

AGENCE DE L'EAU ADOUR GARONNE

90, RUE FERETRA
31 078 TOULOUSE CEDEX 4




AGENCE DE L'EAU
ADOUR-GARONNE

ETABLISSEMENT PUBLIC DU MINISTERE
DU DEVELOPPEMENT DURABLE

ÉTUDE CONCERNANT L'ORIGINE FECALE DES CONTAMINATIONS MICROBIENNES ANALYSE BIBLIOGRAPHIQUE

- RAPPORT DEFINITIF -

Version	Etat	Date	Rédigé par	Vérifié par
2	Définitif	10/02/10	T. PARIS T. CHESNOT	M. BOUALAM

A : Maxéville	Le : 10/02/10	IPL santé, environnement durables :
	Siège social Rue Lucien Cuénot Site Saint-Jacques II 54521 Maxéville ☎ 03 83 50 36 00 - Fax : 03 83 50 36 99	Laboratoire d'Etudes et d'Expertises, Rue Lucien Cuénot, Site Saint-Jacques II, 54521 Maxéville ☎ 03 83 50 36 91 Fax : 03 83 50 36 99

SOMMAIRE

1. RESUME	8
2. CONTEXTE	10
3. RAPPELS METHODOLOGIQUES	11
3.1. LES MICROORGANISMES UTILISES POUR LA DETECTION ET LA CARACTERISATION DES POLLUTIONS FECALES	11
3.1.1. Notion d'indicateurs de contamination fécal.....	11
3.1.2. Les indicateurs usuels (d'après OMS, 1994 ; Blanch et al., 2004).....	11
3.1.2.1. Coliformes thermotolérants dont <i>Escherichia coli</i>	12
3.1.2.2. <i>Enterococcus sp.</i>	13
3.1.2.3. <i>Clostridium perfringens</i>	13
3.1.2.4. Conclusions sur les indicateurs de contamination usuels.....	14
3.1.3. Notion d'indicateurs potentiels de contamination fécale	15
3.1.3.1. Les marqueurs physicochimiques.....	15
3.1.3.2. Les marqueurs microbiologiques alternatifs	16
3.1.3.3. Conclusions sur les indicateurs alternatifs.....	22
3.2. LA NOTION DE RECHERCHE DE SOURCES DE CONTAMINATION FECALE	24
3.3. LES GRANDS PRINCIPES DES METHODES UTILISEES.....	24
3.3.1. Les méthodes dépendantes d'une base de données	24
3.3.2. Les méthodes indépendantes d'une base de données.....	24
3.3.3. Rappels sur les méthodes de biologie moléculaire.....	25
3.3.3.1. La PCR conventionnelle	25
3.3.3.2. La notion d'empreinte génétique.....	27
3.3.3.3. La PCR quantitative.....	27
4. PRESENTATION DES METHODES SUSCEPTIBLES D'ETRE UTILISEES POUR LA RECHERCHE DES SOURCES DE CONTAMINATION FECALE.....	28
4.1. METHODES DEPENDANT DE LA CULTURE ET D'UNE BASE DE DONNEES.....	28
4.1.1. Méthodes phénotypiques.....	28
4.1.1.1. Résistance aux antibiotiques	28
4.1.1.2. Profils d'utilisation du carbone	30
4.1.2. Méthodes génotypiques.....	31
4.1.2.1. Analyse des séquences d'ADN répétitives (rep-PCR DNA fingerprinting).....	31
4.1.2.2. Analyse d'ADN polymorphique aléatoirement amplifié (RAPD).....	32
4.1.2.3. Analyse du polymorphisme de longueur de fragments amplifiés (AFLP).....	33
4.1.2.4. Electrophorèse sur gel en champ pulsé (PFGE).....	34
4.1.2.5. Ribotypage	35
4.2. METHODES DEPENDANT DE LA CULTURE / SANS BASE DE DONNEES	36
4.2.1. Typage des bactériophages ARN f-spécifiques	37
4.2.2. PCR gène-spécifique.....	38
4.3. METHODES INDEPENDANTES DE LA CULTURE ET DE BASE DE DONNEES	39
4.3.1. Analyse globale d'une communauté	39
4.3.1.1. Identification à l'aide des bases de données de gènes codant pour l'ARNr 16S.....	39
4.3.1.2. Structure des communautés par empreinte génétique	40
4.3.1.3. Cibles alternatives	41
4.3.2. Identification et quantification de bactéries spécifiques	41
4.3.2.1. Sondage direct de gènes spécifiques	41
4.3.2.2. Méthodes basées sur la PCR à cibles spécifiques	42

