

OPUR : Observatoire des Polluants Urbains en Île de France
Phase 4

RAPPORT FINAL : THEME 7
7.1. EFFICACITÉ ÉPURATOIRE DES BIORÉACTEURS À
MEMBRANES ET DES TRAITEMENTS TERTIAIRES -
ASPECTS MICROBIOLOGIQUES
7.2. ETUDE EXPLORATOIRE SUR LES VIRUS DANS LES
EAUX URBAINES

rapport rédigé par Françoise Lucas et Claire Therial
Date 23 novembre 2018

Programmes de recherche impliqués :

- OPUR thème 7
- Phosphore (DIM R2DS, Région Ile de France)
- financement de Eau de Paris pour la Thèse de Benoit Prévost

Lieux :

- LEESU
- SIAAP : Laboratoire R&D de microbiologie, Station d'Épuration Seine Centre, Station d'Épuration Seine Amont
- Laboratoire R&D Biologie Recherche, Eau de Paris

Partenaires scientifiques et opérationnels:

- Françoise Lucas, Claire Therial, Johnny Gasperi, LEESU
- Adélaïde Roguet, School of Freshwater Sciences, University of Wisconsin-Milwaukee, USA
- Laurent Moulin & Sébastien Wurtzer, R&D Biologie, Eau de Paris
- Sébastien Pichon, SIAAP
- Fanny Richard, Alexandre Gonçalves & Vincent Rocher, DDP, SIAAP
- Adrien Besombes, Sequaris

Sources de financement :

- OPUR
- DIM R2DS, Région Ile de France
- Eau de Paris
- SIAAP

Thèse

- Benoit Prévost. Dynamique de la contamination virale dans l'environnement hydrique urbain, soutenue le 28 septembre 2015 à l'Université Paris Est.

Stages de master/ingénieur

- Mariem Sassi (2014). Abattement des virus entériques dans les eaux usées par les traitements tertiaires. Stage Ingénieur PFE, Institut National des Sciences Appliquées et de Technologie (INSAT) de Tunis, Tunisie
- Samia Ben Rejeb (2014), Abattement des microorganismes par les traitements tertiaires. Stage Ingénieur PFE, INSAT de Tunis, Tunisie
- Manel Naloufi (2018). Impact des traitements en station d'épuration sur la diversité bactérienne dans les eaux usées. Stage M1 STA2E, parcours Biologie Intégrative, OMICS, UPEC

Stages BTS

- Solène Marzouk (2015). Mise au point d'une méthode de quantification des pathogènes hydriques par PCR en temps réel. Stage de BTS Bioanalyses et Contrôles, Paris

Publications :

- Prevost B, Lucas F, Ambert-Balay K, Pothier P, Moulin L, Wurtzer S (2015b). Deciphering the astrovirus and norovirus diversity in wastewater treatment plant effluents by high-throughput sequencing method. *Appl. Environ. Microbiol.* 81:7215-22
- Prevost B, Lucas FS, Goncalves A, Richard F, Moulin L, Wurtzer S (2015a). Large scale survey of enteric viruses in river and waste water underlines the health status of the local population. *Environment International* 79:42-50
- Wurtzer S, Prevost B, Lucas FS, Moulin L (2014). Detection of enterovirus in environmental waters: a new optimized method compared to commercial real-time RT-qPCR kits. *J. Virol. Methods* 209 :47-54.

Communications dans des congrès :

Lucas F (2018). La qualité des eaux résiduaires issues des stations d'épuration : les limites technologiques. Deuxième Colloque Eau, Santé et Environnement, Evry, 22-23 novembre (orateur invité et modérateur de session)

Lucas FS, Therial C, Rocher V (2018). Robustness of fecal and sewage microbial signatures to climatic variations. SME17, Leipzig, Allemagne, 12-17 août (Poster)

Lucas F, Roguet A, Therial C, Gonçalves A, Rocher V (2014). Utilité du séquençage à haut débit pour évaluer la variabilité de la qualité microbiologique des eaux usées brutes. Journées Recherche-Industrie :Management des ressources microbiennes, Narbonne, 7-9 octobre. (Poster)

Prévost B, Richard F, Goncalves A, Lucas F, Moulin L, Wurtzer S (2014). Viral dynamics of the Seine River in Paris area: analysis of the climate impact, . 4th Food and Environmental Virology conference, Corfu, Grèce, 2-5 septembre,

Séminaires:

Lucas F (2018). Diversité microbienne et gestion des eaux urbaines. Séminaire invité, UMR Ecobio, Université Rennes I

Mailler R, Lucas F, Richard F, Gasperi J, Coquet Y, Chebbo G, Rocher V (2014). Micropolluants dans les eaux usées, en réseau et dans les filières de traitement: Traitement des eaux usées par charbon actif en poudre : étude des micropolluants organiques et des virus, Séminaire OPUR, Colombes, 7 oct.

INTRODUCTION

Généralement les eaux usées issues d'un traitement secondaire en station d'épuration (STEP) contiennent un ensemble de micro-organismes pathogènes qui posent un risque potentiel pour la santé humaine et animale (Wery et al. 2010). En effet, les STEP ne sont généralement pas prévues pour éliminer les microorganismes pathogènes, toutefois les traitements primaires et secondaires peuvent atteindre un abattement des bactéries indicatrices de contamination fécale (BIF) allant jusqu'à 99 % (Kay et al. 2007, Servais et al. 2007, Lucas et al. 2014, Azimi et al. 2016). En fonction des concentrations présentes dans les eaux usées à traiter, ce niveau d'élimination peut s'avérer insuffisant pour atteindre une qualité microbiologique suffisante pour l'irrigation des plantations, ou pour permettre les activités récréatives dans les eaux de surfaces recevant les rejets de STEP (Blumenthal et al. 2000; Zanetti et al. 2006).

Or ces dernières décennies, il est très fortement question de réutilisation des eaux usées traitées et d'ouvertures de baignades dans des eaux continentales susceptibles recevant des rejets de STEP. De plus, les eaux de surface continentales constituent une ressource en eau pour l'irrigation et la production d'eau potable qui est non négligeable. Afin d'obtenir des effluents de qualité microbiologique suffisante pour ce type d'utilisation, l'addition d'un traitement de désinfection chimique ou physique (tel que l'irradiation par les UV, l'ozonation, l'ajout d'acide peracétique ou la chloration) ou d'autres traitements tertiaires perfectionnés (filtration membranaire) peut s'avérer nécessaire. En fonction du risque d'exposition à des pathogènes pour les humains ou les animaux, le niveau de désinfection requis dépend de la législation, de la quantité d'eau nécessaire et de l'usage qu'il sera fait de l'eau traitée (Blumenthal et al. 2000). Les traitements de désinfection peuvent éliminer de manière très significative les organismes pathogènes, mais ils sont relativement onéreux et demandent une certaine qualité d'eau en entrée pour assurer leur efficacité. De ce fait, la plupart des STEP en Europe ne sont pas équipées de ce type de procédés de traitement (Bixio et al. 2005; Kristensen 2013).

Améliorer notre connaissance sur l'efficacité des procédés de traitement des stations d'épuration envers les microorganismes est devenu nécessaire vu le contexte environnemental et politique actuel. Toutefois ces évaluations ne doivent pas porter uniquement sur les indicateurs réglementaires, mais également sur les pathogènes d'origine hydrique qui représentent un risque sanitaire. En effet, il est à présent reconnu que les BIF ne sont pas toujours représentatives de la survie et de l'élimination des bactéries pathogènes ni des virus entériques (e.g. Paiment and Locas 2011, Lucas et al. 2014, Prevost et al. 2015a).

Ce rapport porte donc sur l'efficacité des traitements tertiaires concernant l'abattement des microorganismes indicateurs de contamination fécale et pathogènes. Il regroupe les sous-thèmes 7.1 et 7.2, et traite à la fois des pathogènes bactériens et des virus entériques. Les traitements tertiaires évalués sont un pilote de charbon actif CarboPlus® (Stereau) installé en 2013 à l'usine Seine Centre (Colombes, 92), et l'unité de désinfection de l'usine Seine Amont (Valenton, 94). Ces stations d'épuration de la région parisienne sont gérées par le SIAAP (Syndicat Interdépartemental pour l'Assainissement de l'Agglomération Parisienne). La STEP Seine Amont (SAM) est sous-traitée à l'entreprise Sequaris. A Seine Centre (SCE), les eaux usées qui alimentent le pilote CarboPlus® subissent un traitement primaire par décantation physico-chimique lamellaire associée à une élimination du phosphore, puis un traitement secondaire du carbone et de l'azote (nitrification et dénitrification) par biofiltration (Goncalves et al. 2009). A Seine Amont, le traitement de désinfection ne concerne qu'une partie des eaux usées, pour un usage interne requérant une eau de qualité industrielle. Avant la désinfection, elles subissent un traitement primaire par décantation simple, puis un traitement biologique secondaire par boue activée à faible charge (nitrification, dénitrification et déphosphatation mixte) (Goncalves et al. 2009).

Les microorganismes ciblés pour l'évaluation de ces deux traitements tertiaires comprennent les BIF réglementaires (*Escherichia coli* et entérocoques intestinaux), cinq virus entériques, les salmonelles, *Campylobacter jejuni*, les mycobactéries non-tuberculeuses. Le choix s'est porté sur ces pathogènes car *Campylobacter* et les virus entériques sont parmi les causes majeurs de gastro-entérites liés à l'utilisation des eaux de surface (Schijven and de Roda Husman, 2006; Sinclair et al., 2009). Afin de quantifier ces différents microorganismes dans les eaux usées en entrée et sortie des deux traitements tertiaires, il a été nécessaire de mettre en place les techniques de quantification de certaines des cibles au Service Expertise et Prospective : Process et Microbiologie de la DDP (Direction Développement et Prospective) du SIAAP,

et au sein du LEESU (UPEC). La méthode de quantification par PCR (Polymerase Chain Reaction) en temps réel des norovirus, des rotavirus, des adénovirus et des enterovirus qui avait été développée par le laboratoire R&D Biologie d'Eau de Paris a été transférée et adaptée pour le laboratoire de biologie moléculaire de la DDP. Les méthodes ont été validées par essais interlaboratoire entre Eau de Paris et le laboratoire de biologie moléculaire de la DDP. La quantification par PCR en temps réel des salmonelles et de *Campylobacter jejuni* a été réalisée au LEESU après mise en place des deux méthodes de quantification par PCR en temps réel. Les méthodes de quantification des FIB et des mycobactéries étaient déjà en place au LEESU.

Le rapport porte donc sur la mise en place des techniques de quantification des pathogènes viraux et bactériens et sur la qualité microbiologique des rejets des deux STEP. Ensuite sont rapportés l'efficacité de CarboPlus® et du traitement de désinfection de SAM.

1- Transfert de technologie : Quantification des virus entériques par PCR en temps réel

Le laboratoire R&D Biologie d'Eau de Paris a développé les méthodes de quantification d'une douzaine de virus entériques (Prevost et al. 2015a). Cinq virus entériques les plus pertinents ont été choisis pour la mise en place de méthodes de quantification des virus entériques à la DDP du SIAAP : les norovirus GI et GII, les adénovirus, les entérovirus et les rotavirus.

