



UNIVERSITE CLERMONT AUVERGNE

UFR DE PHARMACIE

Année : 2022

N°

**THESE D'EXERCICE POUR LE DIPLÔME D'ETAT DE DOCTEUR EN PHARMACIE**

Spécialité : BIOLOGIE MEDICALE

Présentée et soutenue publiquement

Le 14 octobre 2022 par

**Ophélie Perruche**

**DETECTION MOLECULAIRE DE *GIARDIA INTESTINALIS*,  
*CRYPTOSPORIDIUM SPP*, *ENTEROCYTOZOOM BIENEUSI*, ET  
*ENCEPHALITOZOOM SPP* DANS LES EAUX USEES  
DE LA STATION D'EPURATION DE CLERMONT-FERRAND  
ET ETUDE PAR METABARCODING DES GENOTYPES  
*D'ENTEROCYTOZOOM BIENEUSI***

**Directeur de thèse : Monsieur Philippe POIRIER**

Professeur des Universités, UFR Médecine de Clermont-Ferrand

**Jury :**

**Président : Madame Valérie LIVRELLI**

Professeur des Universités, UFR Pharmacie de Clermont-Ferrand

**Membres : Monsieur Jean-Luc BAILLY**

Maître de Conférence des Universités, Université Clermont Auvergne

**Monsieur Jean MENOTTI**

Maître de Conférence des Universités, ISPB Lyon





UNIVERSITE CLERMONT AUVERGNE

UFR DE PHARMACIE

Année : 2022

N°

**THESE D'EXERCICE POUR LE DIPLÔME D'ETAT DE DOCTEUR EN PHARMACIE**

Spécialité : BIOLOGIE MEDICALE

**Présentée et soutenue publiquement**  
**Le 14 octobre 2022 par**

**Ophélie Perruche**

**DETECTION MOLECULAIRE DE *GIARDIA INTESTINALIS*,  
*CRYPTOSPORIDIUM SPP*, *ENTEROCYTOZON BIENEUSI*, ET  
*ENCEPHALITOZON SPP* DANS LES EAUX USEES  
DE LA STATION D'EPURATION DE CLERMONT-FERRAND  
ET ETUDE PAR METABARCODING DES GENOTYPES  
*D'ENTEROCYTOZON BIENEUSI***

**Directeur de thèse : Monsieur Philippe POIRIER**  
Professeur des Universités, UFR Médecine de Clermont-Ferrand

**Jury :**

**Président : Madame Valérie LIVRELLI**  
Professeur des Universités, UFR Pharmacie de Clermont-Ferrand

**Membres : Monsieur Jean-Luc BAILLY**  
Maître de Conférence des Universités, Université Clermont Auvergne

**Monsieur Jean MENOTTI**  
Maître de Conférence des Universités, ISPB Lyon



## Remerciements

A Monsieur le Professeur Philippe Poirier

Merci d'avoir accepté de diriger ce travail et de m'avoir fait confiance pour le mener à bien,

A Madame le Professeur Valérie Livrelli,

Merci de me faire l'honneur de présider le jury de ma thèse,

A Monsieur le Docteur Jean-Luc Bailly,

Merci d'avoir accepté de juger mon travail,

A Monsieur le Docteur Jean Menotti,

Merci de votre participation à l'évaluation de ma thèse,

A Madame le Docteur Céline Nourrisson,

Merci d'avoir pris le temps de m'aider à la réalisation de ce travail,

A toute l'équipe du laboratoire de Parasitologie-Mycologie du CHU de Clermont-Ferrand,

Merci pour votre enthousiasme et votre gentillesse exprimés à mon égard,

A Madame Patricia Combes,

Merci pour tout l'investissement, et le temps consacré à ce travail,

A toute l'équipe du laboratoire de Virologie du CHU de Clermont-Ferrand,

Merci pour votre énergie et votre bienveillance,

A mes parents,

Merci pour votre soutien et vos encouragements dans toutes les étapes de ma vie,

A Pierre,

Merci de croire en moi et de m'accompagner depuis toutes ces années,

A mes ami(e)s et co-internes,

Merci pour votre présence que ce soit au début, au milieu ou à la fin de mon internat.



# SOMMAIRE

Remerciements .....	2
Listes des tableaux et figures .....	4
Liste des Abréviations .....	5
1. Introduction.....	6
2. Matériels et Méthodes.....	11
2.1 Échantillons d’eaux usées.....	11
2.2 Extraction d’ADN .....	11
2.3 Détection de <i>Giardia intestinalis</i> par PCR en temps réel .....	12
2.4 Détection génomique de <i>Cryptosporidium</i> spp, <i>Enterocytozoon bieneusi</i> et <i>Encephalitozoon</i> spp par PCR multiplex.....	12
2.5 PCR nichée ciblant l’ITS d’ <i>Enterocytozoon bieneusi</i> .....	13
2.6 Séquençage MiSeq .....	14
2.7 Construction de la base de données des ITS d’ <i>Enterocytozoon bieneusi</i> .....	15
2.8 Analyse des données de NGS .....	15
3. Résultats.....	17
3.1 Recherche par PCR en temps réel des 4 pathogènes.....	17
3.2 Eude des génotypes d’ <i>Enterocytozoon bieneusi</i> présents dans les eaux de la STEP de Clermont-Ferrand.....	18
3.2.1 Résultats de l’amplification par PCR nichée.....	18
3.2.2 Alpha diversité.....	18
3.2.3 Etude des génotypes d’ <i>E. bieneusi</i> présents dans les eaux de la STEP.....	19
4. Discussion .....	23
5. Conclusion .....	28
Références bibliographiques.....	29



## Listes des tableaux et figures

Figure 1: Arbre phylogénétique des génotypes ITS d' <i>E. bienersi</i> selon Karim et al. (2015).....	8
Figure 2: Plan de l'agglomération clermontoise autour de la station d'épuration "Les 3 rivières". .....	9
Figure 3: Plan de la station d'épuration "Les 3 rivières" et zone de recueil de l'eau. ....	10
Figure 4: Détection moléculaire de <i>Giardia intestinalis</i> , <i>Cryptosporidium</i> spp, <i>Enterocytozoon bienersi</i> , et <i>Encephalitozoon</i> spp dans les eaux usées de Clermont-Ferrand sur une période d'un an. ....	17
Figure 5: Analyse de l'alpha-diversité des échantillons selon trois indices (Chao1, Shannon et Simpson) dans les sédiments d'eaux usées par mois (5A) et par saison (5B). * = p<0.05, test de Wilcoxon. ....	18
Figure 6: Abondance relative des 50 génotypes les plus fréquents sur l'ensemble des échantillons. ....	19
Figure 7: Abondance relative des 50 génotypes les plus fréquents par échantillon. ....	20
Figure 8 : (A) Abondance relative des génotypes C, Wildboar3, Type IV, et S6 dans les eaux de la STEP de Clermont-Ferrand en fonction des mois. (B) Pourcentage de cas humains en France dont les génotypes C, Wildboar3, Type IV, et S6 sont responsables sur la même période que celle d'échantillonnage des eaux de la STEP de Clermont-Ferrand (données du réseau de surveillance des microsporidioses en France). ....	21
Figure 9: Abondance relative des groupes et sous-groupes phylogénétiques d' <i>E. bienersi</i> sur l'ensemble des échantillons. ....	22
Figure 10: Abondance relative des groupes et sous-groupes phylogénétiques d' <i>E. bienersi</i> par échantillon. ....	22
Tableau I : Amorces et sondes utilisées pour la détection moléculaire de <i>Giardia intestinalis</i> .....	12
Tableau II : Amorces et sondes utilisées dans la PCR multiplex .....	13
Tableau III : Amorces utilisées dans la PCR nichée ITS d' <i>Enterocytozoon bienersi</i> avec les adaptateurs de séquençage NGS .....	14



## Liste des Abréviations

ADN : acide désoxyribonucléique

ARNr : acide ribonucléique ribosomique

Crypto : *Cryptosporidium* spp

Ct : cycle threshold ou cycle seuil

dNTPs : désoxyribonucléotides triphosphate

EB : *Enterocytozoon bieneusi*

EI : *Encephalitozoon intestinalis*

ITS : Internal Transcribed Spacer

MgCl<sub>2</sub> : Chlorure de magnésium

MgSO<sub>4</sub> : Sulfate de Magnésium

m<sup>3</sup> : mètre cube

NGS : Next Generation Sequencing

OTU : Operating Taxonomic Unit

PCR : Polymerase Chain Reaction

pb : paires de bases

qPCR : Polymerase Chain Reaction quantitative

QSP : quantité suffisante pour

STEP : Station d'épuration des eaux usées

UE : Union Européenne

VIH : virus de l'immunodéficience humaine



## 1. Introduction

Les diarrhées infectieuses sont la principale cause de décès et de maladies chez les enfants de moins de cinq ans dans les pays en voie de développement. La fréquence des diarrhées aiguës dans les pays développés est de l'ordre d'un épisode par an et par habitant (1). Parmi les agents infectieux impliqués, on retrouve des parasites eucaryotes comme *Cryptosporidium* spp, *Giardia intestinalis*, et certaines microsporidies (principalement *Enterocytozoon bieneusi* et *Encephalitozoon intestinalis*). Ces pathogènes se transmettent facilement par l'ingestion d'eau ou d'aliments contaminés par des matières fécales, et parfois directement d'Homme à Homme (2).

*Cryptosporidium* spp est un parasite unicellulaire appartenant à l'ordre des Coccidies, et au phylum Apicomplexa. L'Homme se contamine principalement par l'ingestion d'oocystes présents dans l'eau ou les aliments. Sa prévalence estimée au sein de la population est de 7,6%, avec une fréquence plus élevée dans certains pays comme le Mexique, le Nigéria ou encore le Bangladesh (3). La cryptosporidiose est probablement sous-diagnostiquée et sous-déclarée, bien qu'une surveillance soit obligatoire dans l'Union Européenne (4). Une infection par *Cryptosporidium* spp peut provoquer des symptômes chez les sujets immunocompétents, devenant plus graves et chroniques chez les patients immunodéprimés, notamment les patients infectés par le virus de l'immunodéficience humaine (VIH) et les patients transplantés d'organes solides. On dénombre 44 espèces de *Cryptosporidium* spp, dont 29 sont infectantes pour l'Homme (5). En France, les espèces les plus fréquemment isolées chez l'Homme sont *Cryptosporidium parvum*, dont le principal réservoir est le bétail domestique (bovins), et *Cryptosporidium hominis*, retrouvé principalement chez l'Homme. D'autres espèces sont retrouvées de façon plus minoritaire : *Cryptosporidium felis*, *Cryptosporidium meleagridis*, *Cryptosporidium canis* et *Cryptosporidium cuniculus* (6).

*Giardia intestinalis* est l'un des parasites entériques les plus courants, découvert en 1681 par Antonie van Leeuwenhoek (7). L'Homme se contamine par l'ingestion de kystes présents dans l'eau ou les aliments, ou par transmission interhumaine directe. Ubiquitaire, *Giardia intestinalis* constitue la principale cause de diarrhée parasitaire, avec 280 millions de cas d'infections dans le monde chaque année (8). L'incidence maximale connaît généralement un pic à la fin de l'été et au début de l'automne. Aux États-Unis, une étude multicentrique portant sur les diarrhées pédiatriques non dysentériques communautaires a mis en évidence



que *G. intestinalis* était impliqué dans 15 % des cas (9). Ainsi, on estime que dans les pays développés, la giardiose affecte près de 2% des adultes et 8% des enfants (10). Dans les pays en voie de développement, *G. intestinalis* est l'un des premiers pathogènes entériques à infecter les nourrissons, avec un taux de prévalence pouvant atteindre 30 % chez les enfants de moins de 10 ans (11).