4.3.3.	Identification et quantification de virus spécifiques par (RT)-PCR	44
4.4.	CONCLUSIONS SUR LES DIFFERENTES METHODES SUSCEPTIBLES D'ETRE UTILISEES DANS LES RECHERCHES DE SOURCES DE CONTAMINATION FECALE.....	46
5.	ETUDE DE CAS.....	51
5.1.	EVALUATION DE DEUX METHODES DANS UN CONTEXTE FRANÇAIS : LA PCR A CIBLE SPECIFIQUE (<i>BACTEROIDALES</i>) ET LE GENOTYPAGE DES PHAGES A ARN F-SPECIFIQUE.....	51
5.1.1.	Source d'information.....	51
5.1.2.	Description générale.....	51
5.1.3.	Méthodes analytiques.....	52
5.1.4.	Echantillonnage.....	53
5.1.5.	Validation des méthodes.....	53
5.1.6.	Bilan.....	54
5.2.	EVALUATION DE PCR EN TEMPS REEL (<i>BACTEROIDALES</i>) DANS UN CONTEXTE FRANÇAIS.....	55
5.2.1.	Source d'information.....	55
5.2.2.	Description générale.....	55
5.2.3.	Méthode analytique.....	55
5.2.4.	Echantillonnage.....	56
5.2.5.	Validation de la méthode.....	56
5.2.6.	Bilan.....	57
6.	CONCLUSION GENERALE.....	58
7.	SYNTHESE.....	60
8.	RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	62
9.	AUTRES RÉFÉRENCES UTILES.....	70

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 : Statut, spécificité et intérêt des principaux indicateurs de contamination fécale pour la recherche des sources de contamination.....	23
Tableau 2 : Synthèse de mise en œuvre des méthodes.....	49
Tableau 3 : Synthèse des principaux avantages / désavantages des méthodes.....	50
Tableau 4 : Récapitulatif des sensibilités et spécificités des marqueurs utilisés par Gourmelon <i>et al.</i> , (2007).....	54
Tableau 5 : récapitulatif des sensibilités et spécificités des marqueurs Rum-2-Bac et AIIBac.....	57

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Ultrastructure d'une bactérie et de l'ADN.....	25
Figure 2 : Principe d'une PCR conventionnelle.....	26
Figure 3 : Principe de réplication exponentielle de la PCR.....	26
Figure 4 : Fragments d'ADN après migration électrophorétique et marquage.....	26
Figure 5: Profil d'empreintes génétiques obtenues après amplification de séquences d'ADN répétitives chez des souches de <i>E. coli</i> isolées de bétail.....	27
Figure 6 : Exemple de profil obtenu en PCR quantitative (à gauche : courbes d'amplification ; à droite : Gamme étalon permettant la quantification) / Source : Laboratoire IPL sed EST.....	28
Figure 7 : Schéma de la boîte à outils disponible pour la recherche des sources de contamination fécale (D'après US-EPA, 2005 ; SantoDomingo <i>et al.</i> , 2007 ;Ogorzaly, 2009).....	48
Figure 8 : Schéma de principe de la PCR à cible spécifique (<i>Bacteroidales</i>).....	52
Figure 9 : Schéma de principe de la méthode de détection des bactériophages à ARN f-spécifique.....	52
Figure 10 : Schéma de principe de la QPCR cible-spécifique (<i>Bacteroidales</i>).....	55

