon A (10X SL™ Buffer A)
 - 1 ml de tampon B (10X SL™ Buffer B)
 - 100µl de billes magnétiques
 - 5 ml de culot compacté de l'échantillon d'eau
 - qsp 10 mL
- 3) Placer les tubes sur un agitateur rotatif (DynaL Sample mixer) à une vitesse de 25-35 rpm, à température ambiante, durant 1H au minimum
- 4) Récupérer les tubes et les placer sur le concentrateur magnétique de particules (DynaL MPC-1) en mettant en contact le côté plat des tubes et la partie aimantée du concentrateur
- 5) Mélanger doucement par retournement du concentrateur avec un geste à 180° durant 2 minutes
- 6) Éliminer rapidement le surnageant
- 7) Retirer l'aimant et laisser décanter les billes

Pour des échantillons issus de la filtration d'eaux usées, un lavage préliminaire est ajouté avec 5 ml de 1x SL tampon A

Mélanger doucement par retournement du concentrateur avec un geste à 180°C durant 2 minutes

Éliminer rapidement le surnageant

Retirer l'aimant et laisser décanter les billes

- 8) Suspendre les billes dans 1ml de tampon A dilué au 1/10^{ème} (1X SL™ Buffer A)
- 9) Transférer le tout dans des micro-tubes de 1.5 ml
- 10) Placer ces tubes dans le concentrateur magnétique de particules pour micro-tubes avec l'aimant

- 11) Mélanger doucement par retournement le concentrateur avec un geste à 180° durant 1 minute. A la fin de cette étape, les complexes billes-oocystes sont accrochés proprement (forme nette).
- 12) Aspirer très rapidement le surnageant et le bouchon du micro-tube en faisant attention de ne pas décrocher les complexes liés à l'aimant.

Pour des échantillons issus de la filtration **d'eau traitée (robinet)**, **un** lavage avec 1 ml de tampon salin phosphaté à 2.5% (PBS phosphate buffered saline solution) a été ajouté. Reprendre à les étapes 10), 11), 12)

Pour des échantillons issus de la filtration **d'eaux usées**, **deux** lavages avec 1 ml de PBS à 2.5% ont été ajoutés. Reprendre à les étapes 10), 11), 12)

- 13) Ajouter 20 µl d'un mélange eau ultra-pure-Chelex-100
- 14) Congeler à -80°C le mélange oocystes-billes-chelex-100

Publications

Article 1 : Development of a TaqMan quantitative PCR assay specific for *Cryptosporidium parvum*

FEMS Microbiology Letters 2002; 214; pages 13-17

..\DOCfontaine_article1.pdf

Article 2 : An immunomagnetic separation-real-time PCR method for quantification of *Cryptosporidium parvum* in water samples

J. Microbil. Methods 2003; 54; pages 29-36

..\DOCfontaine_article 2.pdf

Article 3 : In press; FEMS Microbiology Letters

RESUME

Cryptosporidium est un protozoaire parasite et cosmopolite responsable de nombreuses épidémies de gastro-entérites d'origine hydrique. La méthode classique de détection des oocystes de *Cryptosporidium* dans l'eau, basée sur un marquage immuno-fluorescent, est non spécifique de l'espèce pathogène pour l'homme *C. parvum*. Nous avons développé un test permettant de quantifier précisément les *C. parvum* issus d'échantillons d'eau par TaqMan PCR. L'ensemble de la méthode comporte une étape de filtration sur cartouche, une capture immuno-magnétique (IMS) suivie d'une lyse thermique des oocystes et d'une purification des ADN avant quantification par TaqMan PCR. La quantité est déduite d'une gamme étalon d'oocystes de quantité connue amplifiée en parallèle. Ce test spécifique permet une quantification rapide de moins de 5 jusqu'à 10^6 oocystes. Appliqué à des échantillons d'eaux, les rendements obtenus ont été de 69,7 % ($\pm 22,3$) à 84,5 % ($\pm 9,7$) pour des eaux potables et de 46,4 % ($\pm 7,3$) à 57,6 % ($\pm 10,7$) pour des eaux de Seine. Un second test TaqMan RT-PCR quantifiant les ARNr 18S a été développé dans le but de cibler les oocystes viables. L'adaptation du test à des échantillons d'eau a obtenu des rendements équivalents aux précédents. Afin de vérifier que les ARNr 18S peuvent être de bons marqueurs de viabilité, l'effet de traitements thermiques a été évalué par TaqMan RT-PCR. La stabilité observée des ARNr 18S a montré qu'ils pourraient ne pas être directement associés à la viabilité même s'ils se sont montrés moins stables que les ADNr 18S. Ces nouvelles méthodes pourront participer activement à optimiser le contrôle sanitaire de l'eau potable, l'efficacité des traitements de désinfection ou à identifier les ressources à risques.

Mots clés : *Cryptosporidium parvum*, Quantitative, TaqMan, PCR, RT-PCR, Eau.

ABSTRACT

The protozoan parasite *Cryptosporidium* is known to occur widely in both raw and drinking water and is the cause of water-borne outbreaks of gastroenteritis throughout the world. The routinely used method for the detection of *Cryptosporidium* oocysts in water is based on an immunofluorescence assay which is non-specific for the human pathogenic species, *C. parvum*. We have developed a TaqMan PCR test that accurately quantifies *C. parvum* oocysts in water samples. The protocol consisted of the following successive steps: Envirochek® capsule filtration, immunomagnetic-separation (IMS), thermal lysis followed by DNA purification and finally real-time PCR using TaqMan technology. Quantification was accomplished by comparing the fluorescence signals obtained from test samples with those from standard dilutions of *C. parvum* oocysts. This IMS-TaqMan PCR assay permits rapid and reliable quantification over six orders of magnitude, with a quantification limit of 5 oocysts. Replicate samples of spiked tap water and Seine river water samples were tested and oocyst recoveries were range respectively from 69,7 % ($\pm 22,3$) to 84,5 % ($\pm 9,7$) and from 46,4 % ($\pm 7,3$) to 57,6 % ($\pm 10,7$). We also report on a TaqMan reverse transcription-PCR method that targets and quantifies *C. parvum* 18S rRNA for detecting viable oocysts in water. This test performed in water samples obtained similar recoveries. To study the suitability of 18S rRNA as an indicator of *Cryptosporidium* oocysts viability, the stability of 18S rRNA and rDNA was monitored by real-time RT-PCR following various heat treatments. Our results indicate that 18S rRNA detection may not be directly associated with viability following heat inactivation of oocysts even if in all the experiments 18S rRNA was less stable than rDNA. These new molecular methods offer a rapid, sensitive and specific alternative for *C. parvum* oocyst quantification in water and can be useful for better health risk assessment during routine controls of drinking water quality, evaluation of treatment efficiency as well as identification of risk resources.

Keywords : *Cryptosporidium parvum*, Quantitative, TaqMan, PCR, RT-PCR, Water.