Les microsporidies sont apparentées aux champignons et appartiennent au phylum des microspora regroupant plus de 1500 espèces (12,13). Ce sont des agents intracellulaires unicellulaires obligatoires dont certains sont à l'origine d'infections intestinales opportunistes, et de diarrhées aiguës chez les patients immunocompétents (14–16). Les microsporidies sont libérées dans l'environnement sous forme de spores permettant leur dissémination et leur résistance dans le milieu extérieur. L'espèce la plus fréquemment impliquée dans les infections intestinales chez l'Homme est *Enterocytozoon bieneusi*, responsable de plus de 90% des cas (17,18). *Enterocytozoon bieneusi* a été décrit pour la première fois en 1985 comme un pathogène intestinal opportuniste fréquent chez les patients infectés par le VIH (19). Ses réservoirs habituels regroupent à la fois les animaux sauvages (oiseaux, lapins) mais aussi domestiques (porcs, bovins, chiens et chats) (20). Longtemps considéré comme presque exclusivement responsable d'infections chez l'immunodéprimé, *E. bieneusi* semble en réalité être un agent fréquemment responsable de diarrhées communautaires. Ainsi, des chercheurs Tchèques ont montré que 10% des individus sains présentaient des anticorps dirigés contre *E. bieneusi* (21). En France, entre 2018 et 2021, sur 448 cas d'infections intestinales causées par *E. bieneusi* recensés par le réseau national de surveillance des microsporidioses (piloté par le laboratoire de Parasitologie-Mycologie du CHU de Clermont-Ferrand), environ 25% des cas concernaient des individus immunocompétents (22). Cette part ne cesse de croître d'année en année, notamment du fait de l'augmentation du nombre de laboratoires d'analyses médicales de ville effectuant cette recherche. *Enterocytozoon bieneusi* présente une grande diversité génétique et plus de 600 génotypes ont été identifiés sur la base de la séquence de l'ITS (Internal Transcribed Spacer). L'ITS est une région non codante et hautement polymorphe de l'ADN ribosomique située entre les gènes codant pour la petite et la grande sous-unité de l'acide ribonucléique ribosomique (ARNr). Ces caractéristiques font de cette région un outil intéressant en phylogénie moléculaire des eucaryotes et en barcoding moléculaire des champignons. Pour *E. bieneusi*, une seule base nucléique de différence entre 2 séquences ITS permet de définir 2 génotypes distincts. Les analyses phylogénétiques réalisées à partir de

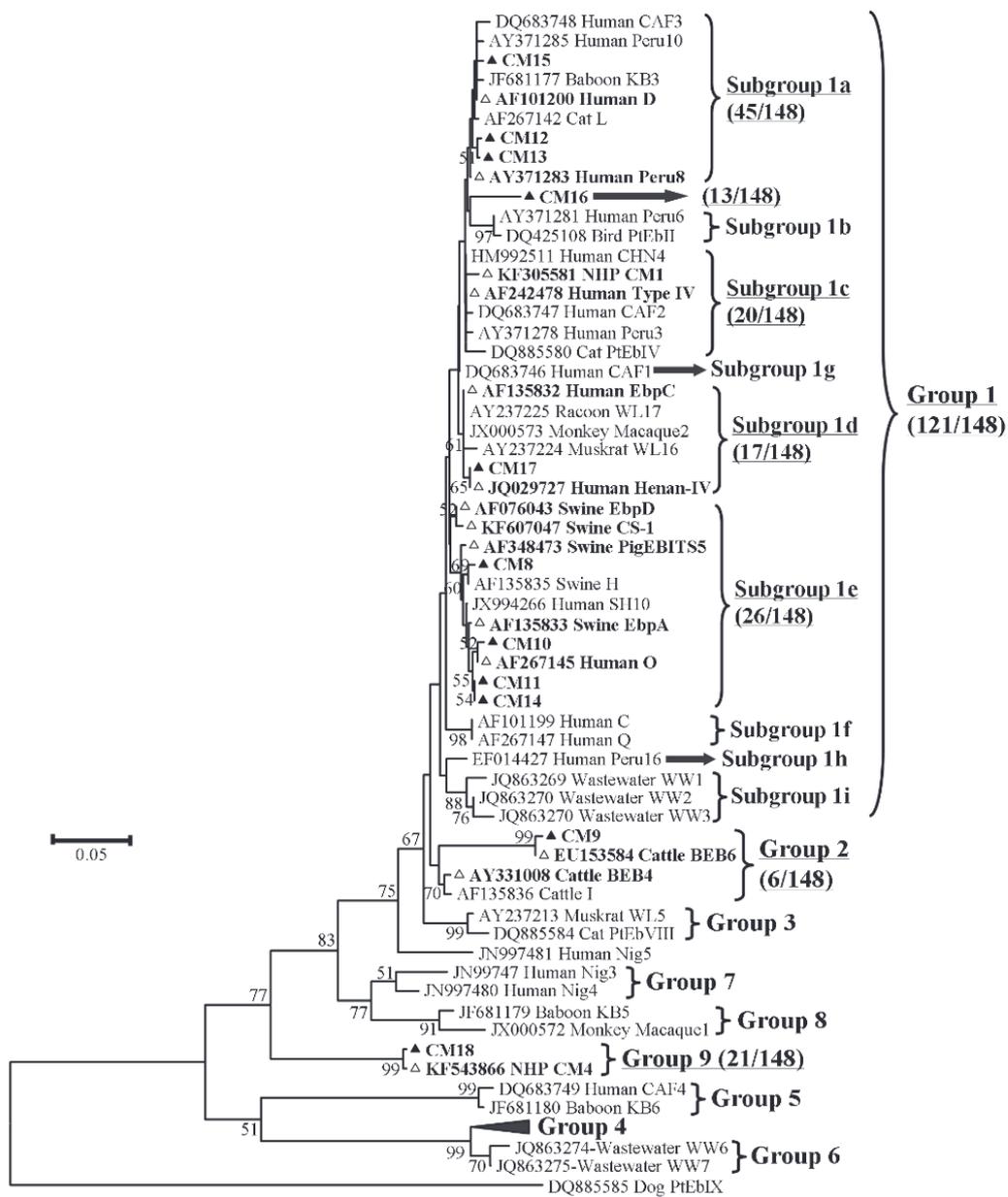


Figure 1: Arbre phylogénétique des génotypes ITS d'*E. bieneusi* selon Karim et al. (2015).

cette séquence ITS montrent qu'il existe au moins 10 groupes génétiques différents dans l'espèce (Figure 1). Le groupe 1 comprend des génotypes zoonotiques, se transmettant donc entre l'Homme et l'animal (23). Les autres groupes comprennent des génotypes dits « adaptés à l'hôte » et semblent donc présenter une plus grande spécificité d'hôte. Chez l'Homme, on rencontrera essentiellement des génotypes du groupe 1, celui-ci étant lui-même composé de différents sous-groupes (1a-1i).

*Encephalitozoon* spp est incriminé dans moins de 10% des cas de microsporidioses intestinales (24). Parmi les espèces d'*Encephalitozoon* retrouvées en France par le réseau de surveillance des microsporidioses entre 2018 et 2021, *E. intestinalis* et *E. hellem* représentent respectivement 2,2% et 1,9% des cas. Par ailleurs, des travaux ont montré que 8% des donneurs de sang allemands et 5% des femmes enceintes françaises possédaient des anticorps dirigés contre *Encephalitozoon* spp (14).

*Cryptosporidium* spp et *Giardia intestinalis* sont notamment connus pour leur potentiel à causer de grandes épidémies (25,26), où l'approvisionnement en eau potable est fréquemment incriminé. Au moins 199 épidémies humaines dues à une transmission hydrique ont été signalées au cours de la période de 2004 à 2010 : *Cryptosporidium* spp était l'agent étiologique dans 60,3 % des cas, et *G. intestinalis* dans 35,2 % (27). L'occurrence de ces agents pathogènes est associée à la consommation d'eau de boisson, mais plus récemment, des épidémies de cryptosporidiose et de giardiase associées aux activités en eaux récréatives ont été signalées. Ainsi, ces agents sont maintenant responsables de la plupart des épidémies parasitaires d'origine hydrique aux États-Unis (28–30). Pour *E. bienersi*, on peut citer au moins 3 épidémies, dont la plus ancienne a touché la ville de Lyon et dont l'origine pourrait être une contamination du réseau d'eau potable (31). Plus récemment, 2 épidémies d'origine alimentaire ont été décrites dans le nord de l'Europe, touchant des individus immunocompétents (32,33).

Les outils de diagnostic moléculaire jouent un rôle important dans l'amélioration de notre compréhension de l'épidémiologie des agents pathogènes et dans l'exploration des épidémies. Avec le développement des techniques de Next Generation Sequencing (NGS), il est désormais possible d'étudier des mélanges de communautés microbiennes. Il s'agit notamment d'approches dites de « metabarcoding » permettant d'étudier les différentes séquences nucléiques d'un marqueur moléculaire présent dans ces populations microbiennes.



Figure 2: Plan de l'agglomération clermontoise autour de la station d'épuration "Les 3 rivières".

Cette méthode est particulièrement utilisée pour étudier le microbiote procaryote (intestinal, cutané, respiratoire...) par séquençage du gène codant pour l'ARNr 16S des bactéries, ou eucaryote par séquençage de divers marqueurs (gène codant l'ARNr18S, ITS, ...). Cette approche peut aussi s'appliquer à l'étude des génotypes d'une même espèce présents dans un échantillon donné. Par exemple, Ogbuigwe *et al.* ont utilisé le gène codant la glutamate deshydrogénase afin d'explorer les sous-types parasitaires lors d'une épidémie causée par *G. intestinalis* (34). A Clermont-Ferrand, l'équipe EPIE (Epidemiology and Physiopathology of Enterovirus Diseases, LMGE, UMR CNRS 6023) a ainsi étudié les différents types d'Enterovirus présents dans les eaux d'entrée de la station d'épuration (STEP) de Clermont-Ferrand (35).

Les eaux usées désignent les eaux souillées provenant des habitations et des installations industrielles ou agricoles. Ces eaux usées et les eaux pluviales sont évacuées et traitées par des réseaux d'assainissement collectif ou individuel. Une STEP reçoit donc les eaux usées domestiques (eaux vannes, eaux ménagères), industrielles et pluviales de la zone qu'elle draine (Figure 2). L'eau arrive chargée de déchets issus des activités humaines quotidiennes et de la rue (feuilles, papiers). Ces déchets sont arrêtés par des grilles, puis stockés dans une benne, avant d'être transportés vers un centre d'enfouissement technique. Ces eaux usées entrent ensuite dans un processus d'épuration avant de pouvoir être rejetées dans l'environnement. Des contrôles journaliers de l'eau épurée sont effectués pour évaluer la quantité de polluants et de micro-organismes rejetés (36).

L'étude des variations temporelles qualitatives et/ou quantitatives des agents pathogènes dans les eaux usées arrivant dans les STEP permet donc d'évaluer leur circulation dans la population et ainsi d'anticiper les potentielles épidémies pour intervenir précocement et proposer des mesures de prévention adaptées. Cette approche a notamment été mise en lumière pour la surveillance d'agents pathogènes viraux comme le SARS-CoV-2, éliminé entre autres dans les selles. Dès les premiers cas de COVID-19, de nombreux pays ont signalé la présence de l'ARN du SARS-CoV-2 dans les eaux usées, ce qui représente des informations sur la circulation virale au cours des différentes phases de cette pandémie. Dans le cas du COVID-19, la détection dans les eaux usées semble être bien corrélée à l'incidence locale (37).

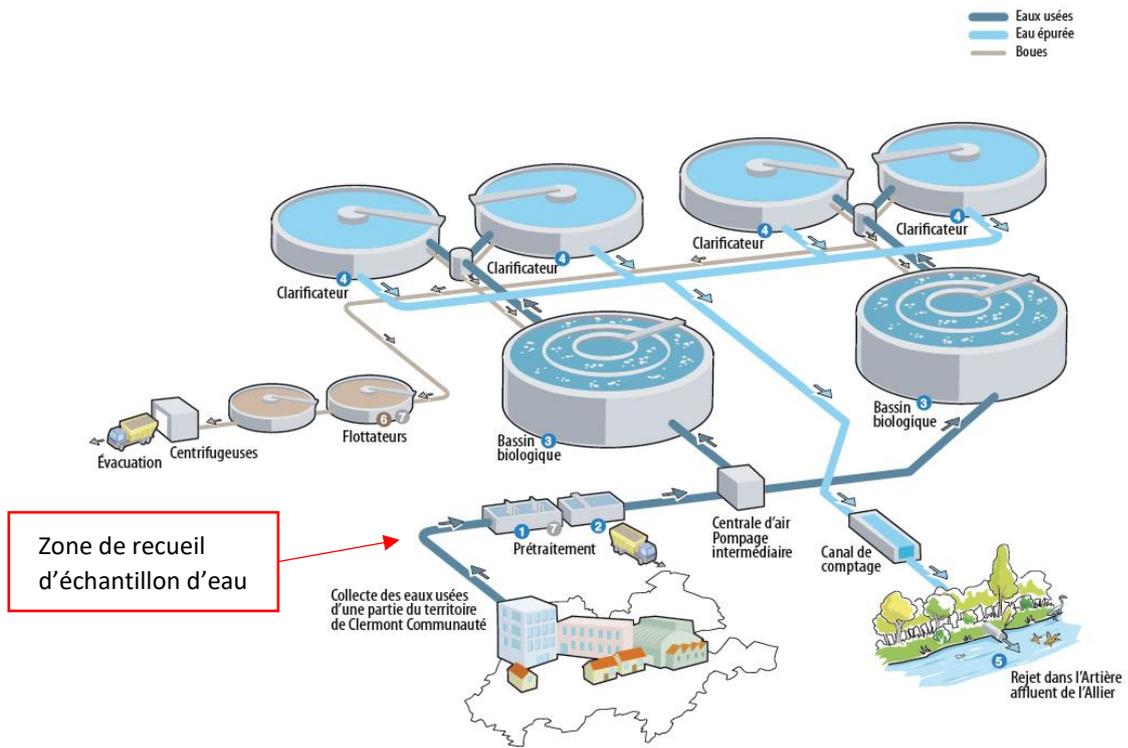


Figure 3: Plan de la station d'épuration "Les 3 rivières" et zone de recueil de l'eau.