Ces virus ont été ciblés car ils peuvent être impliqués de manière non négligeable dans les gastroentérites d'origine hydrique. Des études montrent que les gastro-entérites causées par les norovirus peuvent être graves et parfois mortelles (Glass et al. 2009, Le Guyader et al. 2014), sachant que les norovirus (NV) ont une dose infectieuse faible (Atmar et al. 2014). Les adénovirus (AdV) sont responsables de 4 à 8% des gastro-entérites infantiles (Simon et Mata 1985, Pothier 2005) et les rotavirus (RV) sont les agents majeurs de gastro-entérites aiguës du nourrisson de 6 mois à 2 ans (Tate et al. 2012). Enfin les entérovirus humains (EV) sont résistants dans le milieu extérieur et sont susceptibles de persister pendant longtemps dans l'environnement (Schwartzbrod 2000). Leur transmission peut être soit directe soit indirecte par des eaux souillées ou des aliments. Les entérovirus se multiplient dans l'intestin mais migrent vers d'autres organes comme le système nerveux central, de ce fait ils sont capables de provoquer des lésions du système nerveux, du tractus gastro-intestinal, de l'appareil respiratoire, des muscles, de la peau et des yeux. Toutefois la plupart des infections provoquées par ces virus sont inapparentes et se produisent pendant l'enfance (Schwartzbrod 2000).

La mise en place des techniques de quantification des 5 cibles virales a été effectuée par Fanny Richard (SIAAP) à l'aide de Benoit Prevost (doctorant du LEESU, co-encadré par Eau de Paris). Elle a porté sur le choix des équipements, l'adaptation des protocoles de concentration, d'extraction et d'amplification aux équipements de la DDP du SIAAP. De ce fait, les protocoles diffèrent légèrement entre les deux laboratoires. Des essais inter-laboratoires ont donc été menés pour vérifier que les concentrations mesurées n'étaient pas significativement différentes entre les deux laboratoires.

1.1- Concentrations des virus

La concentration virale se fait en trois étapes distinctes : i) filtration, ii) floculation, iii) ultracentrifugation selon le protocole développé par Wurtzer et al. (2014). Les échantillons de 10 litres sont d'abord dopés avec 10000 unités génomique d'un vecteur adénoviral Adenovirus 5 LacZ Δ E1 Δ E3 produit par transfection d'un vecteur pAD/CMV/V5-GW/LacZ (Life Technologies, Carlsbad, CA) dans des cellules 293A (Prevost et al. 2015a) afin de s'assurer du bon déroulement de la manipulation. Ils sont ensuite filtrés sur cartouches électropositives NanoCéram® Virus Samplers (Argonide, Sanford, FL), puis les filtres sont soniqués à 4°C pendant 1h dans un tampon d'éluat à pH 9,5 (Annexe 2). L'éluat est récupéré grâce à un système d'air comprimé en flux inverse à la filtration initiale. Puis le pH est ajusté à 3,5 pour flocculer les virus sous agitation magnétique douce à température ambiante pendant 1h, suivi d'une centrifugation at 4000×g à 4°C pendant 2 h. Le culot est remis en suspension dans 10mL d'une solution de Na₂HPO₄ à 0,15 M et pH 9 puis centrifugé à 4000xg pendant 10min à 4°C. Le surnageant est transféré

sur 1 mL de sucrose à 40 % (p/v) (Amlesco) et centrifugé à 110000xg pendant 3 h à 4°C. Le culot formé est ensuite re-suspendu dans environ 1 mL de surnageant restant en soniquant pendant 15 min puis conservé à -70°C jusqu'à l'extraction de l'ADN.

1-2. Extraction des ADN

Tous les échantillons viraux ont été extraits suivant le protocole de Boom et al. (1990) en utilisant l'appareil d'extraction semi-automatique NucliSENS® miniMAG® (BioMérieux), les réactifs d'extraction magnétique NucliSENS (BioMérieux) et le tampon de lyse du Kit NucliSENS (BioMérieux) selon les instructions du fabricant.

1-3. Amplification des ADN

Afin de quantifier les virus entériques dans les échantillons, une analyse par PCR en temps réel (Adénovirus) et Reverse Transcription quantitative Polymerase Chain Reaction (RT-qPCR) pour les virus à ARN a été réalisée avec une technologie de type Taqman. Les amorces et les sondes pour les cinq cibles (NVGI, NVGII, AdV, EV, RV) sont publiées (Wurtzer et al. 2014, Prevost et al. 2015a) et listées en Annexe 1. Un contrôle compétitif d'inhibition a été réalisé en ajoutant aux extraits d'acides nucléiques, 1000 unités génome/μL d'un vecteur pCR2.1 TOPO (Life Technologies, Carlsbad, CA) contenant la séquence partielle du gène humain de la β-actine clonée flanquée des séquences EV_F453 et EV_R583 (Annexe 1). Une sonde BACT P1172 (HEX-CCCCTCCATCGTCCACCGCAAATG-BHQ1, 2 pmol/réaction) a été utilisée comme contrôle interne. Un contrôle positif et un contrôle négatif étaient également inclus dans les plans de microplaque avec les gammes étalons et les échantillons.

Les PCR ont été réalisées à l'aide d'un thermocycleur iQ5 (Biorad) avec un volume réactionnel de 20 μL (5 μL d'ADN extrait 5 μL de mix enzymatique, 5 μL d'amorces et sondes, 5μL d'eau distillée). La fluorescence a été mesurée en fin d'extension pour les fluorophore FAM et HEX. Pour la quantification des norovirus, les deux génogroupes ont été recherchés simultanément avec RT-qPCR multiplex. La composition des mélanges PCR et les concentrations de chaque composant sont détaillées en Annexe 2. Les conditions d'amplification pour la RT-qPCR sont présentées dans l'Annexe 3.

Les concentrations d'ARN ou ADN viraux ont été déterminés grâce à des courbes d'étalonnages effectuées avec des plasmides contenant les ADN ou ADNc de chaque virus. Les concentrations des virus cibles exprimées en copies de génome / 10L, ont été calculées à partir des cycles quantification (Cq) obtenus par qPCR. Les Cq ont été corrigés par rapport à l'inhibition du contrôle interne (β-actine). Par ailleurs, le vecteur adénoviral a été utilisé comme vérification du bon déroulement de l'amplification.

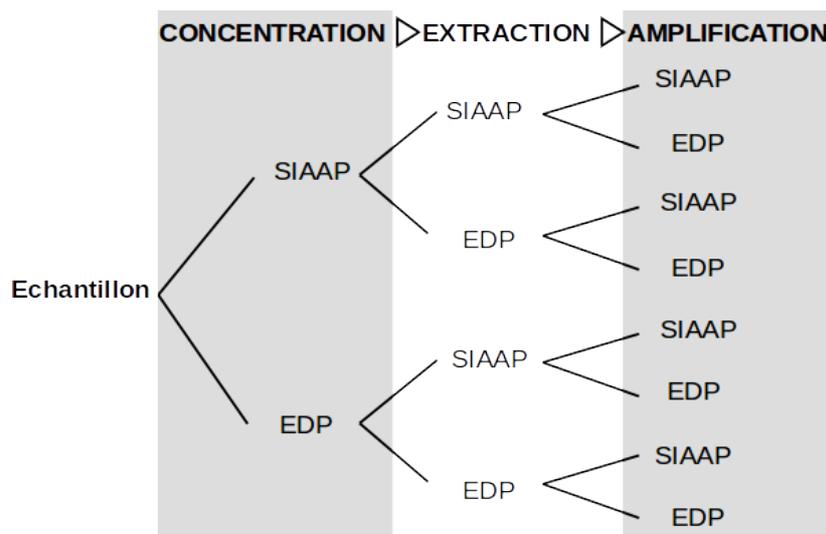


Figure 1: Protocole de validation des étapes de concentration, d'extraction et d'amplification des cinq cibles virales conduites à la DDP du SIAAP en comparaison avec le laboratoire R&D Biologie de Eau de Paris

1-4. Validation des protocoles

Les protocoles ont ensuite été validés par comparaison entre le laboratoire du SIAAP et celui d'Eau de Paris sur les mêmes échantillons. Pour ce faire dans un premier temps, 2 échantillons (eaux usées traitées et eau de la Seine) ont été traités en parallèle par les deux laboratoires en croisant à chaque étape du traitement depuis la concentration jusqu'à la quantification (Figure 1). La validation s'est faite en vérifiant pour chaque étape du protocole que les quantifications obtenues ne différaient pas significativement entre les deux laboratoires malgré les différences de protocole, le laboratoire R&D Biologie d'Eau de Paris servant de référence. Enfin, un essai de comparaison inter-laboratoire a été réalisé en quantifiant 16 échantillons d'eaux usées traitées et d'eau de surface par les deux laboratoires avec leurs protocoles respectifs de manière totalement indépendante depuis la concentration jusqu'à la quantification.

Concernant la validation du protocole de concentration de la DDP, la Figure 2A montre qu'au-delà des limites de quantification (100 copies de génomes par réaction de PCR), il y a une bonne concordance entre les résultats de la DDP et ceux d'Eau de Paris lorsque l'on compare les deux protocoles de concentration. Les résultats ne diffèrent pas significativement entre les deux protocoles de concentration quel que soit la cible virale (tests de Wilcoxon ou test t appariés, N=8, p>0,05). De même, pour le protocole d'extraction (Figure 2B), en faisant abstraction des échantillons en limite de quantification (<100 copies de génomes), il n'y a pas de différence significative du nombre de copies de génome (cg) entre les deux laboratoires quel que soit le virus quantifié (tests de Wilcoxon ou test t appariés, N=6, p>0,05). Enfin, pour le protocole d'amplification (Figure 2C), il y a également aucune différence significative entre les deux laboratoires lorsque sont exclus les données en dessous de la limite de quantification pour les norovirus, les entérovirus, les rotavirus et les adénovirus (tests de Wilcoxon ou test t appariés, N=6, p>0,05).

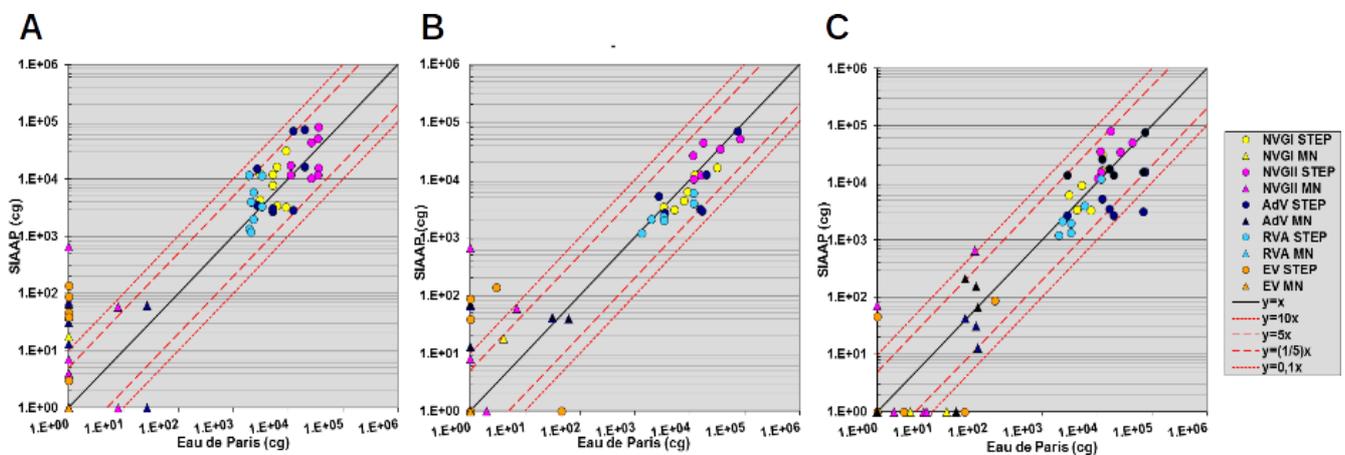


Figure 2: Comparaison du protocole de concentration (A), d'extraction (B) et de quantification (C) du SIAAP par rapport à ceux d'Eau de Paris pour les cinq cibles virales sur un échantillon de STEP (STEP), et un échantillon d'eau de surface de la Seine (MN). Le nombre de copie de génome est noté cg par réaction de PCR. Le nom des virus est abrégé : norovirus (NV) GI et GII, adénovirus (AdV), rotavirus A (RVA) et entérovirus (EV)

Après validation des 3 étapes du protocole de la DDP, un essai interlaboratoire a été réalisé sur 8 échantillons d'eau usée (n=8) et d'eau du milieu naturel (n=8). Les résultats sont présentés dans la Figure 3. Concernant les adénovirus, il y avait une différence d'un facteur de 5 entre les deux laboratoires, toutefois ceci était dû à une erreur au niveau de la gamme étalon. Après correction des données (ADV Sx5) aucune différence significative n'était constatée (Figure 3). Les méthodes validées pour les 5 cibles virales ont par la suite été utilisées pour quantifier les virus entériques à la DPP lors du stage de Mariem Sassi.

