

# BIOCOM

## Biological Control and On-site Monitoring

Erich Shaw<sup>1</sup>, Ilan Juran<sup>1</sup>, Jean Pierre Duguet<sup>2</sup> Jean Claude Robin<sup>3</sup>

<sup>1</sup>W-SMART Association Loi 1901 9 Rue Victor Schoelcher 75 014 Paris

<sup>2</sup>Eau de Paris (SAGEP) 9 Rue Victor Schoelcher 75 014 Paris

<sup>3</sup> OPTEX Consultant/Lheritier SAS

[erichs@012.net.il](mailto:erichs@012.net.il)

[ijuran@poly.edu](mailto:ijuran@poly.edu)

[Duguet@eaudeparis.fr](mailto:Duguet@eaudeparis.fr)

[Jc.robin@wanadoo.fr](mailto:Jc.robin@wanadoo.fr)

**Résumé** – Le projet BIO-COM a pour objectif de développer à la fois un instrument, basé sur la détection in-situ précoce de bactéries dans l'eau ainsi que les concepts d'implantation, de gestion et de décision afin de palier aux conséquences d'attaques bio terroristes consistant à introduire des agents pathogènes dans les réseaux de distribution d'eau potable.

**Abstract** – The BIO-Com project objective is to develop an instrument, based on in-situ early detection of bacterias in water as well as risk assessment methods to front the consequences of bio terrorist attacks coming from the introduction, in the drinking water networks of pathogenic agents.

### 1.1 But du projet

Le but du projet BIO-COM est de développer à la fois un instrument, basé sur la détection in-situ ainsi que les concepts d'implantation, de gestion et de décision afin de palier aux conséquences d'attaques bio terroristes consistant à introduire des agents pathogènes dans les réseaux de distribution d'eau potable.

### 1.2 Rappel:

Le programme BIO-COM en est au stade de démarrage

### 1.3 Contexte:

L'attaque bio-terroriste par introduction d'agents pathogènes (bactéries notamment – anthrax, E.coli O157, protozoaire etc...) dans l'eau potable délivrée, à travers les réseaux de distribution d'eau à la population, présente un danger bien supérieur aux attaques que nous connaissons aujourd'hui. La difficulté est que les organismes gérant les réseaux de distribution d'eau ne possèdent pas encore de moyens adaptés pour assurer une détection précoce de présence de tels agents contaminants dans un laps de temps compatible avec les temps de réaction requis pour arrêter la distribution d'eau et épargner ainsi de nombreuses vies humaines.

### 1.4 Motivation:

Réduire considérablement les risques, pour la population, liés à l'utilisation de l'eau potable comme vecteur d'actions terroristes. Ces moyens contribueraient également à améliorer la qualité de l'eau grâce à la détection précoce de la présence de bactéries moins toxiques mais malgré tout dommageables pour la santé.

### 1.5 Enjeux, Objectifs et Verrous scientifiques

#### 1.5.1 Enjeux:

Mettre à disposition des organismes chargés de la distribution d'eau, les moyens nécessaires pour pouvoir détecter la présence dans l'eau, d'agents pathogènes de façon à leur permettre d'arrêter sans délai la distribution de l'eau à la population. Ces moyens devraient permettre d'intégrer le développement des systèmes innovants de contrôle, mesures et détection sur sites, en temps réel, des pathogènes biologiques et la modélisation des algorithmes d'aide à la décision pour l'évaluation et la gestion des risques de santé publique.

#### 1.5.2 Objectifs:

Développer et évaluer des systèmes intégrés de contrôle, évaluation en temps réel, et gestion des risques biologiques permettant aux gestionnaires des réseaux d'eaux potables d'améliorer considérablement la capacité de répondre aux

urgences et d'assurer la qualité requise et la sécurité d'eaux pour la santé publique.

Ce système comportera deux éléments fondamentaux:

**Un prototype de système innovant de détection sur site, des pathogènes biologiques, utilisant la technique de « single photon wide area scanning »,**

Ce prototype permettrait:

- Des mesures en temps réel, réduisant considérablement la durée d'essai (résultats pour détection initiale après 30 minutes et vérification après 3 heures)
- Une sensibilité élevée, initialement 100 micro-organismes spécifiés par 100 ml, avec l'objectif d'atteindre un niveau de sensibilité de 1 micro-organisme spécifié par 100 ml.
- Fiabilité, équivalente à celle des méthodes utilisant les essais en laboratoire,
- Portabilité, avec l'objectif de pouvoir le mettre en ligne sur un réseau de distribution d'eau
- Compétitivité économique du système, considérablement moins coûteux que les techniques existantes
- Facile à opérer, ne nécessitant pas des techniciens qualifiées

**Un système d'aide à la décision pour l'évaluation et la gestion des risques biologiques** permettant de:

- Intégrer la collecte, le traitement et l'analyse des données obtenues des sources différentes, notamment les mesures de contrôle et d'évaluation de qualité, hydrauliques, informations de consommateurs, des acteurs principaux, et des banques des données des pathogènes identifiées.
- Déterminer les niveaux d'hasards acceptables et les critères d'évaluation de la vulnérabilité des infrastructures et du réseau d'eaux potables
- Etablir des zones de niveaux des risques différents pour des scénarios de référence et les limites de propagation de la contamination biologique
- Assister les gestionnaires dans l'analyse et le choix des stratégies de réponse qui peuvent inclure des alternatives différentes, notamment arrêt de la distribution, arrêt de l'approvisionnement en eau, désinfections, épuration, contrôle d'efficacité des mesures entreprises, etc...
- Assurer la coordination et l'interaction entre tous les agences concernées et la communication avec les acteurs principaux.