Dans ce travail, nous nous sommes intéressés à la présence de *Cryptosporidium* spp, *G. intestinalis*, *E. bienersi* et *Encephalitozoon* spp dans les eaux de la STEP « Les trois rivières » à Clermont-Ferrand (Figures 2 & 3). Les objectifs de ce travail regroupent tout d'abord la détection de ces quatre agents pathogènes par biologie moléculaire dans des échantillons d'eaux usées à l'entrée de la STEP (Figure 3). L'étude est réalisée sur une période d'un an, afin d'évaluer une potentielle variation saisonnière de la circulation de ces agents. Enfin, une analyse de type metabarcoding ciblant l'ITS d'*E. bienersi* a été réalisée afin d'étudier les génotypes présents dans les échantillons d'eaux usées, et donc circulants dans la population clermontoise.



## 2. Matériels et Méthodes

### 2.1 Échantillons d'eaux usées

La station d'épuration de Clermont-Ferrand « Les 3 rivières » a été construite en 2004 et reçoit les eaux usées d'une grande partie de l'agglomération clermontoise, soit l'équivalent de dix-neuf communes et plus de 260 000 habitants (Figure 2). Chaque année, 20 millions de mètres cubes (m<sup>3</sup>) d'eaux y sont traités avec une capacité totale de 425 000 équivalents habitants, soit environ 51 401 m<sup>3</sup> par jour en moyenne. Des échantillons d'eaux usées au point d'entrée (Figure 3) de la station d'épuration de Clermont-Ferrand ont été prélevés par l'équipe EPIE (Epidemiology and Physiopathology of Enterovirus Diseases, Laboratoire Microorganismes : Génome et Environnement, UMR CNRS 6023) une fois par semaine du 11/05/21 au 17/05/22 (n=52). Le volume d'eau recueilli est de 0,5 litres. A la réception de l'échantillon au laboratoire, nous procédons à une inactivation virale du prélèvement par un maintien à une température de 56°C pendant une heure (38). La totalité de l'eau est répartie dans 10 tubes Falcon® de 50 mL. Nous procédons à une concentration des kystes de *G. intestinalis*, oocystes de *Cryptosporidium* spp et spores de microsporidies par centrifugation à 20 000 tours/minutes pendant 20 minutes. Les surnageants sont éliminés tandis que les culots de sédiments sont poolés dans un cryotube, lui-même centrifugé à 10 000g pendant 10 minutes. Le surnageant est de nouveau éliminé et le culot de sédiments est congelé à -80°C jusqu'à extraction d'ADN.

### 2.2 Extraction d'ADN

L'extraction de l'ADN total contenu dans les échantillons est réalisée manuellement à l'aide du kit d'extraction NucleoSpin® Soil (Macherey), selon les recommandations du fabricant. Brièvement, une lyse mécanique de l'échantillon est tout d'abord réalisée en utilisant des tubes contenant des billes de céramique (inclus dans le coffret), dans lesquels sont ajoutés 700 µL de tampon de lyse et 250 mg de sédiments d'eaux usées. Le broyage mécanique est assuré par l'automate TissueLyser® II (QIAGEN) à une fréquence de 30 Hertz pendant 3 minutes. Ensuite, l'utilisation de colonnes d'extraction spécifiques et la composition chimique des tampons de lavage utilisés dans ce kit permettent une élimination des substances humiques et des inhibiteurs de PCR généralement présents dans les sédiments



d'eaux usées. L'ADN est élué sous 30 µL à l'aide d'un tampon d'éluion spécifique. L'ADN extrait est par la suite congelé à -80°C.

### 2.3 Détection de *Giardia intestinalis* par PCR en temps réel

La détection moléculaire de *Giardia intestinalis* est réalisée selon une méthode de PCR en temps réel (39). Un fragment de 62 paires de bases (pb) est amplifié et détecté spécifiquement grâce au couple d'amorces Giardia-80F/Giardia-127R et à la sonde Taqman Giardia-105T (Tableau I).

Tableau I : Amorces et sondes utilisées pour la détection moléculaire de *Giardia intestinalis*

Cible	Amorces et sonde
Gène de la petite sous-unité de l'ARNr de <i>Giardia intestinalis</i>	Sonde Giardia-105T : 5'-FAM-CCC-GCG-GCG-GTC-CCT-GCT-AG-BHQ1-3'
	Amorce Giardia-80F : 5'-GAC-GGC-TCA-GGA-CAA-CGG-TT-3'
	Amorce Giardia-127R : TTG-CCA-GCG-GTG-TCC-G-3'

Le mix de PCR est constitué de 12,5 µl de Master mix TaqMan Universal Master Mix 2X (Applied Biosystem), des amorces (0,5 µM chacune), de la sonde (1 µM), de 5 µl d'extrait ADN et d'eau (QSP 25 µl). Chaque série de PCR est validée grâce à un témoin négatif et un témoin positif obtenu à partir d'un échantillon de selle d'un patient positif pour *G. intestinalis*. La PCR en temps réel est réalisée sur l'automate de PCR Rotor-Gene™ 6000 (Corbett Life Science). L'amplification consiste en une étape de 15 minutes à 95°C suivie de 40 cycles de 15 secondes à 95°C, puis 30 secondes à 60°C, et 30 secondes à 72 °C. Un échantillon est considéré comme positif si la courbe d'amplification de PCR est exponentielle et si la valeur de « Cycle threshold » (Ct) est inférieure à 40 cycles.

### 2.4 Détection génomique de *Cryptosporidium* spp, *Enterocytozoon bieneusi* et *Encephalitozoon* spp par PCR multiplex

Une PCR multiplex a été utilisée pour la détection simultanée des agents responsables de cryptosporidiose et de microsporidioses. La détection de *Cryptosporidium* spp, *Enterocytozoon bieneusi*, et *Encephalitozoon* spp est réalisée à l'aide des amorces et des



sondes énoncées dans le tableau II selon la méthode décrite précédemment par Moniot *et al.* (40). Le mélange réactionnel est composé de 12,5 µL d'Amplidiag Mastermix (Mobidiag), des amorces et sondes (concentrations précisées dans le tableau II), de 5 µL d'extrait ADN et d'eau (QSP 25 µL). La PCR en temps réel est réalisée sur l'automate de PCR Rotor-Gene™ 6000 (Corbett Life Science). L'amplification consiste en une étape initiale de dénaturation de 5 minutes à 95°C, suivie de 40 cycles de dénaturation à 95°C pendant 15 secondes et une étape d'élongation à 60°C pendant 1 minute. Un échantillon est considéré comme positif si la courbe d'amplification de PCR est exponentielle et si la valeur de Ct est inférieure à 40 cycles.

Tableau II : Amorces et sondes utilisées dans la PCR multiplex

Cible	Amorces et sondes	Concentration finale (µmoles/L)
Gène de la petite sous-unité ARNr <i>Cryptosporidium</i> spp	CryptoF: 5'-CATGGATAACCGTGGTAAT-3'	0.2
	CryptoR: 5'-TACCCTACCGTCTAAAGCTG-3'	0.4
	Sonde Crypto : 5'-FAM-CTAGAGCTAATACATGCGAAAAA-MGB-BHQ1-3'	0.1
Gène de la petite sous-unité ARNr <i>Enterocytozoon bieneusi</i>	FEB1 : 5'-CGCTGTAGTTCCTGCAGTAACTATGCC-3'	0.2
	REB1 : 5'-CTTGCGAGCGTACTATCCCCAGAG-3'	0.2
	Sonde EB : 5'-YY-ACGTGGGCGGGAGAAATCTTAGTGTTTCGGG-BHQ1-3'	0.1
Gène de la petite sous-unité ARNr <i>Encephalitozoon</i> spp	FEI1 : 5'-ACAGGTCCGTTATGCCCTGAGA-3'	0.2
	REI1 : 5'-CACGTTCAGAAGCCCKTTACACAGC-3'	0.2
	Sonde EI : 5'-TR-CGGGCKGCACGCGCACTACGATA-BHQ2-3'	0.4

## 2.5 PCR nichée ciblant l'ITS d'*Enterocytozoon bieneusi*

L'amplification de la région ITS d'*E. bieneusi* est réalisée par PCR nichée adaptée de la méthode décrite précédemment par Sulaiman *et al.* (41). La première PCR permet d'obtenir un fragment d'ADN de 410 pb tandis que la deuxième PCR permet d'obtenir un fragment de



392 pb. Les amorces utilisées sont indiquées dans le tableau III, le second couple ayant été modifié pour permettre l'ajout des adaptateurs nécessaires au séquençage NGS.

Tableau III : Amorces utilisées dans la PCR nichée ITS d'*Enterocytozoon bieneusi* avec les adaptateurs de séquençage NGS

PCR	Amorces	Séquences
PCR n°1	AL4037	5'-GATGGTCATAGGGATGAAGAGCTT-3'
	AL4039	5'-ACGGATCCAAGTGATCCTGTATT-3'
PCR n°2 avec <b>adaptateurs</b>  <b>NGS</b>	NGSADAPT AL4038	5'- <b>TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAG</b> AGGGATGAAGAGCTTCGGCTC-3'
	NGSADAPT AL4040	5'- <b>GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAG</b> AGTGATCCTGTATTAGGGATATT-3'

Le kit d'amplification Invitrogen™ Platinum™ Taq DNA polymerase est utilisé pour les deux PCR. Il comprend à la fois le tampon de PCR (10X High Fidelity PCR Buffer, 1X final), le sulfate de Magnésium (MgSO<sub>4</sub>) dont la concentration finale est de 2 mM, et l'enzyme polymérase à haute-fidélité (Platinum®Taq DNA Polymerase High Fidelity, 5U/μL), dont la concentration finale est de 1U/μL. Le volume final de PCR n°1 est de 25 μL, dont 5 μL d'ADN tandis que le volume final de PCR n°2 est de 50 μL, dont 5 μL du produit de la PCR n°1. Les concentrations finales d'amorces sont de 0,4 μM. L'amplification pour la PCR n°1 consiste en une étape de dénaturation de 2 min à 95°C suivie de 35 cycles de 15 secondes à 95°C puis 30 secondes à 56.5°C puis 1 minute à 68°C, et enfin une élongation finale de 10 minutes à 68°C avant un retour à température ambiante. L'amplification pour la PCR n°2 est identique exceptée l'étape d'hybridation où la température est de 53.2 °C. Une migration sur gel d'agarose 1% est effectuée sur chaque produit de PCR n°2 afin de s'assurer de la bonne taille de l'amplicon obtenu.

## 2.6 Séquençage MiSeq

Le séquençage de l'ITS d'*E. bieneusi* est réalisé sur la plateforme de séquençage MiSeq, utilisant une méthode de séquençage par synthèse d'Illumina® (San Diego, Californie). Une première étape consiste en une purification sur billes paramagnétiques AMPure XP (Beckman)



du produit de PCR ITS n°2 selon le protocole de préparation des amplicons ITS pour séquençage sur Illumina® (42). Une PCR d'indexage de 7 cycles est réalisée, suivie d'une deuxième purification sur billes. Un dosage sur Qubit™ (Invitrogen) est effectué. Des dilutions successives sont réalisées puis un dépôt d'échantillon de 600 µL à une concentration de 10 pM est effectué sur la cassette de séquençage Miseq Illumina v2 Nano 2x250bp.

## 2.7 Construction de la base de données des ITS d'*Enterocytozoon bieneusi*

Afin de réaliser l'analyse taxonomique des données de séquençage, nous avons dû constituer une base de référence ITS d'*E. bieneusi*. Toutes les séquences ITS d'*E. bieneusi* présentes dans GenBank (3003 séquences) ont été téléchargées et traitées dans le logiciel Geneious™ Prime (Dotmatics). Après élimination des séquences redondantes et de mauvaise qualité, 997 séquences ITS uniques ont été introduites dans la base. Les règles de nommage des génotypes ont été réalisées selon les recommandations de Santin *et al.*, c'est-à-dire en utilisant le premier nom donné à un génotype (43). Lorsqu'il n'existait pas de nom de génotype défini pour une séquence, le numéro d'accession GenBank a été utilisé pour le nommage.

## 2.8 Analyse des données de NGS

Le traitement initial des données de séquençage a été réalisé dans le logiciel Geneious™ Prime (Dotmatics). Les fichiers FastQ ont été importés dans le logiciel, et une première étape de Trimming a été réalisée avec le plugin BBDuk (<https://jgi.doe.gov/data-and-tools/software-tools/bbtools/bb-tools-user-guide/bbduk-guide/>). Les séquences forward et reverse ont alors été fusionnées. Les séquences chimériques ont été éliminées à l'aide de UCHIME v4.2.40 (44).

L'ensemble des séquences a été mappée sur une séquence ITS d'*E. bieneusi* de référence (génotype A, N° d'accession Genbank : AF101197) afin d'éliminer les régions en 5' et en 3' bordant l'ITS. Les séquences obtenues ont alors été soumises à une étape d'assemblage *de novo* afin de constituer des contigs avec un seuil de 100% d'homologie. Cette étape a ainsi permis d'identifier les OTUs (Operating Taxonomic Units) présentes dans le jeu de données.

L'assignation taxonomique des OTUs a alors été réalisée grâce à l'algorithme Blast (Basic Local Alignment Search Tool, NIH) en local contre la base de référence ITS d'*E. bieneusi* (confère ci-avant) avec une assignation retenue pour une identification à 100% d'homologie.