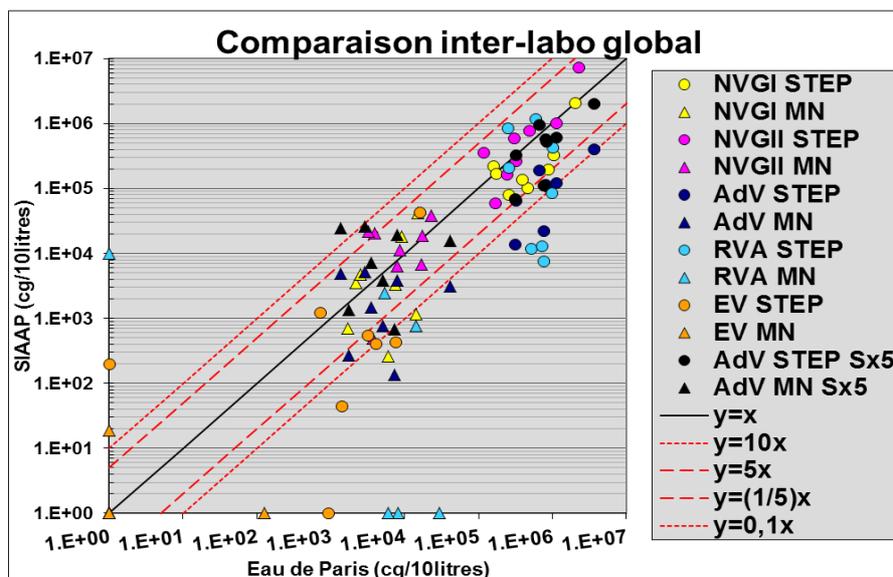


Figure 3: Comparaison entre le laboratoire du SIAAP et celui d'Eau de Paris pour la quantification des norovirus (NV) GI et GII, des adénovirus (AdV), des rotavirus A (RVA) et des entérovirus (EV) dans 8 échantillons d'eaux usées traitées (STEP) et 8 échantillons d'eau de surface de la Seine (MN)

2- Mise en place des protocoles de quantification bactérienne au LEESU

Les *Campylobacter* thermophiliques dans les eaux de surface sont un signe de contamination récente par des fèces humaines ou animales (Jones 2001). Les espèces *C. jejuni* et *C. coli* sont les bactéries pathogènes entériques humaines les plus communes causant des diarrhées (Frost 2001) et font partie des espèces bactériennes les plus impliquées dans les cas de gastro-entérites contractées lors de baignades dans les eaux de surface (Schijven and de Roda Husman, 2006; Sinclair et al., 2009). Concernant l'eau potable, les *Campylobacter* sont la cause identifiée de 1917 cas d'infection d'origine hydrique en Europe, alors que les salmonelles sont impliquées dans seulement 68 cas entre 2006 et 2016 (données EFSA). Leur concentration dans les eaux usées est donc un paramètre important pour évaluer les risques sanitaires liés à l'usage des eaux usées traitées et à l'usage des eaux de surface contaminées par les rejets de STEP. Le genre *Salmonella* comprend 3 espèces, *Salmonella enterica*, *S. subterranea* et *S. bongori*. *S. enterica* est l'espèce la plus susceptible de causer des infections chez les êtres humains. Aux Etats-Unis la salmonellose non-typhique représente 1,4 millions de cas par an. Les matières fécales animales et humaines sont sources de salmonelles qui peuvent ensuite se retrouver dans les eaux usées et les eaux de surface générant un risque d'infection humaine (Sanchez et al. 2002).

Des protocoles de quantification par PCR en temps réel ont été mis en place au LEESU pour l'espèce *C. jejuni* et le genre *Salmonella* à l'aide d'un thermocycleur iQ (BioRad) et en suivant des protocoles publiés dans la littérature scientifique après avoir réalisé une synthèse bibliographique lors du stage de Solène Marzouk. Pour ce faire, le gène *HipO* codant pour l'hypurate hydrolase a été ciblé pour l'amplification spécifique de *C. jejuni* et le gène *ttr* impliqué dans la respiration du tetrathionate était ciblé pour l'amplification spécifique du genre *Salmonella* (Vondrakova et al. 2014, Malorny et al. 2007). Les amorces et sondes utilisées sont listées dans l'annexe 1, les conditions d'amplification dans l'annexe 3. Dans le cadre du stage de Solène Marzouk, des contrôles internes d'amplification ont été construits pour les deux cibles en clonant dans un vecteur plasmidique (pGEM-T, Promega) la séquence partielle du gène humain de la β -actine clonée flanquée des amorces sens et antisens de chaque cible. Les amplifications ont été ensuite validées avec des gammes étalons de *Salmonella enteridis* en triplicate, en vérifiant les contrôles négatifs, positifs et le contrôle interne d'amplification. La linéarité des gammes, leur limite de détection, la pente et l'efficacité de la PCR sont rapportés dans le Tableau 1. Les deux méthodes ont été validées et ont par la suite été utilisées pour quantifier *C. jejuni* et les salmonelles dans les eaux usées des deux STEP.

Tableau 1: Paramètres des gammes étalon pour la quantification par PCR en temps réel des salmonelles et de *Campylobacter jejuni*

	<i>Salmonella</i>	<i>C. Jejuni</i>
R ² de la droite d'étalonnage	-0,99	-0,99
Pente de la droite d'étalonnage	-3,65	-3,82
Intersection de la droite d'étalonnage	37,1	42,8
Efficacité de la PCR %	87,92	82,86
Limite de Quantification (cg/puits)	10	15

3- Mise au point des scripts bioinformatiques pour l'analyse de diversité bactérienne au LEESU

L'impact des deux traitements tertiaires sur la diversité des communautés bactériennes a été étudié à partir des ADN génomiques extraits par le LEESU en séquençant le gène de l'ARNr 16S sur la région V3-V4 à l'aide de la technologie MiSeq (Illumina) par la plateforme Research and Testing (Texas, USA). Pour le traitement bioinformatique des séquences, trois scrip

ts utilisant les logiciels Mothur, PEAR, Cutadapt, GAST, mothur2oligo, et MED ont été testés pour deux approches de regroupement des séquences : par OTU pour les scripts 1 et 2 (Operative Taxonomic Units qui regroupent les séquences similaires à 97 %) ou par ASV pour le script 3 (Amplicon Sequence Variant qui regroupe les séquences en comparant les zones les plus variables) (Annexe 4).

Les scripts 1 et 3 ont été comparés en analysant une communauté assemblée artificiellement dont la composition est connue (communauté HMP, Tableau 2) et les 3 scripts ont été comparés en analysant les séquences obtenues sur les échantillons prélevés en entrée et sortie de traitement tertiaire (Tableau 3).

Tableau 2 : Comparaison des indices de diversité alpha de la communauté HMP obtenus par les scripts 1 et 3

	Nombre de séquences	Indice de Shannon	Équitabilité	Richesse	Différence avec la communauté HMP réelle
attendu	32	2,88	0,95	21	
Script 1 (OTU-Mothur)	32	2,77	0,93	20	4.76%
Script 3 (ASV)	32	3,08	0,97	24	19%

Malgré des différences entre les scripts quant au nombre d'OTUs ou d'ASV et à l'assignation taxonomique (Tableau 2 et Tableau 3), globalement les 3 scripts rendaient des résultats similaires en terme d'analyse de l'impact des deux traitements sur la structure des communautés bactériennes (Tableau 3). Ainsi quel que soit le script, pour l'usine SAM les dissimilarités des communautés bactériennes en entrée et en sortie des traitements tertiaires sont plus importantes comparées à l'usine SCE (Tableau 4). Pour la suite du rapport les données obtenues par regroupement en OTUs avec le logiciel Mothur sont présentés (script1).

Tableau 3 : Comparaison des résultats obtenus par les trois scripts de traitement des séquences pour l'ensemble des communautés microbiennes des eaux usées échantillonnées.

	Script 1	Script 2	Script 3
Nombre de séquence finale	156839	203067	124104
Nombre de séquence après raréfaction	122948	153332	92709
Nombre d'OTU/ASV	7669 OTU	7408 OTU	544 ASV
Nombre de phylum	36	37	15
Temps de compilation	175min	180 min	126min

Tableau 4 : Dissimilarité entre les communautés bactériennes de l'entrée et la sortie du traitement tertiaire (indice de Bray-Curtis) calculée par les différents scripts bioinformatiques (moyenne et écart-type, n=4)

Station	Script 1	Script 2	Script 3
SAM	0,93 ± 0,01	0,84 ± 0,04	0.75 ± 0.01
SCE	0,74 ± 0,21	0,74 ± 0,11	0.48 ± 0.07

4- Rejet de pathogènes par les stations d'épuration parisiennes

Pour les virus entériques, sont présentées des données obtenues lors des 8 campagnes d'échantillonnage menées sur l'usine Seine Centre pour valider les protocoles entre les laboratoires du SIAAP et de Eau de Paris et les 25 campagnes menées par Benoit Prévost pour évaluer la contribution des rejets de STEP aux flux viraux dans les eaux de surface de la Seine (Prévost et al. 2015a). Pour ces campagnes, l'échantillonnage était ponctuel et a été réalisé entre mai 2013 et mai 2014. Les densités de norovirus GI et GII, adénovirus, rotavirus, entérovirus ont été détectées selon les protocoles de concentration, extraction et amplification validés ci-dessus et selon Prévost et al. (2015a).

Les densités de BIF et de pathogènes bactériens ont été mesurées en sortie de traitement secondaire des usines SAM et SCE lors de campagnes de prélèvements en entrée des traitements tertiaires avec 12 campagnes (du 6 novembre au 18 décembre 2013 et du 9 avril au 3 juin 2014) par temps sec pour l'usine SCE et 6 campagnes en 2014 (29 janvier 2014 et le 17 juin 2014) pour l'usine SAM. A l'usine Seine Centre, un échantillon composite de 20 L a été prélevé à l'entrée du traitement tertiaire à l'aide d'un préleveur automatique prélevant 100 mL toutes les 8 min pendant 24h.

Pour Seine Amont, pour raisons techniques un échantillonnage ponctuel de 21 L a été réalisé en entrée du traitement de désinfection à raison de 7 L toutes les 5 min à l'aide d'un préleveur automatique opéré en

manuel. Afin de comparer le prélèvement ponctuel et l'échantillonnage moyen sur 24h en entrée de l'usine SAM, des échantillons composites à raison de 1 L toutes les heures ont été prélevés à l'aide du préleveur automatique pour 5 des 6 campagnes. Toutefois, le prélèvement ponctuel ne montrait pas de différence significative avec le prélèvement moyen sur 24h. Ceci a été vérifié en comparant les concentrations en *E. coli*, entérocoques intestinaux, carbone organique total, N total, P total, matières en suspension et la conductivité (tests de Wilcoxon apparié, n=5, p>0.05). La méthode ponctuelle était juste plus variable (Figure 8). Il est donc raisonnable de considérer que la méthode d'échantillonnage ponctuelle n'a pas biaisé de manière significative les résultats.