LISTE DES ABBREVIATIONS

ADN :	Acide DésoxyriboNucléique
AFLP :	Analyse du polymorphisme de longueur de fragments amplifiés (Amplified Fragment Length Polyphormism)
AP-PCR :	Arbitrary Primed PCR
ARA :	Analyse des résistances aux antibiotiques
ARN :	Acide RiboNucléique
ARNr :	Acide RiboNucléique Ribosomal
ARP :	Profils de résistances aux antibiotiques (Antibiotic Resistance Profile)
DGGE :	Electrophorèse sur gel en gradient dénaturant (Denaturing Gradient Gel Electrophoresis)
ERIC :	Enterobacterial Repetitive Intragenic Consensus
FISH :	Hybridation fluorescente <i>in situ</i> (Fluorescent <i>In Situ</i> Hybridization)
HFERP :	Horizontal Fluorophore-Enhanced Rep-PCR
ISR-PCR :	Intergenic Spacer Region – PCR
LH-RFLP :	RFLP d'hétérogénéité de longueur (Length Heterogeneity RFLP)
MAR :	Résistance multiple aux antibiotiques (Multiple Antibiotic Resistance)
MST :	Recherche de l'origine des contaminations microbiennes (Microbial Source Tracking)
NCCLS :	National Committee for Clinical Laboratory Standards
PCR :	Réaction de Polymérisation en Chaîne (Polymerase Chain Reaction)
PFGE :	Electrophorèse sur Gel en Champ Pulsé (Pulse Field Gel Electrophoresis)
QPCR :	PCR Quantitative (Quantitative PCR)
RAPD :	Random Amplified Polymorphic DNA
REP :	Repetitive Extragenic Palindromes
RFLP :	Polymorphisme de longueur des fragments de restriction (Restriction Fragment Length polyphormism)
RT-PCR :	Reverse Transcription – PCR
STEP :	STation d'EPuration
TGGE :	Electrophorèse sur gel en gradient de température (Temperature Gradient Gel Electrophoresis)
T-RFLP :	RFLP terminale (Terminal – RFLP)

1. RESUME

Le maintien de la qualité des eaux de baignade et des eaux des bassins conchylicoles constitue un enjeu tout aussi important que la préservation des réservoirs d'eau à potabiliser. Les méthodes réglementaires de détection des pollutions fécales s'avèrent utiles pour révéler et éliminer les sources de pollutions les plus évidentes, mais sont inadaptées pour identifier les sources de pollution moins importantes, plus diverses et plus diffuses.

De nombreux indicateurs microbiologiques alternatifs sont disponibles. L'étude simultanée d'un minimum de deux marqueurs apparaît préférable voire indispensable pour identifier une source de contamination fécale. L'utilisation combinée des *Bacteroidales* et des phages ARN f-spécifiques constitue actuellement la méthode la plus pertinente. Si nécessaire, dans un second temps, d'autres microorganismes indicateurs peuvent être employés en complément pour affiner le diagnostic. Les méthodes d'étude des indicateurs ont beaucoup évolué ces dernières années. Actuellement, les méthodes basées sur la culture et l'utilisation de bases de données tendent à être abandonnées au profit des méthodes de PCR à cibles spécifiques qui s'affranchissent de ces deux contraintes.

Au-delà des éléments techniques et méthodologiques, la connaissance du contexte environnemental (à l'échelle d'un bassin versant par exemple), est un préalable indispensable pour faire aboutir une démarche d'identification des sources de contamination fécale. Ainsi, les experts du domaine s'accordent à dire que l'identification des sources de contamination implique une analyse méthodique des sources de pollutions éventuelles, avec une caractérisation au plus près du point de rejet suspecté. De même, afin de tenir compte des variations temporelles qui affectent les points de rejets la réalisation de plusieurs campagnes apparaît comme nécessaire.

Actuellement il nous semble que la démarche de recherche de sources de contamination fécale peut se décomposer comme suit : sur chacun des points de rejets suspectés, plusieurs niveaux d'analyses de plus en plus fins peuvent être appliqués : le premier niveau consiste à réaliser une distinction sur la base des contaminations d'origine humaine ou animale, en cas de contamination animale il est possible d'avoir recours à des marqueurs plus spécifiques pour déterminer de quels animaux il s'agit (systèmes PCR spécifiques de *Bacteroidales*). En dernier point des méthodes très discriminantes peuvent être utilisées si nécessaire pour définir l'origine précise du rejet (un élevage donné par exemple), ceci grâce à l'utilisation de méthodes génotypiques et/ou phénotypiques très précises.

2. CONTEXTE

Les eaux du milieu naturel ont ceci de particulier qu'elles servent généralement aussi bien de milieu récepteur aux différents effluents pollués (ex : rejets de STEP) que de ressources pour la production d'eau potable. Les activités industrielles ou agricoles et d'une manière plus générale les activités humaines, exercent une forte pression sur les eaux de surface et dans une moindre mesure sur les eaux souterraines. Ainsi, dans certaines zones géographiques, la production d'eau potable fait intervenir de manière prépondérante des ressources qui sont par ailleurs soumises à une forte pression anthropique. De nombreux points de rejets permanents ou temporaires, typiquement urbains ou industriels ou encore agricoles influencent ces ressources. L'impact de ces rejets, de ces ruissellements (ou infiltrations), est plus ou moins marqué en fonction des saisons ; les périodes d'étiage accentuent par exemple la vulnérabilité des ressources.