Les OTUs ne correspondant à aucun génotype ITS connu ont été nommées OTUx (où « x » est égal à un numéro, ex : OTU1, OTU2...). Pour ces OTUs non assignées, une analyse phylogénétique a été réalisée afin d'identifier le groupe phylogénétique basé sur les ITS (Figure 1), ou le sous-groupe pour les OTUs appartenant au groupe 1. Ces analyses ont été réalisées après alignement (Clustal, <https://www.ebi.ac.uk>) avec le logiciel MEGA v7 (<https://www.megasoftware.net/>) à l'aide de 61 séquences de référence permettant de générer un arbre phylogénétique. Chaque analyse a été réalisée avec 1000 répliquats (Maximum Likelihood method, Kimura 2-parameter model). Lors de l'analyse des différents prélèvements, les OTUs dont l'abondance représentait moins de 0,5% d'un échantillon ont été éliminées. Les analyses d'alpha diversité et en composante principale ont été réalisées dans Rstudio (R 4.0) à l'aide des packages « phyloseq » et « DESeq2 ».

Résultats de la PCR en temps réel *Giardia intestinalis* et de la PCR triplex *Cryptosporidium spp*, *E. bienersi*, *Encephalitozoon spp*

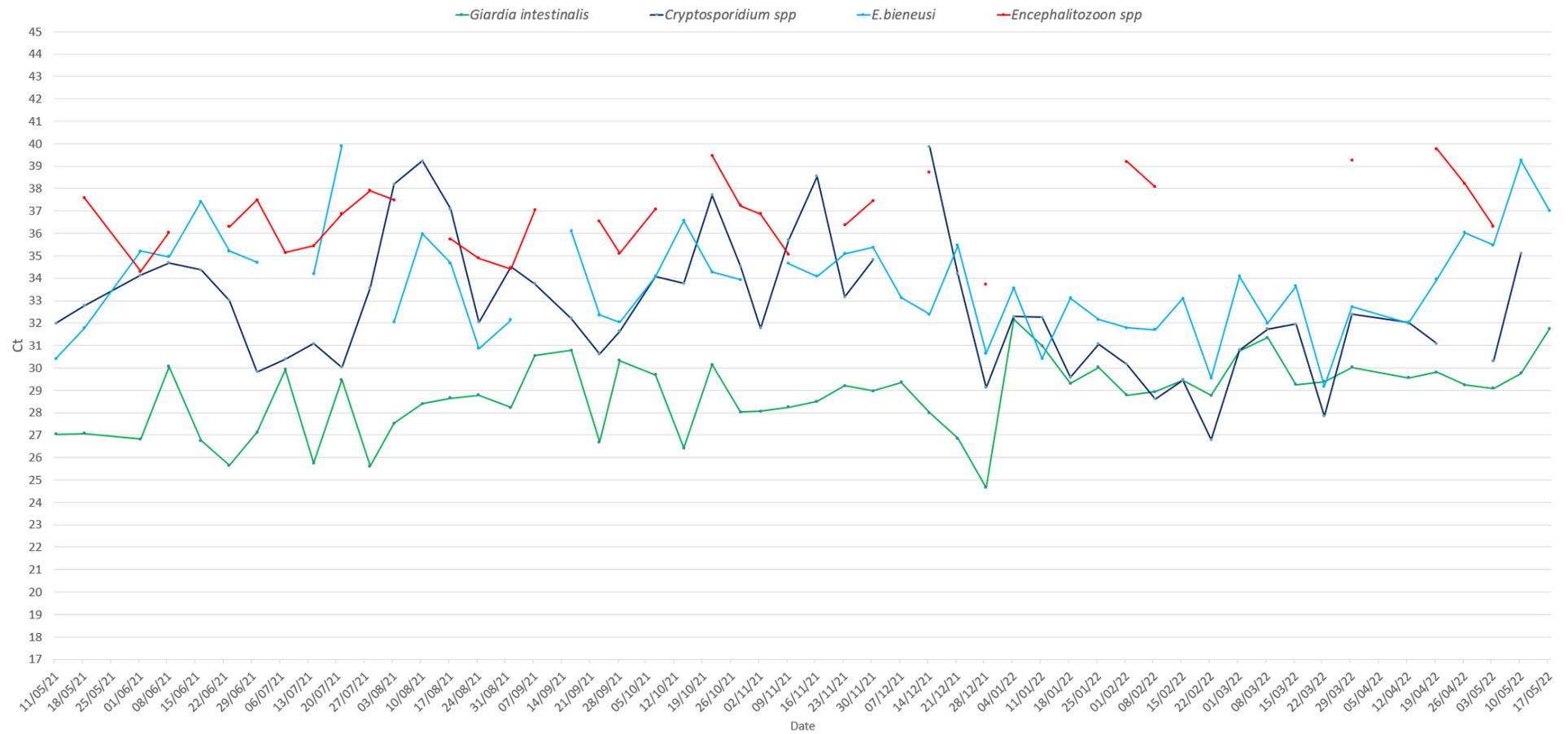


Figure 4: Détection moléculaire de *Giardia intestinalis*, *Cryptosporidium spp*, *Enterocytozoon bienersi*, et *Encephalitozoon spp* dans les eaux usées de Clermont-Ferrand sur une période d'un an.

## 3. Résultats

### 3.1 Recherche par PCR en temps réel des 4 pathogènes

La totalité des échantillons testés sont positifs pour *Giardia intestinalis*, avec des valeurs de Ct variant de 24,66 à 32,15. Aucune variation saisonnière notable n'est observée puisque 100% des échantillons sont positifs pour *Giardia intestinalis* sur la période étudiée (Figure 4).

*Cryptosporidium* spp est détecté dans 49 échantillons sur 52 soit 94,2% des échantillons de l'étude. Les valeurs de Ct varient de 26,79 à 39,87.

*Enterocytozoon bieneusi* est détecté dans 48 échantillons sur 52 soit 92,3% des échantillons de l'étude. Les valeurs de Ct varient de 29,16 à 39,9.

*Encephalitozoon* spp est détecté dans 31 échantillons sur 52 soit 59,6% des échantillons de l'étude. Les valeurs de Ct varient de 33,73 à 39,46 (Figure 4).

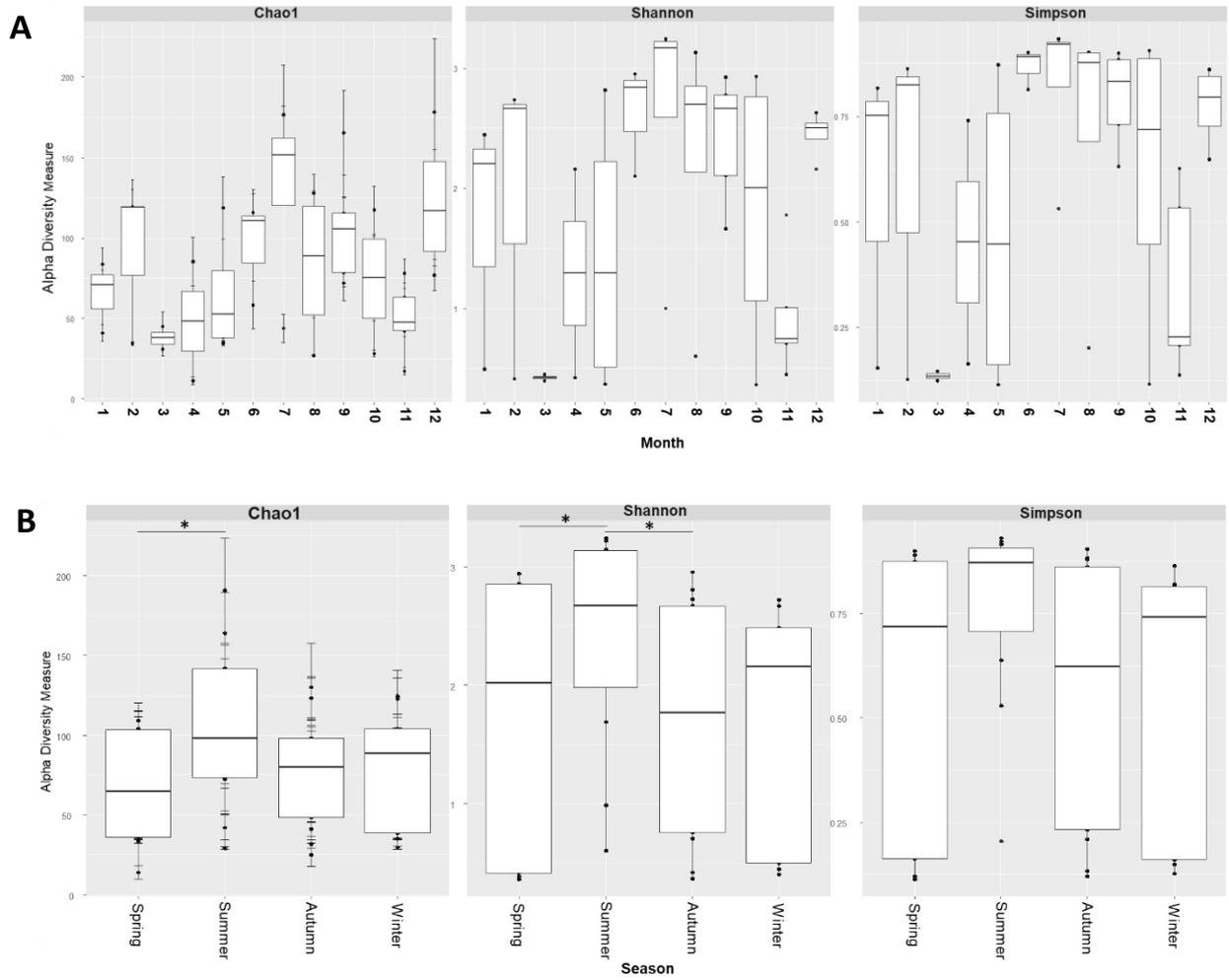


Figure 5: Analyse de l'alpha-diversité des échantillons selon trois indices (Chao1, Shannon et Simpson) dans les sédiments d'eaux usées par mois (5A) et par saison (5B). \* =  $p < 0.05$ , test de Wilcoxon.

## **3.2 Eude des géotypes d'*Enterocytozoon bieneusi* présents dans les eaux de la STEP de Clermont-Ferrand**

### **3.2.1 Résultats de l'amplification par PCR nichée**

Sur la totalité des produits de PCR n°2 des échantillons (n = 52), l'amplification n'a produit un amplicon de taille attendue que pour 43 d'entre eux. Neuf échantillons n'ont donc pas été amplifiés par la PCR nichée, dont 6 échantillons pourtant positifs en PCR en temps réel.

### **3.2.2 Alpha diversité**

L'analyse de l'alpha-diversité est comparée sur chaque mois de l'année d'échantillonnage à l'aide de 3 indices différents de diversité (Shannon, Chao1 et Simpson). On peut voir que les échantillons des mois de juin, juillet, août et septembre semblent présenter une plus grande diversité que les autres mois, ce qui correspond à la période estivale (Figure 5A). Nous avons donc répété l'analyse cette fois-ci à l'échelle de la saison. La diversité de géotypes présents l'été (Figure 5B) est significativement supérieure à celle du printemps (Chao1 et Shannon) et de l'automne (Shannon).

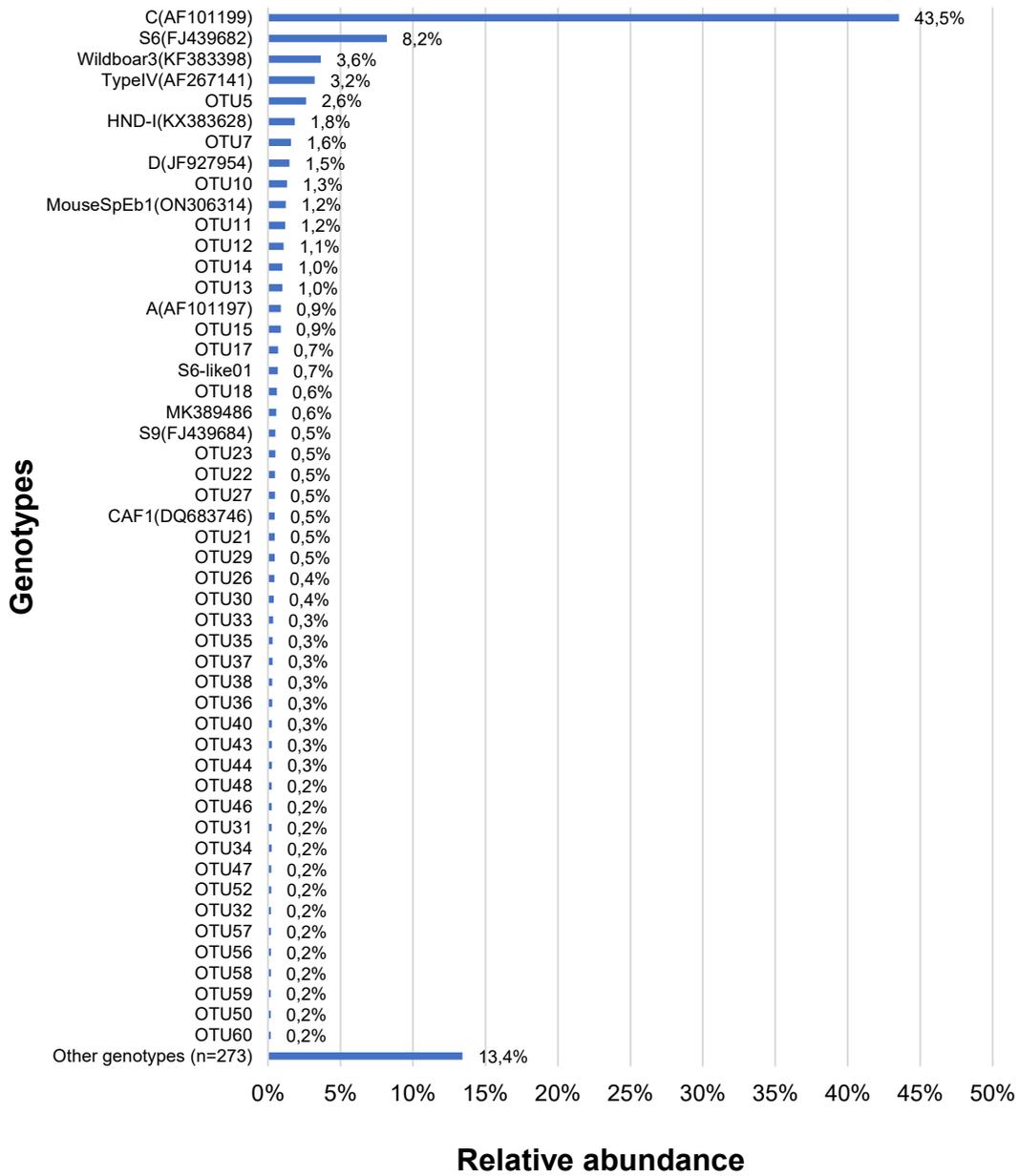


Figure 6: Abondance relative des 50 génotypes les plus fréquents sur l'ensemble des échantillons.