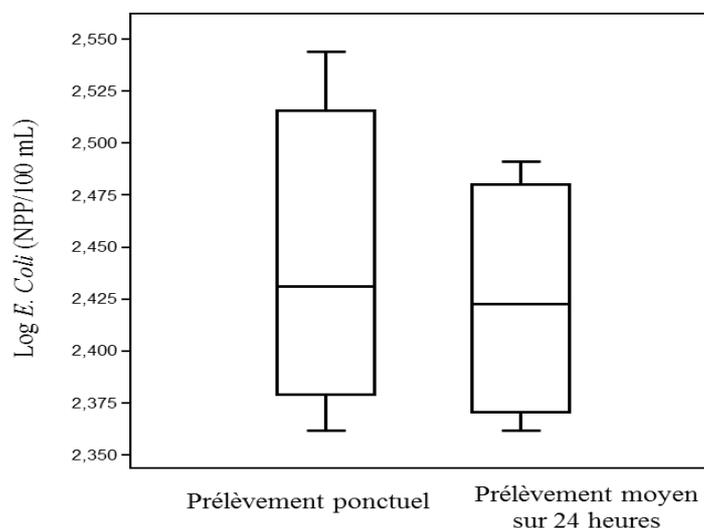


Figure 4: Comparaison du prélèvement ponctuel avec le prélèvement moyen sur 24h pour les densités en *E. coli*

T Les *E. coli* ont été mesurées selon la norme ISO 9308-3, et les entérocoques intestinaux selon la norme ISO 7899-1. Les résultats sont exprimés en Nombre le Plus Probable (NPP) par 100 mL. Les mycobactéries, salmonelles et *Campylobacter* ont été quantifiés dans 2 L d'eau prélevée. Le volume de 2 L a été concentré par 3 étapes de centrifugation (7500 g pendant 1h dans des pots de centrifugation de 1L, 10000 g pendant 30 min en tube de centrifugation de 50 mL, puis 12000 g pendant 20 min en tube de centrifugation de 2 mL). L'ADN génomique a été extrait à l'aide du kit FastDNA SPIN kit for soil (MP Biomedical) à l'aide d'un agitateur FastPrep (MP Biomedical) selon le protocole du fabricant. Les salmonelles et *C. jejuni* ont été quantifiés par PCR en temps réel selon les méthodes décrites au paragraphe 2, les mycobactéries ont été quantifiées par PCR en temps réel en amplifiant le gène *atpE* codant pour la sous unité A de l'ATP synthetase selon le protocole de Radomski *et al.* (2013) et Roguet *et al.* (2016).

4-1. Virus entériques

Les virus entériques ont été détectés dans 100% des échantillons des deux campagnes pour les adénovirus, les rotavirus A et les norovirus (Figure 5 et Tableau 5). Les entérovirus n'étaient pas détectés dans tous les échantillons (Figure 5). Les concentrations en adénovirus, norovirus GII et Rotavirus étaient comprises entre 10^4 et 10^5 copies de génome par 10L alors que les entérovirus étaient plus faiblement représentés (entre 10^2 et 10^3 cg/10 L, Figure 5 et Tableau 5).

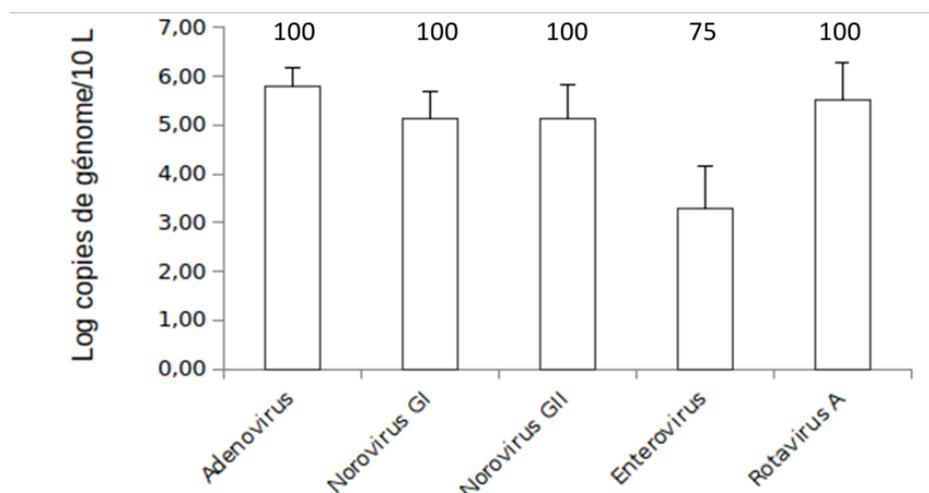


Figure 5: Concentrations virales (Log copies de génome/10 L, moyenne et écart-type, n=8), dans les rejets de la station d'épuration Seine Centre. Les chiffres au-dessus des barres indiquent le % d'échantillons positifs

Ces résultats sont comparables à ceux de la littérature scientifique (Lodder et al. 2005, Myrmel et al. 2006, Katayama et al. 2007). Les virus entériques sont à l'origine des gastroentérites « endémiques » survenant chaque hiver, touchant principalement les jeunes enfants. Une personne infectée par un virus entérique, malade ou porteur sain, élimine dans ses selles jusqu'à 10^{11} particules virales par gramme de matière fécale (Schwartzbrod 2000). La période et la durée d'excrétion virale peut varier de 2 à 4 semaines pour les norovirus à 2 mois pour quelques souches d'entérovirus (Le Guyader et al. 2014). Ces virus éliminés dans les selles humaines se retrouvent dans les eaux usées d'origine domestique. Il y a de ce fait une concordance entre les concentrations en virus dans les eaux usées des stations d'épuration parisiennes et les périodes épidémiques (Prévost et al. 2015b).

Tableau 5: Concentrations de virus entériques dans les rejets des usines Seine Amont et Seine Centre (\log_{10} copies de génome/10L, moyenne et écart-type des échantillons positifs, n=25)

Virus	Seine Amont		Seine Centre	
	Densité (Log ₁₀) (cg/10L)	Échantillons positifs	Densité (cg/10L)	Échantillons positifs
Norovirus GI	3,72±0,72	25	4,93±1,00	25
Norovirus GII	4,13±0,73	23	5,11±0,91	25
Adénovirus	4,76±0,52	25	5,77±0,56	23
Entérovirus	2,41±0,80	9	3,09±0,88	20
Rotavirus	4,50±0,91	19	5,32±1,51	22

4-2. Indicateurs de contamination fécale et pathogènes bactériens

En sortie de l'usine Seine Centre (entrée de traitement tertiaire, n=8), les densités d'*E. coli* étaient de $3,30 \pm 0,68$ Log de NPP/100 mL et les densités d'entérocoques intestinaux de $2,27 \pm 0,50$ Log de NPP/100 mL. En sortie de l'usine Seine Amont (entrée de traitement tertiaire, n=6), les densités d'*E. coli* étaient de $4,41 \pm 0,10$ Log de NPP/100 mL et les densités d'entérocoques intestinaux de $3,88 \pm 0,09$ Log de NPP/100

mL. Ces résultats sont cohérents avec les données acquises par le SIAAP entre 2012 et 2015 pour les rejets de ces deux stations d'épuration (Azimi et al. 2016).

Les densités de salmonelles et de *C. jejuni* étaient inférieures à la limite de détection. Les Salmonelles et *C. jejuni* sont communément présents dans les eaux usées brutes (Wery et al. 2008). Malgré une bonne capacité des salmonelles et *C. jejuni* à survivre aux traitements en station d'épuration (Sahlström et al., 2004, Wery et al. 2008), nous ne les avons pas détectées en sortie des usines SCE et SAM.

Concernant les Mycobactéries les concentrations étaient de $7,17 \pm 0,75$ Log copie de génome/L en sortie de l'usine Seine Amont et de $6,59 \pm 0,52$ Log cg/L en sortie de l'usine Seine Amont. La présence de mycobactéries n'est pas surprenante car plusieurs articles récents ont montré la présence de mycobactéries dans les eaux usées traitées (e.g. Cai et Zhang 2013, Kumaraswamy et al. 2014). En 2011, nous n'avions pas détecté de mycobactéries en sortie de l'usine Seine Centre (Radomski et al. 2011), toutefois les méthodes d'extraction et celle d'amplification utilisées alors n'étaient pas aussi performantes.

Les concentrations en BIF et mycobactéries étaient plus élevées à l'usine SAM qu'à l'usine SCE, ce qui est en accord avec les mesures effectuées lors d'une étude précédente (Lucas et al. 2014). Ceci peut être dû au fait que les eaux usées arrivant à l'usine SCE sont de nature différente et plus diluées par les eaux de lavage de voirie et les eaux pluviales, car le réseau est unitaire à Paris alors qu'il est séparatif à Valenton.

4-3. Communautés bactériennes

La composition des communautés bactériennes dans les rejets différait entre les deux usines. Les rejets de l'usine Seine Centre étaient dominés par les Protéobactéries (91%) alors qu'à l'usine Seine Amont les communautés bactériennes étaient dominées par les Protéobactéries (51%), les Actinobactéries (19%) et les Bacteroidetes (13%) (Figure 6). La richesse taxonomique dans les rejets était relativement similaire entre les deux STEP (937 ± 343 OTUs pour l'usine SCE, 982 ± 133 OTUs pour l'usine SAM), par contre il y avait une dominance très forte de certains OTUs à l'usine SCE (indice d'équitabilité de $0,80 \pm 0,02$) comparé à l'usine SAM où la distribution des taxons était plus équitable ($0,60 \pm 0,05$). Cette différence très nette de composition et structure des communautés bactériennes entre les deux usines peut être liée au fait que l'usine SCE reçoit essentiellement des eaux usées domestiques alors que l'usine SAM reçoit des eaux usées industrielles en plus des eaux usées domestiques, ce qui se traduit par une qualité physico-chimique très différente des eaux brutes (Lucas et al. 2014) et sans doute un apport en espèces bactériennes différent. De plus, les filières de traitement ne sont pas identiques entre les deux stations et peuvent donc exercer une sélection différente sur les espèces bactériennes. Tout ceci doit contribuer à l'assemblage de communautés bactériennes très divergentes dans les eaux usées traitées par ces deux stations d'épuration.

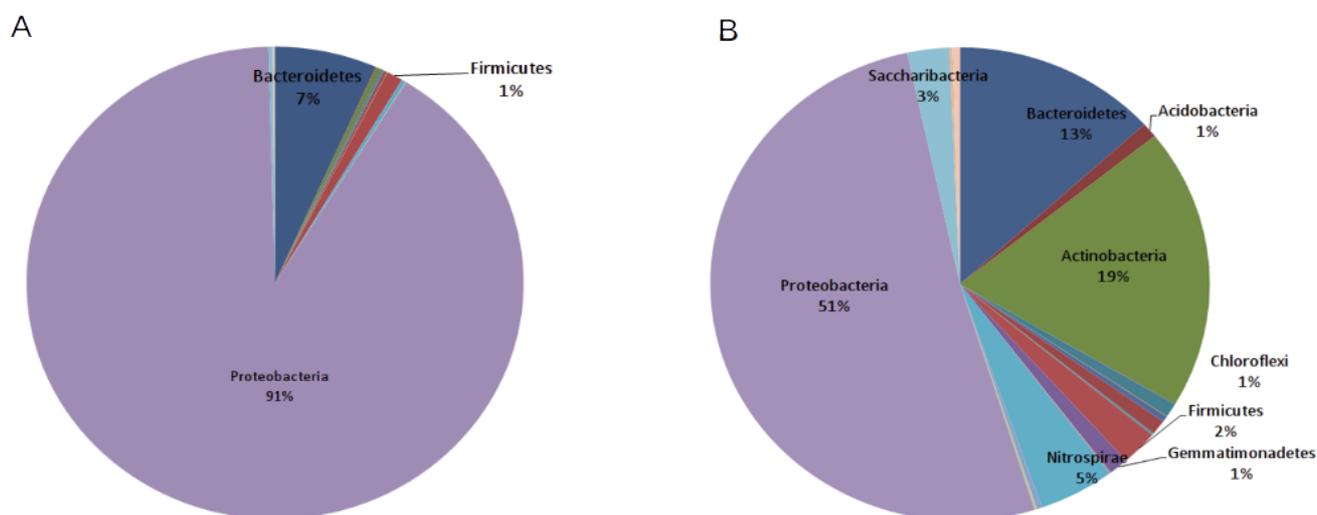


Figure 6: Distribution des phyla bactériens dans les rejets des usines Seine Centre (A) et Seine Amont (B)

4-4. Conclusion

Les eaux usées rejetées par les deux stations d'épuration peuvent constituer une source de microorganismes d'origine fécale incluant des microorganismes pathogènes pour l'homme. Ainsi ces eaux contiennent encore des concentrations élevées en virus entériques humains, et en mycobactéries (genre bactérien qui comprend une vingtaine d'espèces pathogènes opportunistes). De plus, pour l'usine SAM, le suivi mensuel effectué par le SIAAP montre la présence de kystes de *Giardia* avec des densités comprises entre 10 et 345 kystes/10 L entre le 29 janvier 2013 et le 17 juin 2014. Par contre, ce suivi mensuel ne détectait pas de légionelles, ni d'oocyste de *Cryptosporidium* dans les eaux rejetées par la STEP SAM (données fournies par A. Besombes).