La qualité chimique et microbiologique des milieux récepteurs préoccupe les gestionnaires en charge de leur préservation car du maintien de la qualité des ressources hydriques dépendent directement ou indirectement la qualité des eaux potables, mais aussi celle des zones de baignade. Cette problématique n'est d'ailleurs pas complètement spécifique aux eaux douces puisque de la même manière, la qualité des eaux côtières peut entraîner des répercussions économiques et sanitaires importantes. Comme le montre les évolutions récentes de la réglementation, la protection des eaux de baignade des plages tout comme celle des eaux des bassins conchylicoles représentent des enjeux aussi importants que la préservation des réservoirs d'eau à potabiliser. Ainsi, plusieurs textes réglementaires récents tendent à réduire les niveaux acceptables de pollution : Décret eau potable (20 décembre 2001), directive européenne sur les eaux de baignade (2006/7/CE), normalisation en cours des méthodes de quantification dirigées vers certains virus entériques (Norovirus et virus de l'hépatite A au niveau du groupe de normalisation européen CEN/TC 275/WG6/TAG4).

Dans ce contexte et de manière logique, les efforts se sont portés sur la généralisation et l'optimisation des procédés de traitement des effluents de sorte à diminuer les sources de pollution et à réduire les quantités de polluants introduites dans le milieu récepteur. Alors que les sources de pollution les plus évidentes ont manifestement été identifiées et traitées, d'autres moins importantes, plus diverses et plus diffuses semblent persister au niveau de la plupart des bassins versants. Afin de compléter la démarche engagée pour améliorer significativement la qualité des ressources hydriques, y compris pendant les événements météorologiques défavorables, des outils de diagnostics permettant de caractériser l'origine de la contamination seraient donc utiles pour résoudre les difficultés rencontrées par les gestionnaires. Par exemple, ces dernières années, l'agence de l'eau Adour-Garonne a constaté des épisodes de pollution du milieu hydrique récepteur de localisation et d'intensité variables. L'origine des pollutions constatées est apparue difficile à déterminer car les outils classiques de suivi traduisent la présence potentielle de pathogènes d'origine fécale sans pour autant apporter des indications plus précises sur la source de contamination. Ce constat a incité l'Agence à lancer une analyse bibliographique afin de déterminer quelles techniques/méthodes sont susceptibles d'aider les gestionnaires des milieux aquatiques à préciser l'origine des contaminations fécales.

Du point de vue microbiologique, une des stratégies retenues pour déterminer l'origine des contaminations consiste à caractériser les contributions relatives attribuables d'une part aux effluents d'origine humaine et d'autre part aux effluents issus des animaux. Dans un premier niveau, il s'agit ainsi de distinguer les pollutions issues des effluents de STEP des pollutions issues des effluents d'élevages extensifs (ruissellements) ou intensifs (rejet d'exploitations agricoles). Le concept n'est pas nouveau et des outils méthodologiques allant dans ce sens ont déjà été proposés mais ces derniers restent à améliorer. De récentes avancées s'appuyant sur les innovations des techniques de quantification et d'identification laissent à penser que la stratégie pourrait être affinée.

L'objet de ce rapport est donc de discuter l'intérêt et la pertinence des différents outils plus ou moins récemment développés et de ceux en cours de développement. Sur la base de différents critères tels que le coût, le potentiel discriminant, la faisabilité technique, et éventuellement les retours d'information disponibles à partir d'études de cas ; une comparaison des différentes

méthodologies sera réalisée et aboutira à une proposition de mise en application d'un ou de plusieurs outils.

3. RAPPELS METHODOLOGIQUES

Cette partie a pour objectif d'effectuer un rappel sur les notions actuellement utilisées pour mettre en évidence la contamination fécale dans les ressources environnementales (ou dans l'eau de distribution). Deux points principaux sont ainsi abordés, il s'agit d'une part, des différents microorganismes qui présentent un intérêt dans ce contexte et d'autre part du principe général des méthodes qui sont utilisées dans les étapes de diagnostic pour la recherche des sources de contamination fécale du milieu récepteur.