### 3.2.3 Etude des génotypes d'*E. bieneusi* présents dans les eaux de la STEP

L'analyse de l'ensemble du jeu de données a permis d'identifier 323 génotypes différents, dont 298 pour lesquels aucune correspondance n'a pu être trouvée dans notre base de référence. Les 25 génotypes déjà connus et que nous avons identifiés étaient : A, C, CAF1, C-like02, C-like05, C-like11, D, EA2, HLJ-I, HND-I, JLD-2, Type IV, KC509911, KF261964, Korea-WL2, MK389486, MouseSpEb1, NCF6, Peru11, Peru8, S6, S6-like01, S9, Wildboar11 et Wildboar3. Les 298 autres génotypes non connus ont été nommés par leur numéro d'OTU.

Le génotype C est majoritaire sur l'ensemble des génotypes présents dans la totalité des échantillons avec une abondance relative de 43,5% (Figure 6). D'autres génotypes connus de la base de données sont présents parmi les 50 génotypes les plus fréquents, dont des génotypes infectant l'Homme comme S6 (8,2%), Wildboar3 (3,6%), Type IV (3,2%), HND-I (1,8%), D (1,5%), S6-like01 (0,7%), S9 (0,5%) et CAF1 (0,5%).

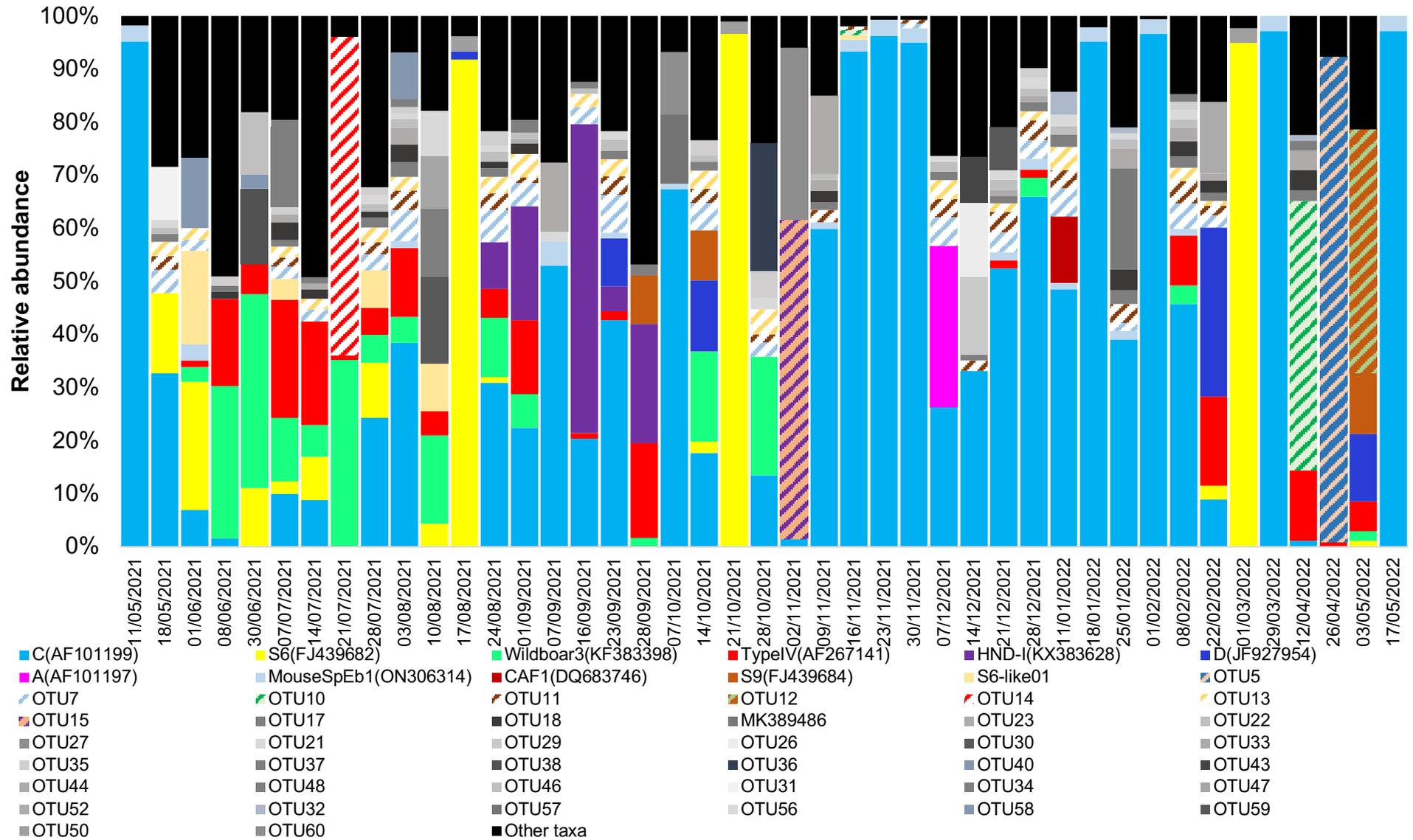


Figure 7: Abondance relative des 50 génotypes les plus fréquents par échantillon.

La figure 7 représente l'abondance relative des 50 génotypes les plus représentés au sein de chaque échantillon. On peut voir que la circulation de génotypes zoonotiques comme Wildboar3, type IV, ou S6 semble plus intense au cours de la période estivale, alors que le génotype C devient majoritaire de novembre à février (Figures 7 & 8A). On remarque par ailleurs que le génotype S6 apparaît de façon majoritaire sur de courtes périodes, puis devient rapidement minoritaire la semaine suivante (Figure 7). Nous avons voulu comparer nos résultats aux données disponibles quant aux cas d'infections humaines recensés par le réseau de surveillance des microsporidioses en France de mai 2021 à mars 2022 (Figure 8B), les données d'avril et mai 2022 ne sont pas disponibles lors de la rédaction de ce manuscrit). On constate que le génotype C est le génotype majoritairement responsable d'infections humaines tout au long de la période, et que sa proportion semble augmenter en hiver, tout comme dans nos données issues de la STEP de Clermont-Ferrand.



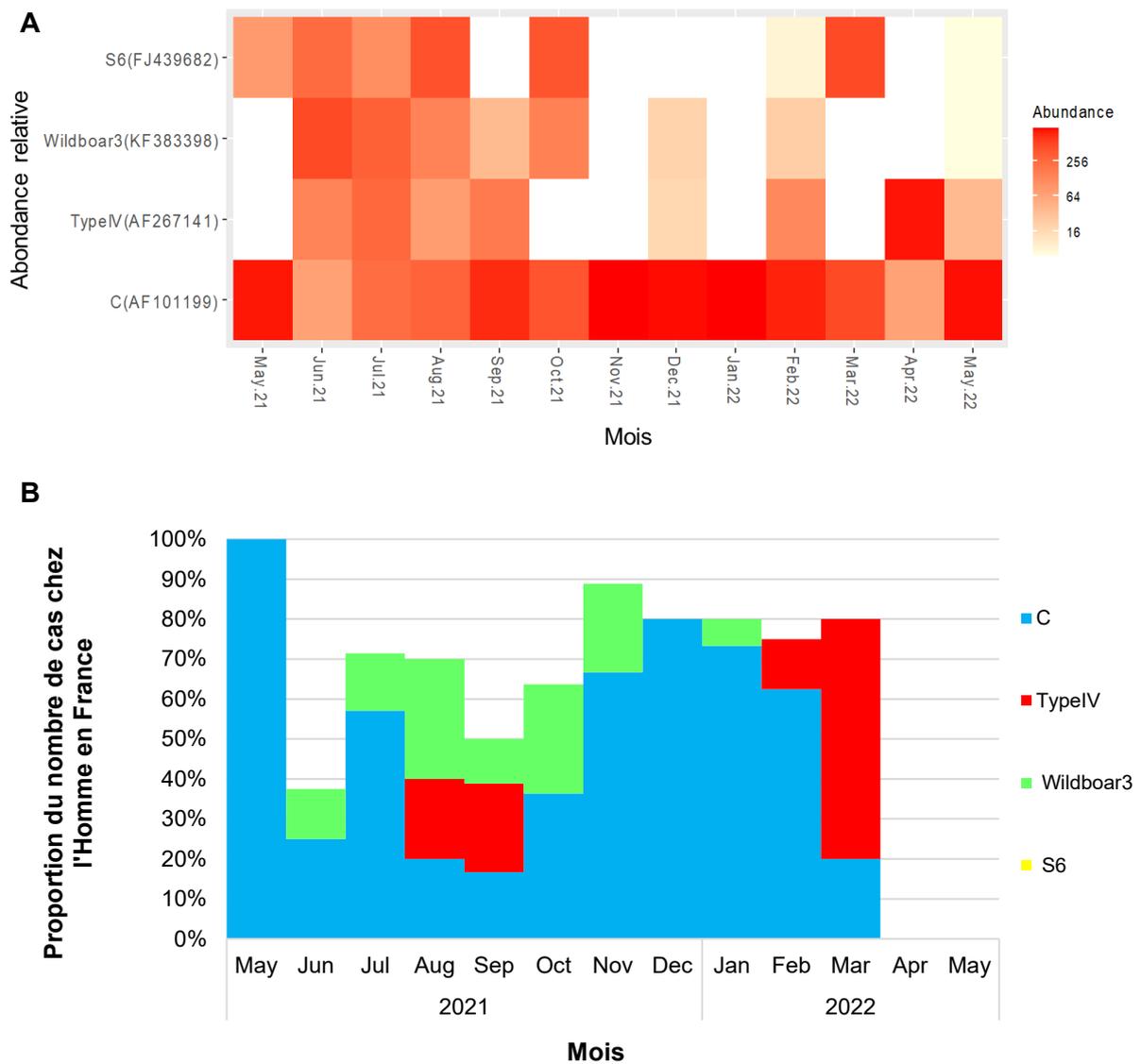


Figure 8 : (A) Abondance relative des géotypes C, Wildboar3, Type IV, et S6 dans les eaux de la STEP de Clermont-Ferrand en fonction des mois. (B) Pourcentage de cas humains en France dont les géotypes C, Wildboar3, Type IV, et S6 sont responsables sur la même période que celle d'échantillonnage des eaux de la STEP de Clermont-Ferrand (données du réseau de surveillance des microsporidioses en France).

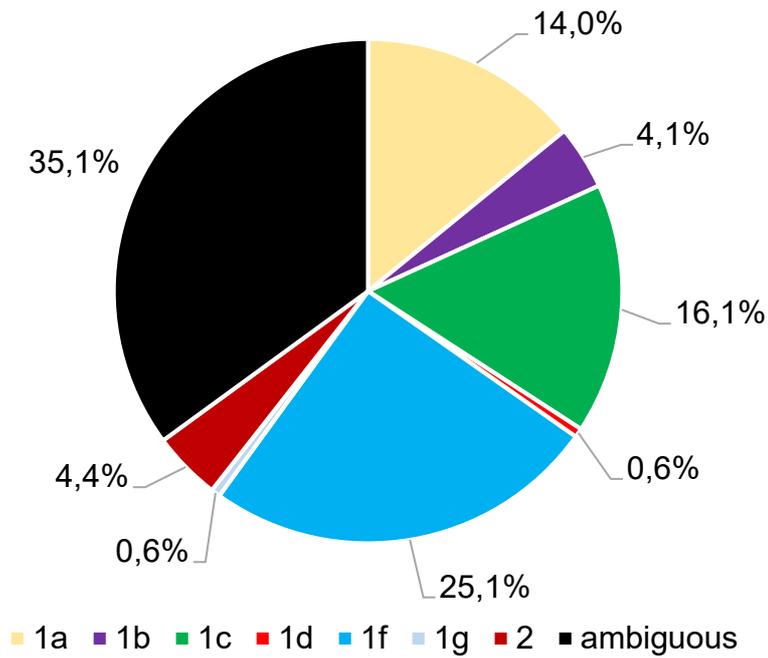


Figure 9: Abondance relative des groupes et sous-groupes phylogénétiques d'*E. bieneusi* sur l'ensemble des échantillons.