5- Efficacité épuratoire du pilote CarboPlus®

Le procédé CarboPlus® à charbon actif fluidisé (Société Stereau) permet d'éliminer les micropolluants organiques (pesticide, résidus médicamenteux, perturbateurs endocriniens,...) dans les eaux. Son écoulement ascendant maintient le charbon actif en suspension (Figure 7). Le contact entre l'eau et les particules de charbon est ainsi optimal, ce qui permet l'adsorption de la matière organique et des micropolluants (STEREAU, 2013). Le procédé peut être mis en œuvre dans une version micro-grains, de faible granulométrie, ou une version poudre. Un pilote CarboPlus® a été installé à l'usine Seine Centre en sortie de traitement secondaire (biofiltration pour l'élimination du carbone et de l'azote) et testé dans les deux configurations. S'est posée la question de savoir si en plus d'éliminer les micropolluants organiques ce procédé aurait aussi un effet sur l'élimination des pathogènes. En effet, il existe dans la littérature scientifique des études qui rapportent la possibilité d'adsorption de micro-organismes sur le charbon actif (Tobin et al. 1981, Burlingame et al. 1986). Les microorganismes s'attachent aux particules de charbon actif via les forces de de Lifshitz-van der Waals en particulier dans les eaux à faible force ionique (eau potable). Les capacités d'élimination des pathogènes peuvent être renforcées par modification des charges de surface des particules de charbon actif ou en réalisant un revêtement avec des métaux tels que le cuivre (Kennedy et al. 2008, Busschner et al. 2006).

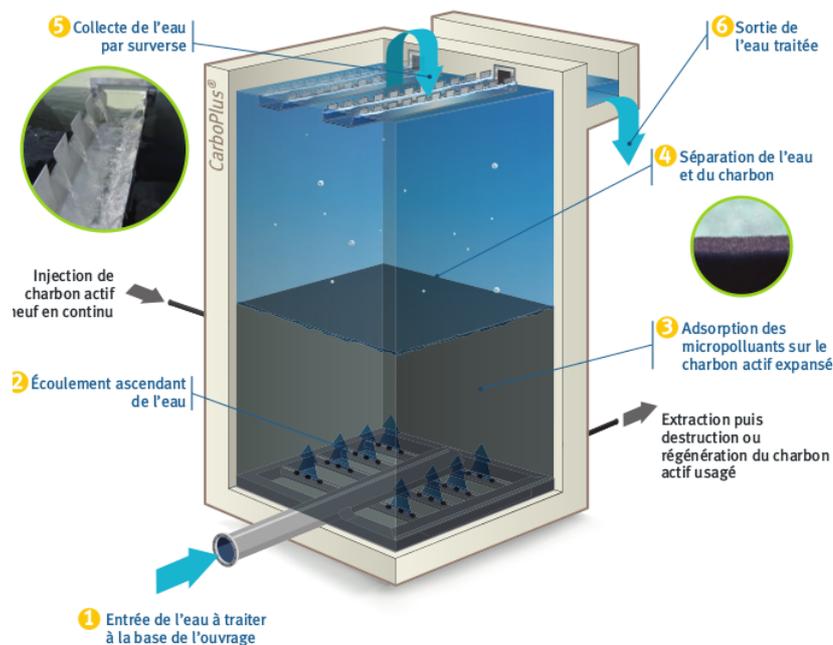


Figure 7: Procédé de traitement CarboPlus® (STEREAU 2013)

5-1. Prélèvements et analyses

Le pilote a été testé dans les deux configurations par temps sec, avec 6 campagnes en configuration poudre du 6 novembre au 18 décembre 2013 et 6 campagnes en configuration micrograins du 9 avril au 3 juin 2014. Le réacteur a été mis en opération en configuration poudre le 1er juillet 2013, la montée en charge a duré jusqu'au 14 octobre 2013 et la fin de la montée en charge a été réalisée du 25 octobre 2013 au 15 janvier 2014. La vitesse ascensionnelle était de 7 m/h et le charbon actif a été utilisé à une concentration de 10 g/m³. Quant à la configuration micrograins, la montée en charge sans sous-tirage a commencé le 5 mai 2014 jusqu'à la mi-juillet 2014. La concentration du charbon actif utilisée était de 20 g/m³ avec une vitesse ascensionnelle de 15 m/h.

Tous les échantillonnages ont été réalisés en prélevant un volume de 20 L dans un flacon en verre stérilisé à l'autoclave à 121°C pendant 20 min ou au four à 500°C pendant 2h. Les échantillons ont été prélevés en entrée et en sortie du pilote pendant 24 heures à raison de 100 mL d'eau usée toutes les 8 min, à l'aide d'un échantillonneur automatique réfrigéré. Les concentrations des BIF ont été déterminées au LEESU selon les normes NF EN ISO 7899-1 et NF EN ISO 9308-3 et les résultats sont exprimées en NPP/100 mL. Les concentrations en virus entériques, salmonelles, *C. jejuni* et mycobactéries ont été déterminées par PCR en temps réel selon les protocoles de concentration, extraction et amplification décrits dans les paragraphes précédents. Les résultats sont exprimés en copies de gène (cg) par 10 L pour les virus et par 1 L pour les bactéries. Le nombre total de cellules procaryotiques (bactéries et archées) a été déterminé par comptage au microscope fluorescent après coloration au DAPI selon Lucas et al. (2014). La composition des communautés bactériennes a été analysée comme décrit ci-dessus, sont présentés les résultats pour les regroupements en OTUs après traitement des données par le logiciel Mothur (script 1). Les paramètres physico-chimiques (MES, DCO, NH₄⁺, NO₂⁻, NO₃⁻, N total, PO₄²⁻, P total, conductivité, pH, température) ont été mesurés par le laboratoire de recherche et développement du SIAAP.

5-2. Effet du traitement

Globalement le procédé CarboPlus® n'a eu aucun effet sur les communautés bactériennes, les BIF et les pathogènes que ce soit en configuration poudre ou micrograin. Ainsi, il n'y a pas de différence significative de concentration entre l'entrée et la sortie du pilote pour les différents virus entériques, ni pour les cellules procaryotiques, ni pour les BIF, ni pour les mycobactéries (tests de Wilcoxon appariés, n=4 à 6, p>0,05, Tableau 6). *C. jejuni* et *Salmonella* n'étaient pas détectés ni en entrée, ni en sortie du pilote.

Tableau 6: Concentrations en pathogènes et cellules procaryotes en entrée et sortie du pilote CarboPlus® dans les configurations en poudre et en micrograins (n=5 à 6)

pathogène	poudre		micrograin	
	entrée	sortie	entrée	sortie
Log cellules procaryotes/ mL	6,15±0,29	6,23±0,23	6,04±0,14	6,05±0,17
Log <i>E. coli</i> /100 mL	3,11±0,96	2,73±1,14	3,49±0,11	3,63±0,08
Log Entérocoques intestinaux/100 mL	2,36±0,69	2,01±0,69	2,18±0,23	2,09±0,18
<i>Mycobacterium</i> (Log cg/L)	6,59±0,42	6,21±0,88	6,58±0,65	6,27±0,56
Norovirus GI (Log cg/10L)	5,04±0,63	4,72±0,32	5,93±0,81	5,96±1,59
Norovirus GII (Log cg/10L)	5,66±0,90	5,29±0,63	5,83±0,79	5,83±1,46
Adenovirus (Log cg/10L)	4,82±0,27	4,39±0,46	5,14±0,69	5,37±1,10
Enterovirus (Log cg/10L)	3,50±1,32	2,18±1,55	4,93±0,94	4,67±1,81
Rotavirus (Log cg/10L)	4,55±0,33	2,64±2,48	6,85±0,49	6,21±1,84

Au niveau de la composition et la structure des communautés bactériennes, aucune différence majeure n'était visible pour la configuration en micrograin. En effet, l'analyse hiérarchique (Figure 8) montre pour l'usine SCE que les échantillons ne se séparent pas en deux groupes distincts selon l'entrée et la sortie de CarboPlus®. La Figure 8 montre également que les mêmes taxons (ici le niveau Phylum dans la classification bactérienne) composent les communautés d'entrée et de sortie du pilote CarboPlus® en configuration micrograins. La configuration en poudre n'a pas été analysée. En conclusion, le pilote CarboPlus® en configuration micrograins n'a pas eu d'effet significatifs sur les bactéries, ni sur les virus. Ce traitement, dans les conditions de tests réalisés en 2013 et 2014, ne peut donc pas servir de traitement tertiaire pour éliminer les pathogènes et améliorer la qualité microbiologique de l'eau rejetée par la station Seine Centre.

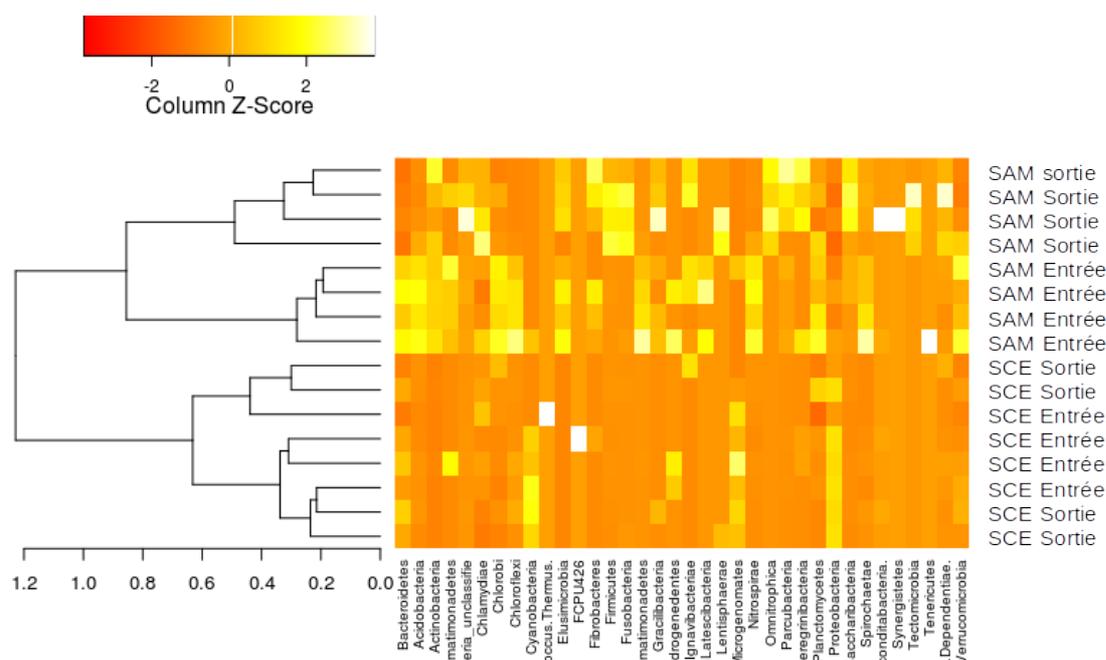


Figure 8: Comparaison des communautés bactériennes en entrée et sortie de traitement tertiaire à l'usine Seine Centre (SCE) et à l'usine Seine Amont (SAM) par analyse hiérarchique (dissimilarité de Bray-Curtis, regroupement Ward2)

6- Efficacité épuratoire du traitement tertiaire de l'usine Seine Amont

La STEP Seine Amont est équipée d'une unité de production d'eau industrielle ayant pour but d'éliminer les pathogènes pour atteindre une qualité d'eau acceptable pour une réutilisation en interne de l'eau produite. Cette unité est composée principalement :

- d'une station de pompage des eaux usées épurées prélevées sur le cerneau de collecte des rejets,
- d'une unité de filtration sur sable composée de quatre filtres à sable horizontaux dont l'objectif est d'obtenir une eau contenant moins de 3 mg/l de MES,
- d'une désinfection par rayonnement UV avec la mise en œuvre de réacteurs fermés travaillant sous pression,
- d'une unité de chloration par chlorure ferrique et javel.