**1.6 Verrous scientifiques:**

Le système de détection comprend 2 parties principales:

- Le bio senseur dont le rôle est de donner au système de détection un échantillon à analyser.
- Le détecteur optique qui a pour rôle d'analyser l'eau pour déterminer la présence ou non d'agents pathogènes.

Les verrous scientifiques actuels sont les suivants:

**"bio senseur"**: Le bio senseur reste à développer dans sa grande majorité car ce qui a été fait dans la phase de vérification de la faisabilité est très éloigné du besoin en détection. Ceci implique notamment:

- 1) La recherche des marqueurs fluorescents à associer à chaque type d'agent pathogène
- 2) La recherche du processus de croissance de chaque type d'agent pathogène
- 3) Les travaux de limitation des artefacts lors de la filtration de l'échantillon d'eau

**"détecteur optique"** : La faisabilité du procédé utilisé a déjà été démontrée à partir d'un banc expérimental sur des bactéries. Les verrous restants afin d'atteindre les performances requises pour remplir l'ensemble des objectifs sont:

- 1) Accroissement de la sensibilité, du rendement quantique et du rapport S/B du dispositif de détection pour pouvoir faire des mesures de fluorescence après 1 et 2 heures
- 2) Augmentation du champ de vision
- 3) Elimination des artefacts de la préparation
- 4) Fonctionnement en double marquage

**Le système d'aide à la décision** pour l'évaluation et la gestion des risques biologiques présente les défis scientifiques liés à la définition du niveau acceptable des risques, à la conception d'un algorithme intégré pour l'analyse des données et au choix des stratégies de réponse.

**1.7 Méthodologie mise en œuvre**

Le plan d'actions proposé par le consortium BIOCOM, réunissant des experts de l'industrie et des scientifiques dans les domaines de l'environnement, de l'eau, de sa distribution, de la biologie, de l'optique, et de l'évaluation des risques, pour aboutir aux objectifs de cette recherche est résumé ci-dessous:

- 1) Détermination des critères techniques pour le développement du prototype du système de contrôle et de détection des pathogènes identifiés et pour la conception du système d'aide à la décision
- 2) Développement et évaluation des performances du détecteur optique, utilisant l'approche de «wide field single photon scanning» pour la détection des pathogènes isolés spécifiés
- 3) Développement et évaluation des performances du bio senseur, utilisant des méthodologies courantes, pour maximiser la capacité de détection de l'ensemble du dispositif.
- 4) Conception et développement du système d'aide à la décision pour l'évaluation et la gestion des risques biologiques,
- 5) Evaluation et vérification de la performance du prototype du système de détection à partir essais pilotes sur des sites caractérisés dans les réseaux d'eaux vis-à-vis des critères techniques identifiés par les experts et, en particulier, la capacité d'éliminer les alarmes erronées sans compromettre la sensibilité du système

- 6) Evaluation de la performance du système d'aide à la décision à partir des essais pilotes sur des sites caractérisés dans les réseaux d'eaux en utilisant des traceurs chimiques identifiées et acceptables, notamment chlorines ou fluorites, pour calibrage et vérification des algorithmes développés
- 7) Communication et évaluation des résultats par les gestionnaires des réseaux d'eaux potables en France et des recommandations concrètes pour les applications industrielles

### 1.8 Retombées scientifiques et industrielles

Le développement des systèmes proposés devrait avoir des impacts considérables sur:

- Les techniques et stratégies de gestion en temps réel de la qualité et de la sécurité d'eaux potables permettant un contrôle efficace pour la mise en œuvre des réglementations, voire la normalisation, des mesures de sécurité
- Les applications conventionnelles des contrôle de qualité notamment pour les eaux potables, les eaux usées, et les eaux de baignade
- Les techniques et stratégies de gestion en temps réel de la qualité des produits et des risques biologiques dans différents secteurs, breuvages, alimentations, services médicaux, etc. donnant lieu aux développements de nouvelles technologies de contrôle et à des nouveaux produits
- Les applications scientifiques des nanotechnologies pour les caractérisations microbiologiques des pathogènes isolés en utilisant des marqueurs bio-optiques

## 2) Description technique détaillée:

Le Bio terrorisme, en introduisant des agents pathogènes (bactéries, protozoaires etc..) dans les réseaux de distribution de l'eau potable, à la population, présente un niveau de risqué très élevé, pouvant avoir des conséquences allant bien au delà des catastrophes que nous avons connu lors des attentats su 11 Septembre 2001. La difficulté majeure pour prévenir les conséquences d'une attaque bio terroriste des réseaux d'eau est que les organismes distribuant l'eau ne possèdent pas actuellement d'outils capables d'assurer à la fois une détection précoce et rapide de la présence d'agents pathogènes ainsi que les outils d'aide à la décision. Grâce à la l'existence d'un moyen de détection précoce, en ligne et fiable il deviendrait possible de faire face aux conséquences d'une telle action terroriste. Le but du projet BIO-COM est de rendre de tels outils disponibles.