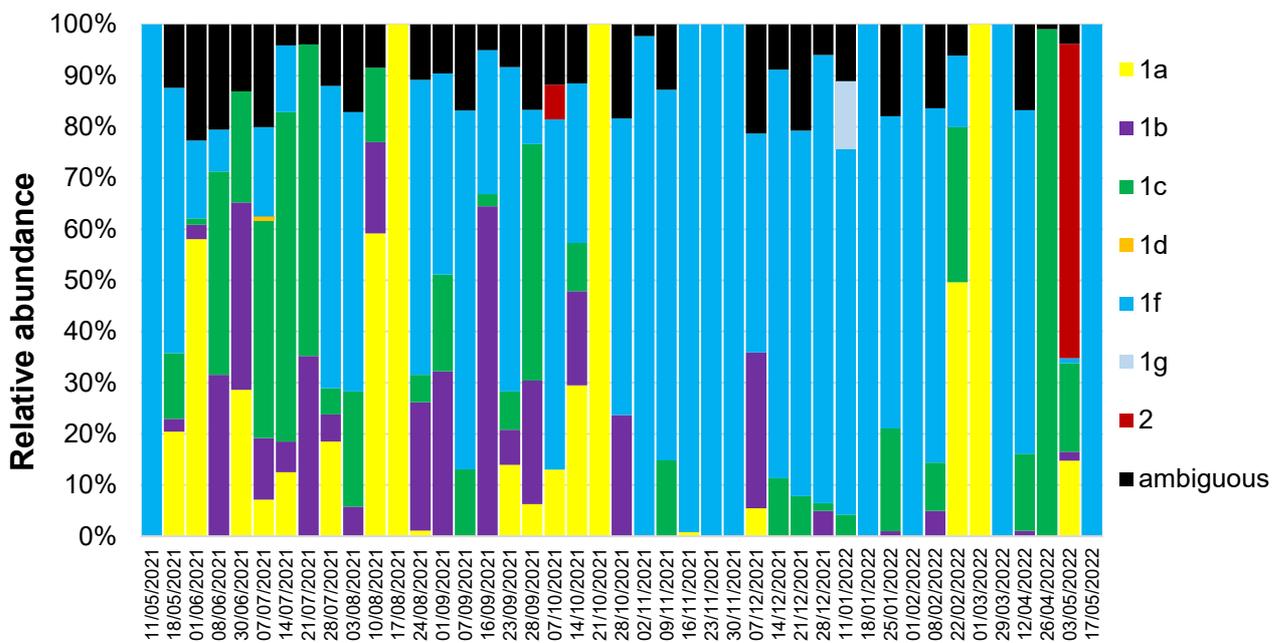


Figure 10: Abondance relative des groupes et sous-groupes phylogénétiques d'*E. bieneusi* par échantillon.

Il est également intéressant de noter le nombre important de génotypes ( $n=38/50$ ) jamais décrits présents dans les 50 génotypes les plus fréquents de notre étude. Du fait du grand nombre d'OTU jamais décrites (298 au total), nous avons réalisé une analyse pour leur attribuer une assignation en groupe phylogénétique sur la base de leur séquence ITS. Ainsi, la majorité des génotypes identifiés dans notre étude appartient au groupe zoonotique 1 : les sous-groupes zoonotiques 1a, 1c, et 1f sont les sous-groupes les plus représentés (Figure 9). Pour de nombreux génotypes, représentant 35,1% des génotypes identifiés, l'analyse phylogénétique réalisée n'a pas permis pour le moment d'identifier clairement le groupe ou sous-groupe d'appartenance. Lorsqu'on observe la circulation de ces différents groupes tout au long de la période étudiée (Figure 10), on constate que le sous-groupe 1f (comprenant le génotype C) est majoritaire toute l'année, et particulièrement lors de la période hivernale. Les sous-groupes 1a (contenant S6 et D), 1b (contenant Wildboar3, A, HND-I), et 1c (contenant Type IV) semblent plus fréquents de la fin du printemps au début de l'automne.

Malgré ces tendances, les analyses en composante principale que nous avons réalisées n'ont pas permis de mettre en évidence de différence significative de composition en génotypes dans nos échantillons selon la saison, la pluviométrie ou les températures moyennes.



## 4. Discussion

L'épidémiologie fondée sur la surveillance des eaux usées présente un intérêt croissant dans le suivi de la circulation d'agents pathogènes dans une population donnée. Nous disposons de peu d'informations en France sur la présence de *Giardia intestinalis*, *Cryptosporidium* spp, *Enterocytozoon bieneusi* et *Encephalitozoon* spp dans les eaux usées. L'analyse des échantillons d'eaux d'entrée de la STEP de Clermont-Ferrand montre une circulation presque constante de ces agents pathogènes tout au long de l'année. En Europe, notamment en Espagne, en Allemagne et en Grèce, de fortes proportions d'échantillons d'eaux usées sont également positifs pour *G. intestinalis* et *Cryptosporidium* spp (45–48). Les résultats obtenus sur la prévalence de *G. intestinalis* et *Cryptosporidium* spp à Clermont-Ferrand concordent également avec d'autres études réalisées en dehors de l'Europe, comme au Canada (49) et aux Etats-Unis où l'analyse phylogénétique réalisée a révélé que les souches de *G. intestinalis* identifiées dans ces effluents appartenaient aux assemblages All et B, potentiellement infectieux pour l'Homme (50). Les données disponibles sur les microsporidies sont plus rares. Une étude irlandaise a montré que l'abondance des microsporidies dans les eaux usées étaient significativement liée à l'augmentation saisonnière de la température de l'eau (51). Parmi les recherches effectuées dans les eaux usées, Ye *et al.* ont montré que 46 sur 108 échantillons d'eaux usées de la station d'épuration de Zhengzhou en Chine étaient positifs pour *E. bieneusi* par technique PCR (52), et que les précipitations le jour précédant l'échantillonnage semblaient avoir joué un rôle sur ces résultats. De même, Ma *et al.* ont analysé les eaux usées de trois stations d'épuration à Shanghai : *E. bieneusi* était détecté dans 70% des échantillons (53). Nous avons également recueilli les données de précipitations et de températures à Clermont-Ferrand lors des périodes d'échantillonnage mais aucune corrélation avec les résultats de NGS obtenus n'a pu être identifiée. Le diagnostic des microsporidies intestinales était historiquement réalisé uniquement à l'hôpital, puisque ces infections étaient considérées comme peu fréquentes et touchant essentiellement l'immunodéprimé. Or, le nombre de cas chez l'immunocompétent a augmenté ces dernières années car de plus en plus de laboratoires médicaux de ville réalisent leurs analyses parasitologiques des selles grâce à des panels de PCR multiplexes incluant les microsporidies. Dans notre étude, les résultats de PCR en temps réel montrent la présence toute l'année d'*E.*



*bieneusi*, et la présence fréquente d'*Encephalitozoon* spp dans les échantillons d'eaux usées, ce qui corrobore l'hypothèse selon laquelle les microsporidioses sont en réalité des causes courantes de gastroentérites communautaires.

La diversité génétique d'*E. bieneusi* fait de cet agent pathogène un bon candidat à l'analyse par metabarcoding des génotypes circulants dans le bassin clermontois *via* l'étude des eaux usées. En 2019, un total de 611 génotypes distincts d'*E. bieneusi* était répertorié dans une méta analyse, dont 90 génotypes enregistrés uniquement chez l'Homme, 413 chez les animaux et 52 à la fois chez les humains et les animaux, ce qui confirme leur potentiel zoonotique (54). Cette méta analyse montre qu'à l'échelle mondiale, les génotypes les plus couramment identifiés chez les animaux et/ou les humains sont les génotypes D (identifié chez 68 espèces hôtes ; dans 38 pays), EbpA (48;12), EbpC (39;13), Type IV (23;21), BEB6 (232 ;7), O (21;4), J (18;9), CM4 (17;1), Peru6 (17;8), I (14;11), Peru8 (13;8), Peru11 (11; 8), WL4 (11;3) et SC02 (11;1).

Peu de données sont disponibles en France sur les génotypes d'*E. bieneusi* circulants chez l'Homme. Desoubreaux *et al.* ont exploré 3 clusters de microsporidioses à l'hôpital de Clermont-Ferrand et ont mis en évidence la présence des génotypes C-like01 et C-like04 (étroitement liés au génotype C), ainsi que la présence des génotype type IV-like01 (étroitement lié au génotype type IV) et S9 (55). Greigert *et al.* ont étudié la prévalence et les génotypes circulants d'*E. bieneusi* chez les patients du CHU de Strasbourg entre 2014 et 2016 (56) et ont identifié 7 patients positifs pour *E. bieneusi* sur 661 patients. Les génotypes A et D étaient retrouvés chez 2 patients positifs pour le VIH et parmi 5 patients greffés d'organes solides, 3 étaient positifs pour le génotype C, et 2 étaient positifs pour le génotype S9. Liguory *et al.* ont analysé des échantillons de selles de 100 patients de l'hôpital Saint-Louis à Paris entre 1994 et 2000 (57) : parmi 88 patients infectés par le VIH, 66 étaient positifs pour le génotype B. Un total de 18 patients (dont 9 étaient positifs pour le VIH) était porteur du génotype C et 12 patients (dont 9 patients positifs pour le VIH) étaient positifs pour le génotype type IV.

En Europe, une importante épidémie d'origine alimentaire causée par *E. bieneusi* en Suède en 2009 impliquait le génotype C (32). Ce même génotype a été responsable d'une autre épidémie au Danemark en 2020 (33). Une étude aux Pays-Bas a analysé 20 échantillons de selles de patients néerlandais positifs pour *E. bieneusi* où le séquençage a permis l'identification de 8 génotypes distincts que sont les génotypes S7, S8, S9, le génotype C qui



est présent dans les 5 échantillons de patients transplantés rénaux, ainsi que les génotypes A, B, D, et Type IV (58).

Lors de notre étude nous avons identifié 323 génotypes différents dans les eaux d'entrée de la STEP de Clermont-Ferrand sur une période d'un an (mai 2021 – mai 2022). Nous avons observé que les échantillons d'eaux usées prélevés lors de la période estivale présentaient une plus grande diversité de génotypes, ce qui peut indiquer l'existence de conditions de contamination particulières à cette saison favorisant l'exposition à des génotypes variés. Plusieurs hypothèses peuvent être envisagées, comme une contamination favorisée par les baignades en eaux douces possiblement contaminées par des fèces animales, associées à des températures élevées propices à la survie des spores d'*E. bienersi* dans l'environnement. La plus grande consommation de certains aliments possiblement contaminés par des fèces animales (comme les crudités) pourrait aussi expliquer ces résultats. En effet, Jedrzejewski *et al.* retrouvaient la présence de spores d'*E. bienersi* ou d'*E. intestinalis* sur 11% des fruits et légumes (fraises, framboises, choux, salades, radis, poireaux, aneth et persil) achetés en grande surface, marché ou épicerie (59). Également, sur plus de 1000 échantillons de légumes analysés par Li *et al.*, *E. bienersi* est retrouvée dans 3,5% de ceux-ci (60) tandis que certains végétaux semblent plus fréquemment positifs, notamment les salades consommées crues (7%). Néanmoins, aucune étude n'a été menée en France pour rechercher la présence de microsporidies dans ces aliments.

Le génotype Type IV d'*E. bienersi*, qui est relativement abondant dans nos échantillons, a été détecté initialement chez le chat, mais est décrit actuellement chez plusieurs hôtes comme l'Homme, le cochon et le singe, et ce dans plusieurs pays dont la France (17). Parmi les génotypes majoritaires retrouvés dans les échantillons de STEP analysés à Clermont-Ferrand, le génotype Wildboar3, initialement décrit chez le sanglier, puis chez d'autres animaux sauvages, est également fortement abondant (61,62). Les données du réseau de surveillance des microsporidioses en France montrent qu'il s'agit du second génotype le plus fréquent chez l'Homme après le génotype C (22). Nos données issues des eaux de la STEP de Clermont-Ferrand sont donc cohérentes avec les données épidémiologiques humaines. Il est important de relever que les génotypes Wildboar3 et Type IV possèdent de nombreux réservoirs animaux. Leur abondance dans les eaux de la STEP de Clermont-Ferrand semble plus élevée durant la période estivale, période au cours de laquelle nous avons montré une hausse significative de la diversité des génotypes présents. Ces différentes observations



pourraient donc venir étayer l'hypothèse d'une contamination plus importante l'été *via* des expositions à des réservoirs environnementaux comme évoqué précédemment. On observe par ailleurs que trois échantillons à différents mois de l'année (août, octobre, et mars) montrent la présence quasi exclusive du génotype humain S6 (58), alors qu'il disparaît très rapidement. Ceci soulève la question de savoir si ces observations pourraient être le reflet de micro-épidémies. Les épisodes de précipitations n'étant pas abondants autour de ces dates, cela ne semble pas être en lien avec la présence marquée de ce génotype.