Lors de la filtration sur sable, les virus et les bactéries peuvent être soit retenus selon leur taille, soit prédatés ou lysés par le biofilm, soit déchetés par les frottements entre les grains de sable, soit adsorbés sur le filtre. L'inactivation par les UV est basée sur les dommages causés aux acides nucléiques. la chloration va avoir un effet oxidant sur les acides nucleiques, sur les proteines de la capsid virale et sur les constituants de la paroi bactérienne. Les performances de l'unité de désinfection sont suivies mensuellement par le SIAAP pour différents paramètres physico-chimique *E. coli*, les entérocoques intestinaux et phages ARN F-spécifiques).

6-1. Prélèvements et analyses

Les échantillonnages ont été réalisés entre le 29 janvier 2014 et le 17 juin 2014 (n=6). L'installation d'un préleveur automatique en sortie de traitements de désinfection n'a pas été réalisable car l'unité de traitement est sous pression. De ce fait, les analyses ont été faites sur des échantillons ponctuels en entrée et sortie du traitement tertiaire. Les prélèvements ponctuels ont été effectués en entrée à l'aide d'un préleveur automatique, avec 7 litres toutes les 5 minutes pour constituer un échantillon de 21 L. Vingt à trente min après le prélèvement en entrée (correspondant environ au temps de séjour de l'eau dans le procédé de désinfection), un robinet d'accès a été utilisé pour le prélèvement ponctuel en sortie. Après nettoyage du robinet à l'alcool, un volume de 5 L a été soutiré et écarté, puis pour raisons ergonomiques le prélèvement a été effectué par volumes de 1L à l'aide d'une fiole jaugée stérile et transférés dans le flacon de 20L.

6-2. Effet du traitement de désinfection

6-2-1.- Effet sur les communautés bactériennes

L'analyse hiérarchique des communautés bactériennes présentée précédemment en Figure 8, montre clairement une séparation en deux groupes des échantillons de l'usine SAM avec d'un côté les échantillons en entrée d'unité de désinfection qui présentent des communautés bactériennes similaires et différentes de celles en sortie du traitement de désinfection qui forment un groupe séparé. La diversité spécifique diminuait après traitement (test t, n=5, p<0,01), et l'abondance relative de plusieurs taxons a été modifiée. Par exemple, l'abondance relative des Firmicutes a augmenté significativement après le traitement (test de Wilcoxon, n=5, p<0,01, Figure 9), et celle des Bacteroidetes a diminué significativement (test de Wilcoxon, n=5, p<0,01, Figure 9). Ces résultats ne sont pas étonnants car les UV et la chloration ont déjà été rapportés comme ayant un impact fort sur la composition des communautés bactériennes (Pang et al. 2016, Hu et al. 2016). De plus, les Firmicutes sont connues pour résister aux traitements de désinfection de par l'épaisseur leur paroi et leur capacité à sporuler (Pang et al., 2016).

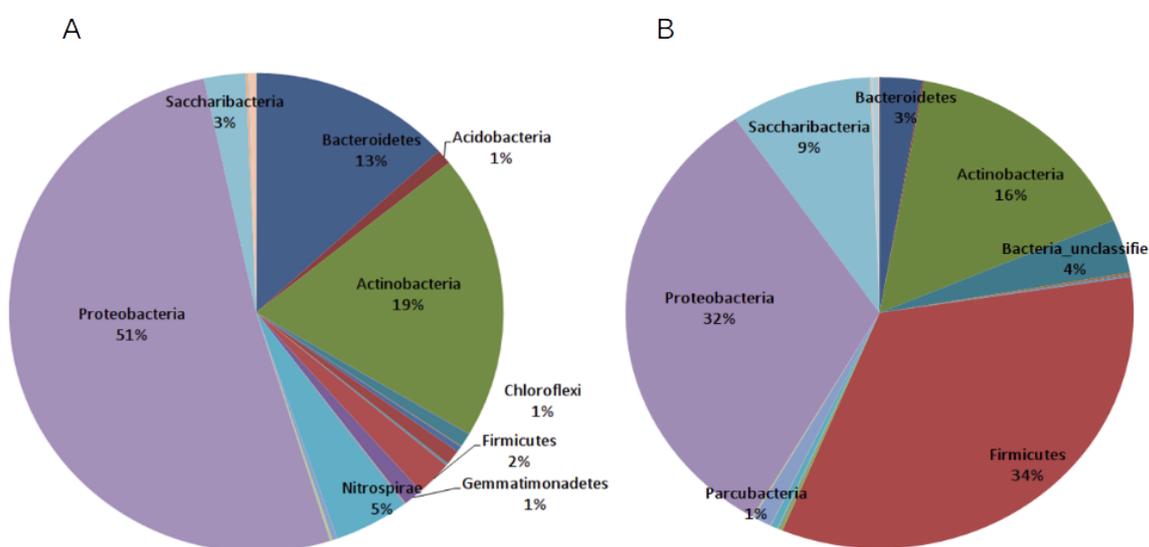


Figure 9: Distribution des phyla bactériens dans les eaux usées en entrée (A) et en sortie (B) du procédé de désinfection de l'usine Seine Amont

6-2-2.- Effet sur les indicateurs et les pathogènes

Le traitement de désinfection n'a pas affecté significativement le nombre total de cellules procaryotes (Test de Wilcoxon, n=6, p=0,336, Tableau 7), par contre il y a eu un abattement de 4 Log pour les *E. coli*, 1,5 Log pour les entérocoques intestinaux et 2 Log pour les mycobactéries (Tableau 7). Ces abattements étaient significatifs (Test de Wilcoxon, n=6, p>0,01). La différence d'abattement entre *E. coli* et les

entérocoques intestinaux n'est pas surprenante car les unes sont des Protéobactéries et les autres des Firmicutes dont les fréquences relatives varient de manière différente (Figure 9). Toutefois au regard de la littérature cette différence peut apparaître plus surprenante puisque généralement il est rapporté des abattements similaires de l'ordre de 3 Log pour les traitements au chlore et aux UV (Chang et al. 1985, Montemayor et al. 2008). L'abattement relativement faible des mycobactéries est probablement dû à leur paroi épaisse, riche en lipides et cires, qui leur confère une caractéristique très hydrophobe avec une tendance à s'agréger, ainsi qu'une plus grande imperméabilité aux désinfectants et une résistance aux UV (Bohrerova et Linden 2006, Levantesi et al. 2010). Il n'est donc pas surprenant d'avoir des différences importantes de résistance aux traitements entre les espèces bactériennes, qui tiennent à des différences d'épaisseur, de propriétés électrostatiques et d'hydrophobicité de leurs parois cellulaires (Levantesi et al. 2010).

Toutefois, il faut garder en tête que les méthodes de quantification par PCR et par microscopie fluorescente ne sont pas adaptées pour évaluer l'impact des UV qui n'endommagent pas la paroi cellulaire, mais seulement l'ADN. La cellule peut être morte mais conserver un ADN suffisamment intact pour être amplifié ou pour fixer la molécule intercalante servant à visualiser les cellules par marquage fluorescent. Les valeurs d'abattement obtenues peuvent donc être sous-estimées pour les mycobactéries et pour les cellules procaryotes totales.

Concernant les virus entériques, seuls les norovirus ont été détectés dans tous les échantillons en entrée du traitement de désinfection, les rotavirus et adénovirus n'ont été détectés que dans 2 échantillons sur 5, et les entérovirus seulement dans un échantillon (Tableau 7). Il était donc possible de calculer des abattements fiables et vérifier leur significativité uniquement pour les norovirus. Pour les norovirus de GI, l'abattement était très variable (entre 0 et 5,5 Log), et n'était donc pas significatif (test de Wilcoxon, n=5, p=0,441). Par contre les norovirus GII ont été significativement abattus de 2,6 Log (test de Wilcoxon, n=5, p=0,036). Ces résultats concordent avec une étude précédente qui a montré que les norovirus GI étaient plus résistants aux traitements que les norovirus GII (da Silva et al. 2007). Les virus entériques présentent une résistance vis-à-vis de certains processus de traitement de l'eau, ce qui explique leur persistance dans les eaux usées traitées (Aw et al. 2011). Ils présentent une stabilité environnementale plus importante que les bactéries indicatrices de contamination fécale (Schwartzbrod 2000). Concernant les autres virus dont nous n'avons pas pu estimer l'abattement, la littérature scientifique nous apprend que les entérovirus et les rotavirus sont moins résistants que les adénovirus qui sont généralement considérés comme très résistants à la désinfection (notamment au traitement UV et à la chloration) (Irving et Smith 1981, Comité fédéral-provincial-territorial sur l'eau potable 2004).

Tableau 7: Abattements (Log) et concentration en sortie (Log) des indicateurs et pathogènes par le traitement de désinfection de l'usine Seine Amont (moyenne et écart-type; le nombre d'échantillons utilisés est indiqué entre parenthèse). L'abattement des E. coli et Entérocoques intestinaux (Entérocoq.) est calculé à partir de densités par 100 mL, pour les cellules totales (cellules) les concentrations initiales sont exprimées par mL, par L pour les mycobactéries (Mycobact.) et par 10L pour les virus entériques

	<i>E. coli</i> (6/6)	Entérocoq. (6/6)	Cellules (6/6)	Mycobact. (6/6)	NVGI (5/5)	NVGII (5/5)	RV (2/5)	EV (1/5)	AdV (2/5)
Entrée :	(6/6)	(6/6)	(6/6)	(6/6)	(5/5)	(5/5)	(2/5)	(1/5)	(2/5)
Sortie :	(1/6)	(6/6)	(6/6)	(6/6)	(3/5)	(3/5)	(0/5)	(0/5)	(1/5)
Abattement (Log)	3,82±0,13	1,46±0,09	0,07±0,16	2,01±0,64	1,74±2,72	2,64±2,38	8,32±5,29	2,61	2,86±1,07
Densités (Log)	0,60±0,10	2,42±0,00	6,00±0,16	5,15±0,58	2,72±2,59	2,38±2,21	0,00±0,00	0,00±0,00	0,34±0,76

7- Conclusion générale

Le projet a permis la mise en place et la validation des méthodes de détection de 5 virus entériques (Norovirus GI et GII, Rotavirus A, Adénovirus, Entérovirus) au laboratoire de biologie moléculaire de la

DDP du SIAAP. Ceci a permis ensuite de mesurer l'impact de deux types de traitements tertiaires à l'usine Seine Centre et à l'Usine Seine Amont, les analyses sur les virus ayant été réalisées au laboratoire de la DDP et celles sur les bactéries au LEESU.