### 2.1 But du projet:

Le but principal du programme BIOCUM (**B**iological **C**ontrol and **O**n-site **M**onitoring) est de développer et évaluer un dispositif intégré de contrôle biologique et des outils d'aide à la décision qui permettraient aux organismes de distribution de l'eau et aux organismes de régulation de décider des meilleures actions à mener, lesquelles pourraient aller jusqu'à l'arrêt de la distribution d'eau, afin

de préserver la santé de la population. L'utilisation des données du dispositif de contrôle biologique couplée à d'autres sources d'informations connectées à un dispositif intelligent d'évaluation des risques et à une plateforme de décision devra fournir une indication fiable de présence d'agents contaminants, de niveau de risque pour la santé publique et de proposition d'action appropriée. Ce concept, qui pourra être adapté aux besoins spécifiques d'utilisateurs grâce à sa modularité, sera un dispositif unique et sans équivalent à ce jour.

L'eau potable peut être contaminée par des agents chimiques et/ou biologiques tels que des bactéries, protozoaires etc. par injection dans les réseaux de distribution d'eau. Les organismes de gestion de l'eau rencontrent 3 obstacles face à de tels événements:

1. Les réseaux d'eau sont très dispersés et il est pratiquement impossible de protéger, physiquement la totalité du réseau.
2. La plupart des agents contaminants ne peuvent pas être détectés en temps réel.
3. Même si l'on détecte la présence d'un agent contaminant dans le réseau de distribution d'eau, un fort niveau d'incertitude demeurerait, compte tenu à la fois de l'absence d'information sur la localisation de la contamination et donc d'une absence d'aide à la décision qui permettrait d'atténuer les conséquences de cette contamination.

L'objectif de ce projet consiste à développer un ensemble complet qui sera en mesure de détecter, fournir une information rapide de l'existence d'une contamination de l'eau par des agents pathogènes et apporter les éléments décisionnels afin de permettre aux organismes de distribution et de gestion de l'eau d'entreprendre une action appropriée.

Le concept de la sécurité dans la qualité de l'eau distribuée est basé sur la mise en œuvre d'une protection à plusieurs niveaux. Si les niveaux supérieurs sont activés, les réseaux inférieurs sont opérationnels pour apporter une protection supplémentaire.

Le réseau supérieur, qui est lié à l'évaluation des menaces, est basé sur le renseignement afin de consolider le concept de sécurisation de la qualité de l'eau.

Le second niveau est la protection physique du réseau de distribution actuel par la mise en œuvre d'installations dédiées incluant barrières de sécurité, caméras, vigiles etc.

Le troisième niveau est basé sur la détection, l'évaluation et la gestion des risques. Il complète les moyens de sécurisation physique du réseau mis en œuvre dans le cadre du second niveau.

Le quatrième niveau correspond à une action immédiate et ciblée dès qu'une suspicion de risque de contamination est perçue.

Le cinquième niveau de protection est basé sur la vérification du bien fondé, de l'adéquation et du résultat de l'action immédiatement entreprise au niveau 4

Les sixième et septième niveaux correspondent à la neutralisation des substances et la remise en service du réseau.

La pratique courante consiste à réaliser des études de vulnérabilité afin de sécuriser la protection physique du réseau.

Ainsi le renforcement de ce réseau de protection ne peut se faire qu'en utilisant des techniques de détection associées à de l'analyse et de la gestion des risques.

Actuellement il n'existe aucun système de contrôle bactériologique fonctionnant en temps réel associé à un dispositif d'analyse et de gestion des risques pour sécuriser la distribution de l'eau potable. Ainsi seules des informations indirectes telles qu'une rupture de la sécurité physique fournit des indications de risque d'une anomalie. Sur un réseau de distribution d'eau. Une protection physique efficace, ainsi qu'on peut aisément l'imaginer ne peut pas raisonnablement s'appliquer à un réseau de canalisations à la fois très long (centaines de kilomètres) et très complexe (nombreux nœuds).

En conséquence, il est extrêmement difficile, pour le responsable de la sécurité du réseau de distribution de l'eau, de prendre une décision rapide et efficace à partir de telles informations particulièrement lorsque l'application du principe de précaution impose de qualifier l'eau de non potable avec des conséquences extrêmement importantes, notamment :

- Interruption sans préavis de la distribution d'eau sur une large population.
- Perte de la confiance des consommateurs
- Panique éventuelle dans le public

De telles décisions doivent être prises dans un laps de temps de quelques minutes.