Bien que le génotype C d'*E. bienersi* appartienne au groupe zoonotique 1, sa présence n'a été jusqu'à présent rapportée que chez l'Homme. Les données issues du réseau national de surveillance des microsporidioses rapportent que 40% des cas de microsporidioses causées par *E. bienersi* en France sont dues au génotype C (22). Ceci est cohérent avec nos données qui montrent que le génotype C est présent de façon constante toute l'année dans les eaux de la STEP, et qu'il est de loin le génotype le plus abondant. Sa présence majoritaire en hiver dans les eaux de la STEP est également cohérente avec son implication dans les cas d'infections humaines recensés par le réseau national qui montre sa plus forte prévalence dans les cas hivernaux d'infections humaines. Certains aliments consommés préférentiellement sur la période hivernale pourraient donc contribuer à une contamination plus importante par ce génotype. Une hypothèse à explorer serait le rôle de la consommation de mollusques filtreurs, telles que les huîtres ou les moules, fortement consommés en cette période. En effet, ces aliments sont connus pour concentrer les agents pathogènes présents dans l'eau, et sont d'ailleurs utilisés comme système d'étude de la qualité des eaux (63). Une transmission interhumaine, potentiellement favorisée par la promiscuité en hiver comme c'est le cas pour d'autres agents de gastro-entérites (64,65), peut également être envisagée. Néanmoins, il n'existe à l'heure actuelle que peu d'arguments soutenant une transmission interhumaine des microsporidioses, contrairement par exemple à *G. intestinalis*.

Plusieurs hypothèses peuvent être évoquées quant à la détection dans nos analyses de nombreux génotypes inconnus. Bien que nous ayons utilisé une polymérase haute-fidélité pour nos amplifications afin d'éviter les erreurs liées à cette étape, on ne peut pas exclure de potentielles erreurs liées au séquençage. Néanmoins, la forte abondance de certaines OTUs non connues dans nos échantillons n'est pas en faveur de cette hypothèse. Cela témoigne donc de la méconnaissance actuelle de l'espèce *E. bienersi*, et notamment des génotypes



circulants chez l'Homme, et donc de l'importance de réaliser un génotypage régulier des souches d'origine humaine.

Plusieurs perspectives s'ouvrent suite à notre travail. Tout d'abord il serait intéressant de disposer d'un moyen de normaliser nos résultats de qPCR afin d'évaluer les variations quantitatives de la présence des pathogènes étudiés dans les eaux de la STEP. Cela permettrait par exemple de pouvoir contribuer à l'identification de potentiels évènements épidémiques, ou de voir si les variations de diversités de génotypes sont associées à une hausse du nombre de cas dans la population. Nous avons pu étudier la diversité des génotypes d'*E. bienewsi* circulants dans la population clermontoise. Comme le montrent nos données, il existe également une présence continue des 3 autres pathogènes auxquels nous nous sommes intéressés. Il serait donc intéressant de déterminer les assemblages de *G. intestinalis* présents dans les eaux usées de Clermont-Ferrand, ce qui peut être fait par amplification du gène de la beta-giardine et séquençage NGS (66). La même approche pourrait permettre de déterminer les espèces et génotypes de *Cryptosporidium* spp (en ciblant le gène codant pour la glycoprotéine 60) (67) et d'*Encephalitozoon* spp (en ciblant les séquences ITS spécifiques)(68).

Nous avons observé des variations saisonnières des génotypes d'*E. bienewsi* présents dans les eaux de la STEP de Clermont-Ferrand. La collecte des échantillons ayant commencé fin 2020 et étant toujours effective, une analyse sur plusieurs années consécutives permettrait de savoir s'il s'agit de variations cycliques et reproductibles, ou si ces variations évoluent d'année en année. Ces observations ne sont que le reflet de la circulation d'*E. bienewsi* dans la population clermontoise, même si nous avons vu que certaines données semblent être corrélées aux données chez l'Homme recueillies à l'échelle nationale par le réseau de surveillance des microsporidioses. Nous avons émis l'hypothèse d'origines alimentaires ou liées aux activités humaines pour expliquer ces variations. Il serait donc possible que des différences épidémiologiques existent entre les populations vivants dans différentes régions en France (bord de mer, montagne, régions d'élevage intensif de bétail, ...). Il serait donc pertinent de pouvoir inclure des données d'autres STEP de villes françaises afin de pouvoir élargir notre vision et notre compréhension des infections causées par *E. bienewsi*.



## 5. Conclusion

L'étude des pathogènes présents dans les eaux usées est un outil important de surveillance épidémiologique en complément des suivis directement réalisés chez l'Homme. Nous nous sommes intéressés à la présence de certains parasites eucaryotes infectant l'Homme dans les eaux usées d'entrée de la station d'épuration des 3 Rivières, drainant l'agglomération de Clermont-Ferrand.

Les résultats de notre étude démontrent la présence continue de *Giardia intestinalis*, *Cryptosporidium* spp, *Enterocytozoon bieneusi*, et *Encephalitozoon* spp dans les eaux usées de Clermont-Ferrand, reflétant leur circulation active dans la population clermontoise. Concernant spécifiquement *E. bieneusi*, nos résultats confortent l'idée qu'il s'agit d'un pathogène fréquemment responsable d'infections communautaires. L'analyse par metabarcoding des génotypes d'*E. bieneusi* présents dans ces eaux laisse à penser que les modes et/ou réservoirs à l'origine des contaminations humaines sont différents selon les saisons. Nous avons identifié pour la première fois un grand nombre de génotypes appartenant à cette espèce et jusqu'alors inconnus. Ceci souligne toute la méconnaissance actuelle autour de l'épidémiologie de cette microsporidie, et l'importance de réaliser un suivi épidémiologique de ces infections chez l'Homme, mais aussi chez l'animal. Des études similaires pourraient également être réalisées dans d'autres villes françaises afin d'élargir nos connaissances quant à l'épidémiologie de ces pathogènes sur notre territoire.

Le doyen de l'UFR de Pharmacie

Christiane FORESTIER

Le président du jury

Valérie LIVRELLI



## Références bibliographiques

1. Aranda-Michel J, Giannella RA. Acute diarrhea: a practical review. *The American Journal of Medicine*. juin 1999;106(6):670- 6.
2. Hunter PR, Thompson RCA. The zoonotic transmission of *Giardia* and *Cryptosporidium*. *International Journal for Parasitology*. oct 2005;35(11- 12):1181- 90.
3. Dong S, Yang Y, Wang Y, Yang D, Yang Y, Shi Y, et al. Prevalence of *Cryptosporidium* Infection in the Global Population: A Systematic Review and Meta-analysis. *Acta Parasit*. déc 2020;65(4):882- 9.
4. European Centre for Disease Prevention and Control. *Cryptosporidiosis*. In: ECDC. Annual epidemiological report for 2018. Stockholm: ECDC; 2021. [Internet]. Disponible sur: <https://www.ecdc.europa.eu/en/publications-data/cryptosporidiosis-annual-epidemiological-report-2018>
5. Ryan UM, Feng Y, Fayer R, Xiao L. Taxonomy and molecular epidemiology of *Cryptosporidium* and *Giardia* – a 50 year perspective (1971–2021). *International Journal for Parasitology*. déc 2021;51(13- 14):1099- 119.
6. Costa D, Razakandrainibe R, Valot S, Vannier M, Sautour M, Basmaciyan L, et al. Epidemiology of *Cryptosporidiosis* in France from 2017 to 2019. *Microorganisms*. 4 sept 2020;8(9):1358.
7. Farthing MJG. GIARDIASIS. *Gastroenterology Clinics of North America*. sept 1996;25(3):493- 515.
8. Ankarklev J, Jerlström-Hultqvist J, Ringqvist E, Troell K, Svärd SG. Behind the smile: cell biology and disease mechanisms of *Giardia* species. *Nat Rev Microbiol*. juin 2010;8(6):413- 22.
9. Caeiro JP, Mathewson JJ, Smith MA, Jiang ZD, Kaplan MA, Dupont HL. Etiology of outpatient pediatric nondysenteric diarrhea: a multicenter study in the United States: *The Pediatric Infectious Disease Journal*. févr 1999;18(2):94- 7.
10. Aubry P. Giardiose et syndrome de malabsorption intestinale [Internet]. Site Médecine tropicale. 2006 [cité 7 juill 2022]. Disponible sur: <http://medecinetropicale.free.fr/cours/giardiose.pdf>
11. Gilman RH, Brown KH, Visvesvara GS, Mondal G, Greenberg B, Sack RB, et al. Epidemiology and serology of *Giardia lamblia* in a developing country: Bangladesh. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*. janv 1985;79(4):469- 73.
12. Franzen C, Müller A. Microsporidiosis: human diseases and diagnosis. *Microbes and Infection*. avr 2001;3(5):389- 400.



13. Li W, Feng Y, Santin M. Host Specificity of *Enterocytozoon bieneusi* and Public Health Implications. *Trends in Parasitology*. juin 2019;35(6):436- 51.
14. van Gool T, Vetter JCM, Weinmayr B, Van Dam A, Derouin F, Dankert J. High Seroprevalence of *Encephalitozoon* Species in Immunocompetent Subjects. *J INFECT DIS*. avr 1997;175(4):1020- 4.
15. Kucerová-Pospíšilová Z, Ditrich O. The serological surveillance of several groups of patients using antigens of *Encephalitozoon hellem* and *E. cuniculi* antibodies to microsporidia in patients. *Folia Parasitol (Praha)*. 1998;45(2):108- 12.
16. Aguila C, Rueda C, Camara C, Fenoy S. Seroprevalence of anti-*Encephalitozoon* antibodies in Spanish immunocompetent subjects. *Journal of Eukaryotic Microbiology*. juin 2001;48:75s- 8s.
17. Santín M, Fayer R. Microsporidiosis: *Enterocytozoon bieneusi* in domesticated and wild animals. *Research in Veterinary Science*. juin 2011;90(3):363- 71.
18. Ramanan P, Pritt BS. Extraintestinal Microsporidiosis. Doern GV, éditeur. *J Clin Microbiol*. nov 2014;52(11):3839- 44.
19. Desportes I, Charpentier YL, Galian A, Bernard F, Cochand-Priollet B, Lavergne A, et al. Occurrence of a New Microsporidan: *Enterocytozoon bieneusi* n. g., n. sp., in the Enterocytes of a Human Patient with AIDS1. *The Journal of Protozoology*. mai 1985;32(2):250- 4.
20. Anane S, Attouchi H. Microsporidiosis: Epidemiology, clinical data and therapy. *Gastroentérologie Clinique et Biologique*. sept 2010;34(8- 9):450- 64.
21. Sak B, Kučerová Z, Kváč M, Květoňová D, Rost M, Secor EW. Seropositivity for *Enterocytozoon bieneusi* , Czech Republic. *Emerg Infect Dis*. févr 2010;16(2):335- 7.
22. Nourrisson C, Moniot M, Bonnin V, Delbac F, Dalle F, Favennec L, Poirier P and the French microsporidiosis network. Human microsporidiosis in France from 2018 to 2021 : Data from the French microsporidiosis network. *Microsporidia Fest online Meeting*; 2022.
23. Karim MR, Dong H, Li T, Yu F, Li D, Zhang L, et al. Predomination and New Genotypes of *Enterocytozoon bieneusi* in Captive Nonhuman Primates in Zoos in China: High Genetic Diversity and Zoonotic Significance. Inacio J, éditeur. *PLoS ONE*. 23 févr 2015;10(2):e0117991.
24. Henriques-Gil N, Haro M, Izquierdo F, Fenoy S, del Águila C. Phylogenetic Approach to the Variability of the Microsporidian *Enterocytozoon bieneusi* and Its Implications for Inter- and Intra-host Transmission. *Appl Environ Microbiol*. 15 mai 2010;76(10):3333- 42.
25. Efstratiou A, Ongerth JE, Karanis P. Waterborne transmission of protozoan parasites: Review of worldwide outbreaks - An update 2011–2016. *Water Research*. mai 2017;114:14- 22.