L'analyse de plusieurs paramètres microbiologiques a montré que le pilote CarboPlus® ne présentait pas d'abattement significatif des indicateurs bactériens de contamination fécale, des mycobactéries, des 5 virus entériques ciblés quelle que soit la configuration en poudre ou en micrograins. Le pilote n'a pas eu de manière générale d'impact significatif sur la structure et la composition des communautés bactériennes. Le charbon actif utilisé dans le pilote lors des essais conduits en 2013-2014 ne semble donc pas adapté pour éliminer les pathogènes en plus des micropolluants organiques.

Le traitement de désinfection de l'usine Seine Amont, a montré comme attendu un impact fort sur les microorganismes. Ces abattements étaient variables d'un type de microorganisme à un autre et d'un taxon à l'autre. Il n'est donc pas possible de généraliser une estimation de l'abattement des pathogènes à partir des abattements des indicateurs de contamination fécale. Certains pathogènes dont les mycobactéries et les norovirus GI se sont montrés relativement résistants à la chaîne de traitement. Par ailleurs, plusieurs groupes bactériens semblent mieux résister aux traitements que d'autres et deviennent donc dominants dans les eaux rejetées. C'est notamment le cas des Firmicutes, phylum qui peut inclure des espèces pathogènes. De plus pour les microorganismes qui sont abattus de l'ordre de 2-3 Log comme les norovirus GII, la concentration en sortie du traitement reste relativement élevée dans la plupart des échantillons. Or contrairement aux bactéries pathogènes la dose infectieuse minimale des virus est très faible et un petit nombre de virus entériques peut déclencher une infection (Le Guyader et al. 2014).

Toutefois les niveaux détectés sont difficiles à interpréter en terme de risque, car cela dépendra des usages de l'eau traitée (rejet en Seine ou réutilisation pour l'arrosage, le nettoyage) et parce que la réglementation n'offre pas de valeurs guides. Actuellement aucune norme microbiologique n'existe concernant les rejets de station de traitement des eaux usées. La directive européenne 91/271/CEE, concernant la collecte, le traitement et le rejet des eaux résiduaires urbaines, impose uniquement des obligations de moyens sans préciser de limites microbiologiques dans les eaux traitées y compris lorsque cette eau est rejetée à proximité de zones sensibles (irrigation, zones conchylicoles...) (Le Guyader et al. 2014). L'Arrêté du 2 août 2010 relatif à l'utilisation d'eaux issues du traitement d'épuration des eaux résiduaires urbaines pour l'irrigation de cultures ou d'espaces verts ne spécifie pas de valeurs guides pour les virus, uniquement pour les indicateurs bactériens de contamination fécale et seulement en terme de niveau d'abattement. Aucun critère réglementaire n'existe pour les virus dans l'eau quelle que soit sa destination. Les critères microbiologiques sont seulement des critères bactériologiques qui concernent en général les indicateurs de contamination fécale.

Le traitement tertiaire employé à l'usine Seine Amont diminue donc significativement la présence de certains pathogènes (notamment les espèces appartenant aux Protéobactéries comme les genres *Escherichia*, *Salmonella*, *Shigella*, *Pseudomonas* ou *Aeromonas*, qui comprennent des espèces pathogènes obligatoires ou opportunistes). Toutefois, il ne permet sûrement pas d'atteindre un risque zéro pour tous les types d'usage en cas de réutilisation des eaux usées traitées. Il est adapté à l'utilisation actuelle qui nécessite une eau de qualité industrielle pour les lavages en gardant en tête qu'un usage générant des aérosols pourrait comporter un risque sanitaire. Toutefois, la méthode de détection par qPCR utilisée dans cette étude ne permet pas de conclure quant à l'infectiosité des virus et des bactéries, il faut donc être prudent quant aux conclusions sur les risques de réutilisation de ces eaux traitées dans l'usine Seine-Amont.

REMERCIEMENTS

Nous remercions Vincent Rocher et Alexandre Gonçalves du SIAAP, les équipes du SIAAP qui ont aidé au prélèvement et aux mesures, notamment Fanny Richard, Sébastien Pichon, Céline Briand, Jean-François Moisan, Gauthier Le Moigne, Julien Pouillaude. Nous remercions vivement Adrien Besombes de la société Sequaris, ainsi que son équipe pour son accueil à la station Seine Amont et pour les données de suivi de l'unité de désinfection. Enfin nous sommes reconnaissant à l'équipe de la SAURE qui assurait la visite et la conduite du pilote CarboPlus®.

REFERENCE

- Atmar RL, Opekun AR, Gilger MA, Estes MK, Crawford SE, Neill FH, Ramani S, Hill H, Ferreira J, Graham DY (2014). Determination of the 50 % human infectious dose for Norwalk virus. *J. Infect Dis* 209:1016-1022
- Azimi S, Mailler R, Pichon S, Bernier J, Guérin-Rechdaoui S, Mouchel JM, Lucas F, Rocher V (2016). Bactéries indicatrices fécales dans les effluents urbains - Focus sur les rejets d'eau traitée et les déversements de temps de pluie. In : Rocher V., Azimi S. (eds). Qualité microbiologique des eaux en agglomération parisienne. édition Johannet, ISBN : 9791091089296, pp 96
- Aw TG, Gin KYH (2011). Prevalence and genetic diversity of waterborne pathogenic viruses in surface waters of tropical urban catchments, *Applied Microbiology*, 110:903-914.
- Bixio D, De Heyder B, Cikurel H, Muston M, Miska V, Joksimovic D, Schäfer AI, Ravazzini A, Aharoni A, Savic D, Thoeue C (2005). Municipal wastewater reclamation: where do we stand? An overview of treatment technology and management practice. *Water Sci Technol Water Supply* 5:77-85
- Blumenthal UJ, Mara DD, Peasey A, Ruiz-Palacios G, Stott R (2000). Guidelines for the microbiological quality of treated wastewater used in agriculture: recommendations for revising WHO guidelines. *Bull World Health Organ* 78(9):1104-1116
- Bohrerova Z, Linden KG (2006). Ultraviolet and chlorine disinfection of Mycobacterium in wastewaters : effect of aggregation. *Water Environment Research* 78 : 565-571
- Boom R, Sol CJ, Salimans MM, Jansen CL, Wertheim-van Dillen PM, van der Noordaa J (1990). Rapid and simple method for purification of nucleic acids. *J Clin Microbiol* 28:495-503
- Burlingame, G. A.; Suffet, I. H.; Pipes, W. O. Predominant bacterial genera in activated carbon water treatment systems. *Can. J. Microbiol.* 1986, 32, 226-230.
- Busscher HJ, Dijkstra RJB, Engels EEFJE, Langworthy DE, Collias D, Bjorkquist DW, Mitchell MD, van der Mei HC (2006). Removal of Two Waterborne Pathogenic Bacterial Strains by Activated Carbon Particles Prior to and after Charge Modification. *Environ Sci Technol* 40 :6799-6804
- Cai L, Zhang T (2013). Detecting Human Bacterial Pathogens in Wastewater Treatment Plants by a High-Throughput Shotgun Sequencing Technique. *Environ Sci Technol* 47:5433-5441
- Chang JCH, Ossof SF, Lobe DC, Dorfman MH, Dumais CM, Qualls RG, Johnson JD (1985). UV Inactivation of Pathogenic and Indicator Microorganisms. *Appl Environ Microbiol* 49:1361-1365
- Comité fédéral-provincial-territorial sur l'eau potable (2004). Recommandations pour la qualité de l'eau potable au Canada : documentation à l'appui des virus entériques. Santé Canada, Comité fédéral-provincial-territorial sur la santé et l'environnement, Canada, pp 1-27.
- da Silva, A.K., Le Saux, J.-C., Parnaudeau, S., Pommepuy, M., Elimelech, M., Le Guyader, F.S., 2007. Evaluation of removal of noroviruses during wastewater treatment using real-time reverse transcription-PCR: different behaviors of genogroups I and II. *Applied and Environmental Microbiology* 73 (24), 7891-7897.
- Frost JA (2001). Current epidemiological issues in human campylobacteriosis. *J. Appl Microbiol* 90:85S-95S
- Glass RI, Parashar UD, Estes MK (2009). Norovirus gastroenteritis, *The New England Journal Of Medicine*, 361 :1776-17785.
- Gonçalves A, Rocher V, Pichon S (2009). Bacteriological quality of waters in Paris area. From sewage network to receiving water bodies. *Tech Sci Méthodes* 3:38-49
- Hu Q, Zhang X.X, Jia S, Huang K, Tang J, Shi P, Ye L, Ren H (2016). Metagenomic insights into ultraviolet disinfection effects on antibiotic resistome in biologically treated wastewater. *Water Research* 101:309-317.
- Irving LG, Smith FA (1981). One-year survey of enteroviruses, adenoviruses, and reoviruses isolated from effluent at an activated-sludge purification plant. *Appl Environ Microbiol* 41 :51-59.
- Jones K (2001). Campylobacters in water, sewage and the environment, *Journal of Applied Microbiology*, 90 :68-79.
- Katayama H, Haramoto E, Oguma K, Yamashita, Tajima A, Nakajima H, Ohgaki S, (2007). One -year monthly quantitative survey of noroviruses, enteroviruses and adenoviruses in wastewater collected from six plants in Japan, *Wat Res* 42 :1441-1448.
- Kay D, Edwards AC, McDonald AT, Stapleton CM, Wyer