Des instruments qui peuvent faciliter la prise de décisions ou des systèmes qui indiqueraient sur site que l'eau n'est pas polluée par des bactéries, n'existent pas.

On peut donc conclure que le responsable actuel de la gestion des risques est pratiquement aveugle dès lors que la composition de l'eau dans le réseau de distribution est concernée

Pour tenter d'apporter des solutions globales aux besoins techniques, un large consortium de spécialistes a été créé pour les besoins de ce projet.

Il comprend:

- Un partenaire industriel associé à un expert en détection par photonique,
- Deux laboratoires de recherche en biologie
- Un gestionnaire de réseaux d'eau
- Un laboratoire étatique de sécurité globale
- Une association internationale représentant des gestionnaires de réseaux de distribution d'eau Européens et nord américains.

Les principaux thèmes du programme BIOCUM sont les suivants:

- Etablir les critères "utilisateurs" pour le contrôle biologique de l'eau et les outils d'aide à la décision.
- Développer un dispositif de détection pouvant être installé en ligne dans les réseaux de distribution d'eau et fonctionnant en temps quasi réel. Ce dispositif serait le cœur du système d'alerte contre une contamination biologique intentionnelle des réseaux de distribution d'eau.
- Développer un outil d'aide à la décision qui intégrerait toutes les données disponibles de différentes sources, l'évaluation des risques sur la santé et une aide à la décision destinée aux responsables.
- Evaluer le dispositif de contrôle biologique et d'aide à la décision grâce à la mise en place d'un site "pilote" en collaboration avec notre partenaire gestionnaire d'un réseau de distribution d'eau
- Etablir des recommandations pour l'utilisation industrielle du système, pour sa dissémination dans les réseaux et transmettre cette connaissance à travers des ateliers de travail et des publications.

### **Le temps de réaction**

Pour les gestionnaires de réseaux de distribution d'eau la notion de "temps réel" est considérée comme la différence de temps entre un la création d'un événement, avant même qu'il ne soit détecté et le moment où il est devenu inopérant. Dans notre cas, le rendre inopérant est le moment où la distribution d'eau a été stoppée ce qui correspond au premier stade du processus de prévention des risques à la population, avant même de mettre en action l'étape suivante consistant à traiter la cause.

### **Le temps réel**

Le temps réel est relatif à la différence de temps entre 2 mesures des paramètres de qualité de l'eau.

On peut définir 3 classes de temps réel qui peuvent avoir un impact sur le temps de réaction résultant d'une action spécifique.

1) La mesure en continu. C'est le cas par exemple de la mesure de chlore dont la valeur est mesurée en permanence (chaque 1/10<sup>ème</sup> de seconde ou moins) Comme dans le cas d'EAU DE PARIS, cette mesure est immédiatement disponible au Centre de Contrôle et de Commande (CCC) d'où une intervention humaine peut être lancée très rapidement, si par exemple, le niveau de chlore déterminé diminuait ou disparaissait immédiatement.

2) Le terme "Temps réel" pour les gestionnaires de réseaux d'eau est utilisé lorsque les données sur la qualité de l'eau sont disponibles à une fréquence suffisamment élevée pour permettre de stopper ou corriger les effets d'une dégradation de la qualité de l'eau avant que celle-ci

ait des effets nuisibles sur la santé de la population. Très souvent, en fonction des paramètres de qualité de l'eau à mesurer, la fréquence est déterminée en fonction du temps nécessaire pour réaliser automatiquement les différentes phases du processus de mesure. Dans le cas de la détection des micro-organismes, il s'agit des opérations suivantes:

- Filtration de l'eau
- Concentration et révélation des micro-organismes
- Détection
- Exploitation des résultats

Dans le cas de la distribution de l'eau sur Paris, gérée par EAU DE PARIS, les Bio senseurs seraient placés à des nœuds stratégiques dans le réseau de distribution, et les résultats des mesures envoyées au Centre de Contrôle et de Commande (CCC) d'où les actions préventives seraient prises. On considère, avant l'étude approfondie qui sera menée dans le cadre du programme BIO-COM, que le temps réel correspond à un maximum de 3 heures afin de permettre de mener à bien la première étape consistant à couper la distribution d'eau sur la zone concernée.

3) Le temps de réponse en laboratoire. (mesure ponctuelle): dans le cas de la mesure des bactéries dans les réseaux d'eau, il s'agit actuellement, faute de disposer d'un outil adapté, du processus utilisé, à savoir le recueil d'un échantillon d'eau, l'incubation, la détection et la mesure. Suivant le type de micro-organisme, les résultats d'analyse issus du laboratoire sont obtenus après 24 heures environ! L'information disponible après une journée ne peut être utile pour réduire les risques pesant sur la population qui utiliseront et boiront entre temps une eau contaminée, mais servira principalement pour savoir quelle est la souche de contamination afin de proposer le traitement médical approprié des patients concernés et le traitement de l'eau polluée.