26. Moreira NA, Bondelind M. Safe drinking water and waterborne outbreaks. *Journal of Water and Health*. 1 févr 2017;15(1):83- 96.
27. Baldursson S, Karanis P. Waterborne transmission of protozoan parasites: Review of worldwide outbreaks – An update 2004–2010. *Water Research*. déc 2011;45(20):6603- 14.
28. Adam EA, Yoder JS, Gould LH, Hlavsa MC, Gargano JW. Giardiasis outbreaks in the United States, 1971–2011. *Epidemiol Infect*. oct 2016;144(13):2790- 801.
29. Hlavsa MC, Roberts VA, Kahler AM, Hilborn ED, Mecher TR, Beach MJ, et al. Outbreaks of Illness Associated with Recreational Water--United States, 2011-2012. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep*. 26 juin 2015;64(24):668- 72.
30. Painter JE, Hlavsa MC, Collier SA, Xiao L, Yoder JS, Centers for Disease Control and Prevention. Cryptosporidiosis surveillance -- United States, 2011-2012. *MMWR Suppl*. 1 mai 2015;64(3):1- 14.
31. Cotte L, Rabodonirina M, Chapuis F, Bailly F, Bissuel F, Raynal C, et al. Waterborne Outbreak of Intestinal Microsporidiosis in Persons with and without Human Immunodeficiency Virus Infection. *J INFECT DIS*. déc 1999;180(6):2003- 8.
32. Decraene V, Lebbad M, Botero-Kleiven S, Gustavsson AM, Löfdahl M. First reported foodborne outbreak associated with microsporidia, Sweden, October 2009. *Epidemiol Infect*. mars 2012;140(3):519- 27.
33. Michlmayr D, Alves de Sousa L, Müller L, Jokelainen P, Ethelberg S, Vestergaard LS, et al. Incubation Period, Spore Shedding Duration, and Symptoms of *Enterocytozoon bieneusi* Genotype C Infection in a Foodborne Outbreak in Denmark, 2020. *Clinical Infectious Diseases*. 31 août 2022;75(3):468- 75.
34. Ogbuigwe P, Biggs PJ, Garcia-Ramirez JC, Knox MA, Pita A, Velathanthiri N, et al. Uncovering the genetic diversity of *Giardia intestinalis* in isolates from outbreaks in New Zealand. *Infect Dis Poverty*. déc 2022;11(1):49.
35. Bisseux M, Debroas D, Mirand A, Archimbaud C, Peigue-Lafeuille H, Bailly JL, et al. Monitoring of enterovirus diversity in wastewater by ultra-deep sequencing: An effective complementary tool for clinical enterovirus surveillance. *Water Research*. févr 2020;169:115246.
36. Clermont Auvergne Métropole. La station d'épuration des 3 rivières : comprendre le traitement des eaux usées [Internet]. Clermont Métropole. [cité 7 juill 2022]. Disponible sur: <https://www.clermontmetropole.eu/preserver-recycler/cycle-de-leau/assainissement/la-station-depuration-des-3-rivieres/>
37. Fernandez-Cassi X, Scheidegger A, Bänziger C, Cariti F, Tuñas Corzon A, Ganesanandamoorthy P, et al. Wastewater monitoring outperforms case numbers as a tool to track COVID-19 incidence dynamics when test positivity rates are high. *Water Research*. juill 2021;200:117252.



38. Espinosa MF, Sancho AN, Mendoza LM, Mota CR, Verbyla ME. Systematic review and meta-analysis of time-temperature pathogen inactivation. *International Journal of Hygiene and Environmental Health*. sept 2020;230:113595.
39. Verweij JJ, Blangé RA, Templeton K, Schinkel J, Brienen EAT, van Rooyen MAA, et al. Simultaneous Detection of *Entamoeba histolytica*, *Giardia lamblia*, and *Cryptosporidium parvum* in Fecal Samples by Using Multiplex Real-Time PCR. *J Clin Microbiol*. mars 2004;42(3):1220- 3.
40. Moniot M, Nourrisson C, Faure C, Delbac F, Favennec L, Dalle F, et al. Assessment of a Multiplex PCR for the Simultaneous Diagnosis of Intestinal Cryptosporidiosis and Microsporidiosis. *The Journal of Molecular Diagnostics*. avr 2021;23(4):417- 23.
41. Sulaiman IM, Fayer R, Lal AA, Trout JM, Schaefer FW, Xiao L. Molecular Characterization of Microsporidia Indicates that Wild Mammals Harbor Host-Adapted *Enterocytozoon* spp. as well as Human-Pathogenic *Enterocytozoon bieneusi*. *Appl Environ Microbiol*. août 2003;69(8):4495- 501.
42. Illumina. Fungal Metagenomic Sequencing Demonstrated Protocol [Internet]. 2019. Disponible sur: [https://emea.support.illumina.com/content/dam/illumina-support/documents/documentation/chemistry\\_documentation/metagenomic/fungal-metagenomic-demonstrated-protocol-1000000064940-01.pdf](https://emea.support.illumina.com/content/dam/illumina-support/documents/documentation/chemistry_documentation/metagenomic/fungal-metagenomic-demonstrated-protocol-1000000064940-01.pdf)
43. Santín M, Fayer R. *Enterocytozoon bieneusi* Genotype Nomenclature Based on the Internal Transcribed Spacer Sequence: A Consensus. *Journal of Eukaryotic Microbiology*. janv 2009;56(1):34- 8.
44. Edgar RC, Haas BJ, Clemente JC, Quince C, Knight R. UCHIME improves sensitivity and speed of chimera detection. *Bioinformatics*. 15 août 2011;27(16):2194- 200.
45. Ramo A, Del Cacho E, Sánchez-Acedo C, Quílez J. Occurrence and genetic diversity of *Cryptosporidium* and *Giardia* in urban wastewater treatment plants in north-eastern Spain. *Science of The Total Environment*. nov 2017;598:628- 38.
46. Castro-Hermida JA, García-Presedo I, González-Warleta M, Mezo M. *Cryptosporidium* and *Giardia* detection in water bodies of Galicia, Spain. *Water Research*. déc 2010;44(20):5887- 96.
47. Ajonina C, Buzie C, Otterpohl R. The Detection of *Giardia* Cysts in a Large-Scale Wastewater Treatment Plant in Hamburg, Germany. *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A*. avr 2013;76(8):509- 14.
48. Spanakos G, Biba A, Mavridou A, Karanis P. Occurrence of *Cryptosporidium* and *Giardia* in recycled waters used for irrigation and first description of *Cryptosporidium parvum* and *C. muris* in Greece. *Parasitol Res*. mai 2015;114(5):1803- 10.
49. Wallis PM, Erlandsen SL, Isaac-Renton JL, Olson ME, Robertson WJ, van Keulen H. Prevalence of *Giardia* cysts and *Cryptosporidium* oocysts and characterization of *Giardia*



- spp. isolated from drinking water in Canada. *Appl Environ Microbiol.* août 1996;62(8):2789- 97.
50. Kitajima M, Haramoto E, Iker BC, Gerba CP. Occurrence of *Cryptosporidium*, *Giardia*, and *Cyclospora* in influent and effluent water at wastewater treatment plants in Arizona. *Science of The Total Environment.* juin 2014;484:129- 36.
  51. Cheng HWA, Lucy FE, Graczyk TK, Broaders MA, Mastitsky SE. Municipal wastewater treatment plants as removal systems and environmental sources of human-virulent microsporidian spores. *Parasitol Res.* sept 2011;109(3):595- 603.
  52. Ye J, Ji Y, Xu J, Ma K, Yang X. Zoonotic *Enterocytozoon bienewisi* in raw wastewater in Zhengzhou, China. *FOLIA PARASIT* [Internet]. 18 janv 2017 [cité 31 juill 2022];64. Disponible sur: <http://folia.paru.cas.cz/doi/10.14411/fp.2017.002.html>
  53. Ma J, Feng Y, Hu Y, Villegas EN, Xiao L. Human infective potential of *Cryptosporidium* spp., *Giardia duodenalis* and *Enterocytozoon bienewisi* in urban wastewater treatment plant effluents. *Journal of Water and Health.* 1 juin 2016;14(3):411- 23.
  54. Zhang Y, Koehler AV, Wang T, Gasser RB. *Enterocytozoon bienewisi* of animals—With an ‘Australian twist’. In: *Advances in Parasitology* [Internet]. Elsevier; 2021 [cité 30 sept 2022]. p. 1- 73. Disponible sur: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0065308X20301081>
  55. Desoubreaux G, Nourrisson C, Moniot M, De Kyvon MA, Bonnin V, De La Bretonnière ME, et al. Genotyping Approach for Potential Common Source of *Enterocytozoon bienewisi* Infection in Hematology Unit. *Emerg Infect Dis.* sept 2019;25(9):1625- 31.
  56. Greigert V, Pfaff AW, Abou-Bacar A, Candolfi E, Brunet J. Intestinal microsporidiosis in Strasbourg from 2014 to 2016: emergence of an *Enterocytozoon bienewisi* genotype of Asian origin. *Emerging Microbes & Infections.* 1 déc 2018;7(1):1- 7.
  57. Liguory O, Sarfati C, Derouin F, Molina JM. Evidence of Different *Enterocytozoon bienewisi* Genotypes in Patients with and without Human Immunodeficiency Virus Infection. *J Clin Microbiol.* juill 2001;39(7):2672- 4.
  58. Ten Hove RJ, Van Lieshout L, Beadsworth MJB, Perez MA, Spee K, Claas ECJ, et al. Characterization of Genotypes of *Enterocytozoon bienewisi* in Immunosuppressed and Immunocompetent Patient Groups. *Journal of Eukaryotic Microbiology.* juill 2009;56(4):388- 93.
  59. Jedrzejewski S, Graczyk TK, Slodkiewicz-Kowalska A, Tamang L, Majewska AC. Quantitative Assessment of Contamination of Fresh Food Produce of Various Retail Types by Human-Virulent Microsporidian Spores. *Appl Environ Microbiol.* 15 juin 2007;73(12):4071- 3.
  60. Li J, Shi K, Sun F, Li T, Wang R, Zhang S, et al. Identification of human pathogenic *Enterocytozoon bienewisi*, *Cyclospora cayentanensis*, and *Cryptosporidium parvum* on the surfaces of vegetables and fruits in Henan, China. *International Journal of Food Microbiology.* oct 2019;307:108292.



61. Santín M, Calero-Bernal R, Carmena D, Mateo M, Balseiro A, Barral M, et al. Molecular Characterization of *Enterocytozoon bieneusi* in Wild Carnivores in Spain. *J Eukaryot Microbiol.* juill 2018;65(4):468- 74.
62. Zhang Y, Xin L, Zhao A, Xu C, Wang T, Jing B, et al. Molecular detection and genotypes of *Enterocytozoon bieneusi* in farmed mink (*Neovison vison*), blue foxes (*Alopex lagopus*), and raccoon dogs (*Nyctereutes procyonoides*) in Xinjiang, China. *International Journal for Parasitology: Parasites and Wildlife.* avr 2021;14:211- 5.
63. Lucy FE, Graczyk TK, Tamang L, Miraflor A, Minchin D. Biomonitoring of surface and coastal water for *Cryptosporidium*, *Giardia*, and human-virulent microsporidia using molluscan shellfish. *Parasitol Res.* nov 2008;103(6):1369- 75.
64. Ahmed SM, Hall AJ, Robinson AE, Verhoef L, Premkumar P, Parashar UD, et al. Global prevalence of norovirus in cases of gastroenteritis: a systematic review and meta-analysis. *The Lancet Infectious Diseases.* août 2014;14(8):725- 30.
65. van Gaalen RD, van de Kasstele J, Hahné SJM, Bruijning-Verhagen P, Wallinga J. Determinants of Rotavirus Transmission: A Lag Nonlinear Time Series Analysis. *Epidemiology.* juill 2017;28(4):503- 13.
66. Maloney JG, Molokin A, Santin M. Assessment of next generation amplicon sequencing of the beta-giardin gene for the detection of *Giardia duodenalis* assemblages and mixed infections. *Food and Waterborne Parasitology.* déc 2020;21:e00098.
67. Mphephu MG, Ekwanzala MD, Momba MNB. *Cryptosporidium* species and subtypes in river water and riverbed sediment using next-generation sequencing. *International Journal for Parasitology.* avr 2021;51(5):339- 51.
68. Mohammad Rahimi H, Mirjalali H, Zali MR. Molecular epidemiology and genotype/subtype distribution of *Blastocystis* sp., *Enterocytozoon bieneusi*, and *Encephalitozoon* spp. in livestock: concern for emerging zoonotic infections. *Sci Rep.* déc 2021;11(1):17467.

**Résumé:** L'épidémiologie fondée sur la surveillance des eaux usées est un outil de surveillance de la circulation de pathogènes. Parmi les parasitoses intestinales endémiques les plus courantes, on retrouve la giardiase, la cryptosporidiose et les microsporidioses. L'étude avait pour objectif la mise en évidence de ces pathogènes par biologie moléculaire dans les eaux usées d'entrée de la station d'épuration de Clermont-Ferrand, sur une période d'un an. *G. intestinalis* était détecté dans 100% des échantillons, *Cryptosporidium* spp dans 94,2 %, *E. bienewsi* dans 92,3 %, et *Encephalitozoon* spp dans 59.6 % des échantillons. Une circulation annuelle et constante de ces agents pathogènes est donc mise en évidence. Une étude par metabarcoding a été réalisée pour *E. bienewsi* afin de déterminer les génotypes présents dans les échantillons. Nous avons observé une plus grande diversité de génotypes en période estivale. Le génotype « C » est celui retrouvé majoritairement, notamment en hiver, alors que d'autres génotypes semblent plus fréquents en été, posant la question de modes ou d'origines différentes de contaminations. Nous avons identifié de nombreux génotypes inconnus jusqu'alors, démontrant la méconnaissance actuelle autour de l'épidémiologie de cette microsporidie.

**Mots-clés :** eaux usées, *Giardia intestinalis*, *Cryptosporidium* spp, *Enterocytozoon bienewsi*, *Encephalitozoon* spp, metabarcoding, génotype, NGS