3.1. Les microorganismes utilisés pour la détection et la caractérisation des pollutions fécales

Dans un premier temps, la notion d'indicateur de contamination fécale est abordée au travers des indicateurs usuels sur lesquels s'appuie le contrôle réglementaire des ressources et des eaux de baignade. Dans un deuxième temps, sont présentés les indicateurs potentiels qui ont été proposés par la communauté scientifique et qui sont utilisés dans les démarches plus globales de recherche des sources de contamination fécale. A cette occasion un bref rappel sur les principaux indicateurs physicochimiques de contamination fécale sera proposé (il est à noter que cette catégorie de molécules n'est pas incluse dans le champ de cette étude).

3.1.1. Notion d'indicateurs de contamination fécale

Devant l'impossibilité de réaliser une recherche de l'ensemble des microorganismes pathogènes potentiellement présents dans un milieu hydrique soumis à l'influence de sources de contamination fécale, la stratégie adoptée consiste à rechercher un nombre limité de microorganismes dont la présence est susceptible de traduire une pollution fécale et donc d'alerter sur la possibilité que des microorganismes pathogènes soient présents. Les germes ainsi recherchés sont regroupés sous le terme générique d'indicateurs de contamination fécale ; ils ont été choisis sur la base d'une série de critères permettant de garantir leur fiabilité à indiquer une pollution fécale. Ainsi ces germes indicateurs doivent répondre aux critères rappelés ci-après :

- une répartition uniforme dans les selles des populations humaines ou animales qui les excrètent,
- une distribution aléatoire dans l'échantillon à analyser,
- une identification sans ambiguïté dans tous les types d'échantillons,
- une incapacité à se multiplier en dehors de l'hôte initial ,

- une absence de potentiel pathogène,
- une résistance dans l'environnement au moins aussi importante que les pathogènes dont ils sont censés être représentatifs,
- une forte corrélation avec la présence de microorganismes pathogènes.
- une détection aisée en laboratoire.

En termes d'interprétation, il est important de préciser que si la présence d'indicateurs dans un milieu traduit bien la survenue d'une contamination fécale plus ou moins récente, il reste cependant impossible d'établir un rapport direct entre les concentrations de ces indicateurs et les concentrations des microorganismes pathogènes potentiellement présents.

3.1.2. Les indicateurs usuels (d'après OMS, 1994 ; Blanch *et al.*, 2004)

A l'analyse des exigences qui s'appliquent à un indicateur de contamination fécale, les microorganismes retenus, notamment pour la réglementation, sont des bactéries fécales. Il s'agit des coliformes thermotolérants (et en particulier *Escherichia coli*), des Entérocoques (assimilables aux Streptocoques fécaux du groupe D selon Lancefield), et des clostridies avec en particulier l'espèce *Clostridium perfringens*. Ces indicateurs sont présents dans le tractus intestinal des animaux à sang chaud, et leur présence dans un milieu est donc aussi bien représentative d'une contamination par des selles humaines que par des fèces animales.

Les principales informations concernant chacun de ces indicateurs sont rappelées dans les paragraphes suivants en abordant quelques caractéristiques générales, mais aussi en décrivant les grands principes permettant leur dénombrement dans le milieu naturel et les eaux de distribution ; en dernier point les informations utiles à la détermination des sources de contamination apportées par chacun sont indiquées.

3.1.2.1. Coliformes thermotolérants dont *Escherichia coli*

🚩 Caractéristiques générales

Les coliformes sont des bactéries Gram négatif (*), non sporogènes, qui se présentent sous forme de bâtonnets (bacilles). La dénomination des coliformes thermotolérants repose sur leur capacité à fermenter le lactose à une température de 44°C, ce qui les distingue des coliformes totaux incapables de se multiplier à cette température. Les principaux coliformes thermotolérants appartiennent aux genres *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Citrobacter* et surtout *Escherichia*. Ce dernier genre est celui qui présente le plus d'intérêt en termes d'indicateur de contamination fécale.

* GRAM (coloration de) : La coloration de Gram est une méthode de classification des bactéries qui oppose les bactéries « Gram négative » aux bactéries « Gram positives ». Au terme du protocole de coloration qui est réalisé sur une suspension de bactéries, l'observation microscopique permet de distinguer soit des colonies colorées en rose (Gram négative), soit des colonies colorées en violet (Gram positive). La différence de coloration traduit une différence importante dans la nature de la membrane bactérienne et permet d'orienter la suite des tests d'orientation à pratiquer pour identifier plus précisément la bactérie.