**Ainsi le but principal de ces travaux est de ramener le temps de réponse des mesures de micro-organismes à l'échelle de quelques heures**

#### 1) **Techniques de détection d'agents pathogènes:**

La détection d'agents pathogènes est réalisée en utilisant des marqueurs (génétiques/sérologiques) qui sont spécifiques aux pathogènes recherchés.

Pour le *Cryptosporidium* par exemple, un moyen consiste à utiliser une combinaison de marqueurs immunologiques (épitopes spécifiques sur la surface de la cellule du *Cryptosporidium* oocyste) et un anticorps monoclonal qui reconnaît très spécifiquement ce seul marqueur et se fixe à lui. En attachant un fluorochrome à cet anticorps on obtient de l'immunofluorescence détectable.

Une autre alternative consiste à utiliser un marqueur génétique (morceau d'une séquence génétique des gènes de l'agent pathogène ou même des sous-types de cet agent pathogène). Une sonde (séquence génétique qui se fixe spécifiquement au gène marqueur du pathogène), à nouveau associée à un fluorochrome qui y est fixé et le rend fluorescent peut ainsi être détecté. Nous prévoyons

d'utiliser une combinaison de marqueurs et d'y faire correspondre les filtres du système de détection.

Sur la base de ces hypothèses il apparaît que le développement des protocoles spécifiques pourrait se faire à partir des 3 types de bactéries que sont le *Bacillus subtilis* (comme modèle du *Bacillus anthracis*), le *Cryptosporidium* et l'*Escherichia coli* O157. Bien sûr, le choix définitif sera précisé dans les prochains mois.

## 1.9 Contexte et état de l'art

### 1. Generalités

Les méthodes pour le contrôle en ligne de la qualité de l'eau sont basées sur la mesure de plusieurs paramètres tels que pH, chlore, EC, turbidité etc. Ces paramètres sont en général des indicateurs et ne peuvent détecter la majorité des contaminations intentionnelles.

Théoriquement un grand nombre d'agents biologiques et chimiques peuvent être des moyens pour contaminer de façon intentionnelle l'eau potable. Toutefois très peu de ceux-ci peuvent être utilisés du fait qu'ils doivent répondre aux exigences suivantes:

- Être très facilement disponibles
- Être efficaces même en très petite quantité afin de réduire la quantité totale nécessaire pour porter atteinte à la santé où tuer.
- Être facilement dissous dans l'eau
- Être difficilement détectable par les moyens de contrôle existants
- Ne pas réagir au chlore

Bien que les contaminants chimiques peuvent être des moyens possibles, la contamination par procédé biologique est beaucoup plus aisée car elle remplit bon nombre des critères listés ci-dessus. Ainsi certains contaminants peuvent générer des maladies avec seulement 1 microorganisme ingéré.

Il n'existe pas actuellement de méthode pour détecter en ligne une contamination microbiologique.

Dans un rapport d'alerte rédigé par l'EPA's National Homeland Security Research Center, December 2005, il y figure ceci:

*Although terrorist attacks have heightened concern about international threats to the US water system, development of an online microbial detection technology appears to be years away..."*

### 2. Détection Biologique

Au cours des dernières décades les recherches en biologie moléculaire, le génome et les microfluides ont stimulé l'imagination des chercheurs et il est apparu la

première génération de dispositifs de détection des microbes. Il y a eu de nombreuses tentatives conduisant à des prototypes de laboratoires et au développement de produits commercialisables.

- Des tests immunologiques sont disponibles dans des formats différents notamment des tests en bandelettes, en colonnes, couplées à des fibres optiques, fixées à des microsphères ou incluses dans des réseaux utilisant la technologie des microcircuits.
- L'ATP est en général un indicateur de présence de cellules vivantes sans toutefois être en mesure de les identifier. Il existe ainsi de nombreux petits kits de détection portables utilisant l'ATP. Ceux-ci sont notamment utilisés dans l'industrie agroalimentaire. Il existe également des kits portables pour tester des prélèvements d'eau.
- Les PCR portables et rapides (30 minutes ou moins) sont une réalité, avec 4 systèmes commercialisés (Raptor, etc).
- Les technologies de dispersion de lumière sont également utilisées depuis longtemps pour mesurer la turbidité de l'eau et sont maintenant adaptés à la détection de cellules dans l'eau potable (JMAR).
- Les technologies qui utilisent les microcircuits ou les micro-réseaux.
- Les systèmes à balayage laser (ex. Chemmunex)

La section suivante souligne les différentes questions et manques dans l'utilisation de ces détecteurs microbiologiques pour une détection précoce et en ligne dans les réseaux d'eau potable.

- Les contaminants ont besoin d'être concentrés pour être détectables. De nombreux agents pathogènes présentent des risques pour la santé de la population même à faible concentration. La détection de faibles concentrations est très difficile à réaliser particulièrement avec les dispositifs PCR.
- Les anticorps peuvent réagir de façon croisée
- Les réactifs peuvent ne pas être stables dans les conditions d'environnement réelles. Beaucoup d'entre eux ne sont utilisables que quelques heures.
- La plupart des systèmes ne peuvent différencier entre des microorganismes viables ou non.
- La plupart des détecteurs microbiologiques sont faits pour travailler sur des échantillons et non en ligne
- Le système Chemmunex permet une détection des bactéries sur des prélèvements d'eau. La mesure ne peut se faire qu'en laboratoire avec un délai de plusieurs heures et nécessite une préparation importante. Un tel dispositif est, par ailleurs, très cher (environ 150 K Euro).