- M, Crowther J(2007). Catchment microbial dynamics: the emergence of a researchagenda. *Prog Phys Geogr* 31:1–18
- Koenraad PM FJ, Rombouts FM, Notermans SHW (1997). Epidemiological aspects of thermophilic *Campylobacter* in water-related environments: a review. *Water Environ Res* 69:52-63
- Kristensen P (2013). Urban wastewater treatment (CSI 024) Fact sheet. European Environmental Agency, Denmark
- Le Guyader FS, Ollivier J, Le Saux JC, Garry P (2014). Les virus entériques humains et l'eau, *Microorganismes Pathogènes De L'eau* 459 :41-49.
- Levantesi C, La Mantia R, Masciopinto C, Böckelmann U, Ayuso-Gabella MN, Salgot M, Tandoi V, Van Houtte E, Wintgens T, Grohmann E (2010). Quantification of pathogenic microorganisms and microbial indicators in three wastewater reclamation and managed aquifer recharge facilities in Europe *Science of the Total Environment* 408 :4923-4930
- Lodder WJ, de Roda Husman AM (2005). Presence of noroviruses and other enteric viruses in sewage and surface waters in the Netherlands. *Appl Environ Microbiol* 71 :1453-1461.
- Lucas FS, Therial C, Goncalves A, Servais P, Rocher V, Mouchel JM (2014). Variation of raw wastewater microbiological quality in dry and wet weather conditions. *Environ. Sci. Pollut. Res. Int* 21 : 5318–5328.
- Malorny B, Bunge C, Helmuth R (2007). A real-time PCR for the detection of *Salmonella enteritidis* in poultry meat and consumption eggs. *Journal of Microbiological Methods* 70:245–251.
- Montemayor M, Costan A, Lucena F, Jofre, J, Munoz J, Dalmau E, Mujeriego R, Sala L (2008). The combined performance of UV light and chlorine during reclaimed water disinfection. *Water Science Technology* 57:935-940
- Myrmel M, Berg EMM, Grinde B, Espen R (2006). Enteric viruses in inlet and outlet samples from sewage treatment plants, *J Water Health* 4:197-209.
- Pang Y.C, Xi JY, Xu Y, Huo Z.Y, Hu HY (2016). Shifts of live bacterial community in secondary effluent by chlorine disinfection revealed by Miseq high-throughput sequencing combined with propidium monoazide treatment. *Appl Microbiol Biotechnol* 100:6435–6446.
- Payment P, Locas A (2011). Pathogens in water: value and limits of correlation with microbial indicators. *Ground Water* 49(1):4–11
- Pothier P (2005). Calcivirus Astrovirus and Adenovirus: relevance in pediatrics?, *Archives de pediatric*, 12:841-843
- Prevost B, Lucas F, Ambert-Balay K, Pothier P, Moulin L, Wurtzer S (2015b). Deciphering the astrovirus and norovirus diversity in wastewater treatment plant effluents by high-throughput sequencing method. *Appl. Environ. Microbiol.* 81:7215-22
- Prevost B, Lucas FS, Goncalves A, Richard F, Moulin L, Wurtzer S (2015a). Large scale survey of enteric viruses in river and waste water underlines the health status of the local population. *Environment International* 79:42-50
- Wurtzer S, Prevost B, Lucas FS, Moulin L (2014). Detection of enterovirus in environmental waters: a new optimized method compared to commercial real-time RT-qPCR kits. *J. Virol. Methods* 209 :47–54.
- Radomski N, Betelli L, Moillon R, Haenn S, Moulin L, Cambau E, Rocher V, Goncalves A, Lucas FS (2011). *Mycobacterium* behavior in wastewater treatment plant : a bacterial model distinct from *Escherichia coli* and enterococci. *Environ Sci Technol* 45 :5380–5386.
- Radomski N, Roguet A, Lucas FS, Veyrier FJ, Cambau E, Accrombessi H, Moillon R, Behr MA, Moulin L (2013), *atpE* gene as a new useful specific molecular target to quantify *Mycobacterium* in environmental samples. *BMC Microbiology* 13 :277-289
- Azimi S, Mailler R, Pichon S, Bernier J, Guérin-Rechdaoui S, Mouchel JM, Lucas F, Rocher V (2017). Bactéries indicatrices fécales dans les effluents urbains - Focus sur les rejets d'eau traitée et les déversements de temps de pluie. In: *Qualité bactériologique des eaux en agglomération parisienne: des eaux usées aux eaux de Seine*. Rocher V, Azimi S (eds). Editions Johannet, Paris, pp 31-41
- Roguet A, Therial C, Saad M, Boudahmane L, Moulin L, Lucas FS (2016). High mycobacterial diversity in recreational lakes. *Antonie van Leeuwenhoek* 109(5): 619-31.

- Sahlström L, Aspen A, Bagge E, Danielsson-Tham M-L, Albiñ A (2004). Bacterial pathogen incidences in sludge from Swedish sewage treatment plants. *Water Res* 38:1989–1994
- Sanchez S, Hofacre CL, Lee MD, Maurer JJ, Doyle MP (2002). Animal sources of salmonellosis in humans. *JAVMA* 221(4):492-497
- Schijven J, de Roda Husman AM (2006). A Survey of Diving Behavior and Accidental Water Ingestion among Dutch Occupational and Sport Divers to Assess the Risk of Infection with Waterborne Pathogenic Microorganisms. *Environmental Health Perspectives* 114(5):712-7177
- Schwartzbrod L (2000). Virus humains et santé publique: conséquences de l'utilisation des eaux usées et des boues en agriculture et conchyliculture, Université de Nancy, & WHO, pp 289
- Servais P, Garcia-Armisen T, George I, Billen G (2007). Fecal bacteria in the rivers of the Seine drainage network: source, fate and modeling. *Sci Total Environ* 375:152–167
- Simon A, Mata L (1985). Fecal rotaviruses, adenoviruses, coronavirus-like particles, and small round viruses in a cohort of rural Costa Rican children, *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 5 :931-936.
- Sinclair RG, Jones EL, Gerba CP (2009). Viruses in recreational water-borne disease outbreaks: a review. *J Appl Microbiol* 107:1769-1780
- STEREAU (2013). le traitement des micropolluants pour la protection des milieux aquatiques, Plaquette publicitaire, France, pp 6
- Tate JE, Burton AH, Boschi-Pinto C, Steele AD, Duque J, Parashar UD (2012). 2008 estimate of worldwide rotavirus-associated mortality in children younger than 5 years before the introduction of universal rotavirus vaccination programmes : a systematic review and meta-analysis. *The Lancet Infectious Diseases* 12:136-141
- Tobin, R. S.; Smith, D. K.; Lindsay, J. A. Effects of activated carbon and bacteriostatic filters on microbiological quality of drinking water. *Appl. Environ. Microbiol.* 1981, 41, 646-651.
- Vondrakova L, Pazloarov J, Demnerova K (2014). Detection, identification and quantification of *Campylobacter jejuni*, *coli* and *lari* in food matrices all at once using multiplex qPCR. *Gut Pathog* 6:1-12.
- Wéry N, Lhoutellier C, Ducray F, Delgenès JP, Godon JJ (2008). Behaviour of pathogenic and indicator bacteria during urban wastewater treatment and sludge composting, as revealed by quantitative PCR. *Water Res* 42(1–2):53–62.
- Wéry N, Monteil C, Pourcher AM, Godon JJ (2010). Human-specific fecal bacteria in wastewater treatment plant effluents. *Water Res* 44: 1873–1883
- Zanetti F, De Luca G, Sacchetti R (2006). Microbe removal in secondary effluent by filtration. *Ann Microbiol* 56(4):313–317

ANNEXE 1

Tableau 8: Amorces et sondes utilisées pour quantifier les microorganismes par PCR en temps réel. {G} = LNA G base; {T} = LNA T base; Y = T or C base; R = A or G base; S = C or G base; D = A, G or T base; M = A or C base; K = G or T base; V = A, C or G base; W = A or T base.

Cible	Amorce ou sonde	Séquence 5'-3'	référence
<i>Mycobacterium</i>	FatpE	CGGYGCCGGTATCGGYGA	Radomski et al. (2013)
	RatpE	CGAAGACGAACARSGCCAT	
	PatpE	FAM-ACSGTGATGAAGAACGGBGTRAA-Dark Quencher	
<i>Campylobacter jejuni</i>	hipOF	TGCACCAGTGACTATGAATAACGA	Vondrakova et al. (2014)
	hipOR	TCCAAAATCCTCACTTGCCATT	
	hipOS	FAM-TTGCAACCTCACTAGCAAAAATCCACAGCT-DARK QUENCHER	
<i>Salmonella</i>	ttr-6	CTCACCAGGAGATTACAACATGG	Malorny et al. (2004)
	ttr-4	AGCTCAGACCAAAAAGTGACCATC	
	ttr-5	FAM-CACCGACGGCGAGACCGACTTT-Dark Quencher	
Enterovirus + Beta-Actine	EV_F453	GCCCCTGAATGCG	Wurtzer et al. (2014)
	EV_R583	TGTCACCATAAGCAGY	
	EV_P536	FAM-CCAAAGTAGTCGGTTCC-NFQ MGB	
	BACT P1172:	HEX-CCCCTCCATCGTCCACCGCAAATG-BHQ1	
Norovirus GI	NVGI_F5290	CGYTGGATGCGSTTCCAT	Prévost et al. (2015a)
	NVGI_R5374	CTTAGACGCCATCATCATTAC	
	NVGI_P5318	FAM-CGACYCCGTCACA-BHQ1	
Norovirus GII	NVGII_F5012	ATGTTYAGRTGGATGAGRTTCTC	Prévost et al. (2015a)
	NVGII_R5080	CGACGCCATCTTCATTACA	
	NVGII_P5042	HEX-AGCACGTGGGAGGGCGATCG-BHQ1	
Adénovirus	AdV_ABDEFG_F 17676	TACATGCAYATCGCCG	Prévost et al. (2015a)
	AdV_ABDEFG_R 17727	CGGGCRAAYTGCACC	
	AdV_ABDEFG_P 17694	FAM-CAGGAYGCTCGGARTAYCT-BHQ1	
Rotavirus A	RAV_F9	ATGSTTTTCAGTGGTTGMTGC	Prévost et al. (2015a)
	RAV_R83	AGCDACAACCTGCRGCTTC	
	RAV_P35	FAM-ATGA{G}TC{T}ACDCARCA{G}A{T}GG-BHQ1	

ANNEXE 2 Composition des solutions pour l'éluion des virus et pour l'amplification des acides nucléiques viraux et bactériens

Tableau 9: Composition du tampon d éluion des virus pour un échantillon

Composants	Concentrations finales
Extrait de bœuf	1% (p/v)
Tripolyphosphate de sodium	0.1% (p/v)
Glycine	0.05M
Tween 80	0.1%(v/v)
Émulsion antifoam (FLUKA)	0.1% (v/v)
Eau ultra pure	(qsp) 450 mL

Tableau 10: Concentration finale dans le mélange PCR (en μM) des amorces et sondes pour l'amplification des ADN de *C. jejuni* et des salmonelles

μM	<i>C. Jejuni</i>	<i>Salmonella</i>
Amorce sense	0,3	0,2
Amorce antisens	0,4	0,2
Sonde Taqman	0,05	0,05

Tableau 11: Composition des mélanges PCR (amorces, sonde, control interne). Pour les Entérovirus, le contrôle interne d'amplification est un fragment du gène codant pour la Beta-Actine, pour les Adénovirus le contrôle est un vecteur adénoviral. Les PCR sont réalisées avec un volume réactionnel de 20 μ L (5 μ L d'échantillon, 5 μ L de mix enzymatique, 5 μ L d'amorces et sondes, 5 μ L d'eau distillée). Le mélange *TaqMan® Fast Virus 1-Step Master Mix (Life Technologies)* est utilisé.

Mix PCR	Composition	Concentration finale (nM)
Pour les entérovirus	EV Forward	900
	EV Reverse	900
	EV sonde	100
	BACT Forward	300
	BACT Reverse	300
	BACT sonde	100
	Master Mix	1X
Pour les rotavirus	RV Forward	300
	RV Reverse	600
	RV sonde	100
	Master Mix	1X
Pour les norovirus GI et GII	NVGI Forward	600
	NVGI Reverse	300
	NVGI sonde	300
	NVGII Forward	900
	NVGII Reverse	300
	NVGII sonde	200
	Master Mix	1X
Pour les adénovirus	AdV Forward	300
	AdV Reverse	900
	AdV sonde	400
	AdV-V Forward	300
	AdV-V Reverse	300
	AdV-V sonde	100
	Master Mix	1X

ANNEXE 3. Conditions pour l'amplification des acides nucléiques par PCR en temps réel

Tableau 12: Programmation du thermocycleur pour l'amplification des acides nucléiques de virus

Etape	Température °C	Temps	Nombre de cycles
Transcription reverse	50	5 min	1X
Dénaturation de la reverse transcriptase et activation de l'ADN polymérase	95	20 s	1X
Dénaturation des brins d'ADN	95	5 s	45X
Hybridation et élongation	60	40s	45 X

Tableau 13: Programmation du thermocycleur pour l'amplification des ADN de C. jejuni et des salmonelles

Etape	Température °C	Temps	Nombre de cycles
Dénaturation des brins d'ADN	95	10 min	1X
Hybridation et élongation	95 60	20 s 1 min	40X
final	10	infini	1X

ANNEXE 4. Scripts bioinformatiques testés pour le traitement des séquences du gène de l'ARNr 16S. Les langages python et perl ont été utilisés. Certaines parties des scripts ont été réalisées à l'aide du logiciel Mothur (V 1.39.5), et d'autres avec Bioperl (v5.22.1). Enfin, pour l'analyse des ASV les algorithmes Mothur2oligo et MED ont été utilisés.