🚩 Signification en termes de contamination fécale

Les *E. coli* sont retrouvées aussi bien dans les selles des hommes que dans celles des animaux à sang chaud. Elles sont présentes en grande quantité dans les fèces puisque leur concentration peut atteindre jusqu'à 10⁹ bactéries par gramme de selle. Dans l'environnement, en l'absence d'hôte, leur croissance est considérée comme très peu probable. Certains travaux évoquent cependant un potentiel de recroissance dans des environnements particuliers tel que des sols situés sous les climats tropicaux et subtropicaux ; mais il semble que ce phénomène n'ait jamais été décrit sous les climats tempérés.

Dans la mesure où,

- d'une part, au contraire d'*E. coli*, la présence de certains coliformes thermotolérants ne peut pas toujours être directement reliée à une contamination fécale,
- d'autre part, les concentrations en coliformes thermotolérants observées dans les échantillons sont généralement étroitement liées à celles en *E. coli* (du fait de son caractère majoritaire),

d'une manière générale le dénombrement des *E. coli* est maintenant souvent préféré à celui des coliformes thermotolérants. L'OMS considère d'ailleurs que *E. coli* apparaît effectivement comme l'indicateur le plus précis pour estimer la pollution fécale (OMS, 2003).

🚩 Méthodes de dénombrement normées

D'un point de vue enzymatique, *Escherichia coli* se différencie des autres coliformes par la possession de l'enzyme 1-3-β-glucuronidase, en plus de la 1-3-β-galactosidase présente chez la plupart des coliformes. Ces caractéristiques enzymatiques sont utilisées pour permettre le dénombrement de cette bactérie dans les ressources superficielles, dans les eaux de baignade et dans les eaux de mer selon la méthode décrite dans la norme NF EN ISO 9308-3.

E. coli réalise également la fermentation du lactose et du mannitol à 44°C, avec formation d'acide et de gaz. Par ailleurs, il produit de l'indole à partir du tryptophane. Ces propriétés sont mises à profit pour permettre le dénombrement des *E. coli* dans les eaux de distribution et dans les ressources souterraines à partir de la norme NF EN ISO 9308-1.

3.1.2.2. *Enterococcus sp.*

🚩 Caractéristiques générales

Les bactéries du genre Entérocoque sont des bactéries à Gram positif, sphériques à ovoïdes, qui se caractérisent par un développement dans des milieux salins (6,5 % de NaCl), à pH élevés, et jusqu'à des températures de 45°C. Par ailleurs elles sont capables d'hydrolyser l'esculine en présence de 40% de bile. Cinq espèces principales sont à considérer, il s'agit de *E. faecalis*, *E. faecium*, *E. durans*, *E. gallinarum*, *E. avium*.

E. faecalis, *E. faecium* seraient les deux espèces les plus fréquemment rencontrées dans les selles humaines.

🚩 Signification en termes de contamination fécale

Comme *E. coli*, les Entérocoques sont présents dans les selles des animaux à sang chaud aussi bien chez l'homme que chez l'animal. Les concentrations observées dans les selles humaines varient de 10^5 à 10^8 bactéries par gramme. Il semble cependant que leur habitat puisse s'étendre en dehors des selles humaines ou animales et de ce fait, pour limiter les erreurs d'interprétation, certains auteurs (Haslay et Leclerc, 1993) préconisent l'exploitation des dénombrements d'Entérocoques uniquement en complément des dénombrements de coliformes ou d'autres indicateurs.

Malgré tout et de manière intéressante, les espèces fécales pourraient présenter une spécificité d'habitat suffisante pour permettre une détermination de l'origine de certaines contaminations fécales (Pourcher *et al.*, 1991 ; Haslay et Leclerc, 1993).

En dernier point, il est également intéressant de noter que la bibliographie du domaine souligne que les Entérocoques se caractérisent par une résistance environnementale supérieure à celle des coliformes et notamment celle de *E. coli*. Cette résistance accrue permettrait de mettre en évidence des contaminations plus anciennes.