Le système proposé dans le cadre du programme BIO-COM permet la détection et l'énumération des bactéries grâce à la technique unique et brevetée de comptage de photons avec grand champ d'analyse. La faisabilité a été prouvée et le dispositif est décrit ci-après.

Ce dispositif offrira la possibilité de détecter et énumérer en temps quasi réel les microorganismes viables dans l'eau en utilisant les procédures de comptage direct<sup>1</sup>. Des recherches précédentes ont mentionné le potentiel important pour un tel système mais, jusqu'à présent, les technologies ont été très coûteuses et pas totalement développées (2,3,4,5,6)

---

## 1.10 Organisation du projet - description des sous-projets

### 1. Introduction

Le projet est basé sur une approche interactive et parallèle. Les différentes activités sont regroupées sur 3 niveaux d'actions afin de nous permettre d'atteindre l'objectif de temps et de résultats. Les travaux de chaque plan d'action sont ensuite divisés en Work Packages comme cela figure sur le diagramme ci-dessous.

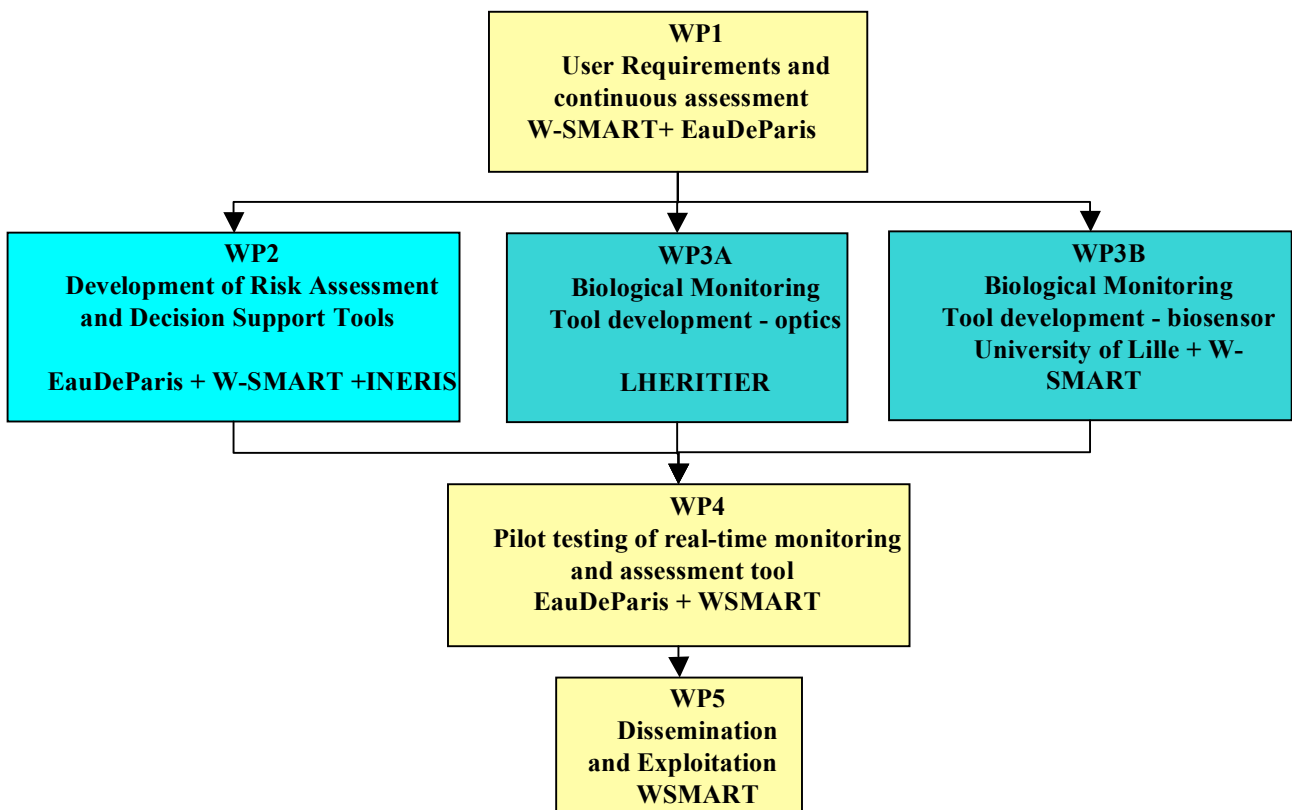


Figure 1: Bloc Diagramme BIOCOM

## 2) Présentation succincte des "WP"

### 1) WP1 "user's requirement and continuous assesment"

Ce WP correspond à un certain nombre d'actions pour mener à bien les tâches prévues au niveau inférieur. Il s'agit notamment:

- De déterminer les 2 agents pathogènes qui seront ciblés dans le cadre de ce programme.
- De déterminer les spécifications du dispositif de mesure qui lui-même comprend:

1) Un bio senseur qui est l'outil correspondant à la partie biologique du processus

2) Un dispositif optique de détection par fluorescence qui a pour fonction d'analyser le bio senseur, détecter, compter les agents pathogènes et transmettre les résultats

c) De conceptualiser le protocole du dispositif d'aide à la décision

d) d'établir la méthodologie pour la dissémination des systèmes de mesure

e) de fournir un protocole pour l'optimisation du système

f) de choisir le réseau particulier qui sera choisi pour l'expérimentation

## 2) WP2 Development of Risk Assessment and Decision Support Tools

Ce WP a pour objectif:

- De développer un algorithme pour la gestion des données
- De développer une base de données centralisée
- De développer les moyens d'aide à la décision

## 3) WP3A et WP3B Conception et réalisation du Dispositif de Mesure

Il s'agit à la fois de la partie scientifique du projet et la partie essentielle du dispositif, lequel est la clé de la réussite du programme. Le développement du dispositif de mesure comprend 2 parties:

**1) Développement du bio-senseur** basé sur l'adaptation des procédés biologiques existants aux fins de les adapter à la fois à la détection aux micro-organismes dans l'eau potable. Les 3 micro-organismes présélectionnés afin de développer les protocoles spécifiques sont le *Bacillus subtilis* (comme modèle pour le *Bacillus anthracis*), le *Cryptosporidium*, et l'*Escherichia coli* O157. Parmi ceux-ci 2 seulement seront expérimentés dans le cadre du programme BIO-COM.

**2) Développement du système innovant de détection** qui est basé sur la technologie de comptage de photons adapté à l'analyse de champs larges pour la détection bactériologique dans l'eau potable. La très grande sensibilité de ce dispositif augmentera la détectivité face à des niveaux de contamination extrêmement faibles. Les limites identifiées du dispositif sont liées au contraste entre les bactéries et le fond.

### Les 3 phases du processus:

#### 1) Prélèvement, filtrage et Concentration

L'échantillon d'eau est filtré par une membrane puis les bactéries ainsi retenues sur la membrane sont transférées sur une surface contenant les réactifs. Il s'agit d'un processus courant, connu et bien maîtrisé.

**2) Identification des bactéries:** Afin de distinguer entre les micro-organismes viables où non, différentes techniques sont employées simultanément

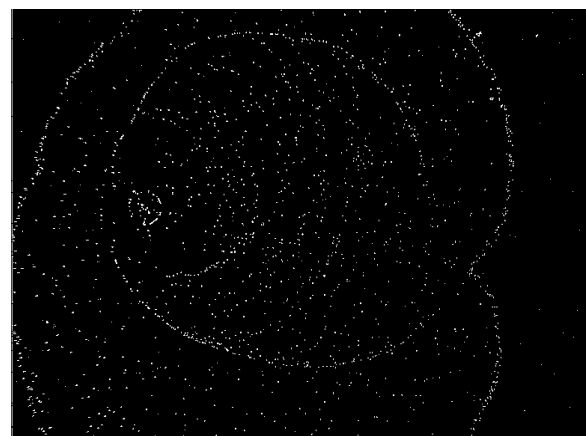
- Fluorescence
- Technique de détection de croissance
- Medias de croissance spécifiques à la cible
- Technique de double marquage
- Marqueurs spécifiques

**3) Enumération** – Les micro-organismes ciblés sont ensuite détectés et comptés par le dispositif de détection optique qui présente les particularités suivantes:

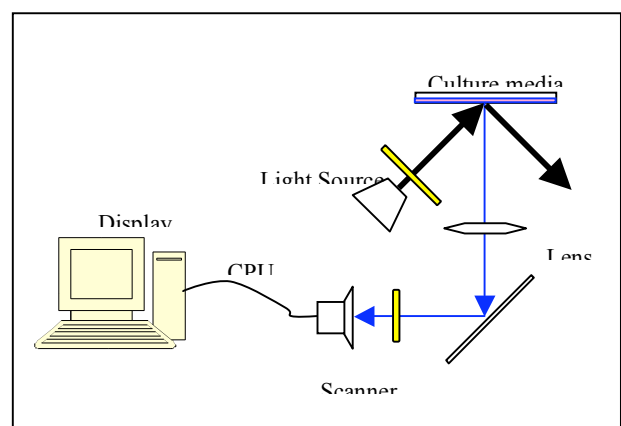
- Comptage de photons
- Grand champ de mesure afin de mesurer en une seule fois la totalité de la surface de la membrane de filtration (25mm)

Les avantages déjà démontrés de ce dispositif sont liés à une très grande détectivité grâce à un très grand rapport signal/bruit (environ 1:64,000), sans utiliser d'intensificateur d'images ni de refroidissement par eau.

Le logiciel associé analyse ensuite l'image obtenue et compte les micro-organismes ciblés.



La figure 1 ci-dessus montre un exemple de la détection de microbilles fluorescentes de diamètre 2,5µm dans un champ horizontal de 13 mm



La figure 2 ci-dessus montre le schéma du banc expérimental

### Faisabilité:

La faisabilité de la détection a déjà été démontrée dans une phase précédente à partir d'un banc expérimental correspondant au synoptique ci-dessus. Elle a été conduite

à la fois sur des microbilles fluorescentes et sur des bactéries vivantes de type " coliforme fécal"

Les travaux menés au cours de cette phase ont prouvé:

- La capacité du dispositif à détecter des bactéries dans un grand champ de prise de vues. (13 mm)
- La capacité de détecter des bactéries dont la taille est bien inférieure au pixel (de l'ordre du 1/10ème de pixel environ)

Ainsi les risques de ne pas atteindre les objectifs du programme ont déjà été réduits de façon significative.

#### Les performances attendues pour le détecteur

- Un grand champ de détection (Ø 25 mm)
- Analyse en 1 seule prise de vues
- Localisation précise de la détection pour permettre une confirmation en cas d'artefacts
- Fonctionnement simultané à 2 longueurs d'ondes simultanées pour s'adapter aux marqueurs fluorescents retenus et réduire ainsi les artefacts
- Détecter des micro-organismes de la taille de 1 à 2 µm et donc bien en dessous de la dimension du pixel.
- Fournir l'information de viabilité de la bactérie par une analyse temporelle de la fluorescence au cours du processus de croissance.
- Mesurer dans un pixel une fluorescence extrêmement faible afin de réduire le temps de croissance nécessaire pour assurer une détection efficace.
- Détecter des différences de contraste extrêmement faibles entre 2 pixels contigus

Ce sont les paramètres essentiels permettant de disposer d'un système performant, offrant un taux de fausses alarmes minimum et donc capable d'assurer une prévention efficace contre les effets d'attaques bio terroristes dans les réseaux d'eau.

#### Les difficultés:

Les performances de détection sont limitées par le rapport S/B du détecteur. Nous avons comme objectif de pouvoir détecter moins de 5 photons /pixel /second avec ce dispositif.

#### Les principales tâches à réaliser

- Réduire les sources de lumière parasites pour le détecteur et pour le bio senseur
- Différencier et identifier les bactéries viables:
- Déterminer les médias de croissance des bactéries
- Déterminer les 2 marqueurs fluorescents à utiliser
- Déterminer les algorithmes de détection et d'identification des bactéries viables
- Réaliser les tests de validation.

#### 4. WP4 Validation sur un site pilote

Les travaux à réaliser au titre de WP4 ont pour objectif de mener à bien les tests appropriés, sur un réseau d'eau potable et de coupler les informations délivrées à celles en

provenance d'autres détecteurs, le tout couplé au dispositif d'aide à la décision.

#### 5. WP5 Dissémination et exploitation

WP 5 a pour objectif:

- De fixer les règles de diffusion du dispositif dans les réseaux d'eau potable
- De préciser les recommandations relatives à leur utilisation industrielle
- De fixer les axes de développement ultérieur compte tenu des résultats des expérimentations.

## Références

- [1] Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater – method 9222 B. Standard Total Coliform Membrane Filter Procedure – 20<sup>th</sup> edition - 1998.
- [2] M. Goossens, F. Mittelbach et A. Samarin. *The LaTeX Companion*. Addison-Wesley, 1994.
- [3] L. Lamport. *LaTeX2e User's Guide and Reference Manual*. Addison-Wesley, 1994.
- [4] The Royal Society of Chemistry, Sartory D., Parton A., Rackstraw C., 2001, 31-37.
- [5] Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater – method 9222 B. Standard Total Coliform Membrane Filter Procedure – 20<sup>th</sup> edition - 1998.
- [6] Rapid same day microcolony enumeration technique for E. coli in drinking water, Rapid Detection Assay for Food and Water<sup>1</sup> Rapid detection and counting of single bacteria in a wide field using a photon-counting TV camera, FEMS Microbiology Letters, 1991 , 83, 231 – 238, Masuko M., Hosoi S., Hayakawa T.
- [7] Imaging of Lactobacillus brevis single cells and microcolonies without a microscope by an ultra-sensitive chemiluminescent enzyme immunoassay with a photon-counting television camera, 1997, Applied and Environmental Microbiology, Nov. 1997, Vol. 63 No. 11 4528 – 4533, Yasui T., Yoda K.
- [8] A simple chemiluminescence-based method for rapid enumeration of Listeria spp. microcolonies, Journal of Applied Microbiology, 2001, 90, 988-993, Vidon D.J., Donse S., Muller C., Entzmann A., Andre P.
- [9] Development and application of a bioluminescence ATP assay method for rapid detection of coliform bacteria, Water Research 1997, Vol. 31, page 1913 – 1918, Tanaka H., Shinji T., Sawada K.,