🚩 Méthodes de dénombrement normées

D'un point de vue enzymatique, les Entérocoques se distinguent également par la présence de deux activités enzymatiques spécifiques : la pyroglutamyl aminopeptidase et la β -D-glucosidase (Manafi et Sommer, 1993). Cette dernière propriété est mise à profit grâce à la méthode décrite dans la norme NF EN ISO 7899-1, pour permettre leur dénombrement dans les ressources superficielles, les eaux de baignade et les eaux de mer.

Le dénombrement des Entérocoques dans l'eau de distribution et dans les ressources souterraines exploite leur capacité à réduire les sels de tétrazolium et à hydrolyser l'esculine sur une gélose à la bile (norme NF EN ISO 7899-2).

🚩 Autres méthodes d'étude.

Du fait de sa forte capacité à résister dans l'environnement, le genre *Enterococcus* est parfois considéré comme un indicateur de contamination plus pertinent que *Escherichia coli* et certaines équipes françaises souhaitent exploiter au mieux cet indicateur en utilisant un spécifiquement des méthodes de biologie moléculaire appliquées à l'espèce *Enterococcus faecalis* (équipe de M AUFFRAY, laboratoire de microbiologie de l'environnement, université de Caen en collaboration avec l'agence de l'eau Seine Normandie).

3.1.2.3. *Clostridium perfringens*

🚩 Caractéristiques générales

Les bactéries du genre *Clostridium* peuvent être regroupées dans un ensemble plus large sous la notion de bactéries anaérobies sulfitoréductrices. Les clostridies sont des bactéries anaérobies à Gram positif, capables de former des spores lorsque les conditions ambiantes leurs sont défavorables. Un dénombrement sélectif des spores de clostridies peut-être réalisé en éliminant les formes végétatives par un chauffage à température élevée (75°C).

✚ Signification en termes de contamination fécale

Parmi les *Clostridium*, l'espèce *C. perfringens* est celle qui constitue le meilleur indicateur de contamination fécale néanmoins, sa présence dans les selles humaines ou animales reste bien moindre que celle d'*Escherichia coli* par exemple (environ 0,5 % de la flore fécale selon Bitton, 2005). Par ailleurs les spores de *Clostridium perfringens* sont également présentes dans le sol, la boue, la vase. Du fait de sa présence naturelle dans de nombreux compartiments environnementaux, il est clair que ce germe ne peut pas être considéré comme un germe d'origine spécifiquement fécale.

Du fait de leur capacité à sporuler, les spores de *Clostridium* sont particulièrement persistantes dans l'environnement et survivent beaucoup plus longtemps que les *E. coli* ou les Entérocoques. En raison de leur longue durée de survie, ils sont surtout capables d'indiquer une contamination fécale ancienne ou à distance.

Tout comme pour les Entérocoques, l'interprétation des dénombrements de ce germe en termes de diagnostic de contamination fécale ne peut *a priori* être pertinente que dans la mesure où ces dénombrements sont produits en complément de dénombrements d'autres indicateurs.

✚ Méthodes de dénombrement

Le principe du dénombrement des spores de *Clostridium* est basé sur leur capacité à réduire le sulfite de sodium en sulfure. En présence de fer, cette réduction est facilement mise en évidence grâce à la formation de sulfure de fer de couleur noire (norme NF EN 26461-2). L'espèce *C. perfringens* peut être isolée de manière plus spécifique en s'appuyant sur sa capacité à se développer à des températures élevées de l'ordre de 46 à 48°C.

3.1.2.4. Conclusions sur les indicateurs de contamination usuels

Deux questions se posent concernant ces indicateurs. Dans quelle mesure sont-ils fiables pour mettre en évidence une pollution fécale ? Peuvent-ils être exploités pour déterminer la source d'une contamination fécale ?

✚ Fiabilité de ces marqueurs

Les indicateurs classiquement utilisés sont des indicateurs bactériens. Le fait que la présence des indicateurs usuels dans les eaux de baignade soit souvent associée à des symptomatologies gastro-intestinales atteste manifestement de la capacité de ces indicateurs à renseigner sur la présence d'autres micro-organismes potentiellement pathogènes suite à une contamination d'origine fécale (Zmirou *et al.*, 1990 ; Zmirou *et al.*, 2003 ; Wiedenmann *et al.*, 2006). Au moins pour partie, les indicateurs usuels permettent donc de statuer de manière pertinente sur la présence d'une contamination fécale significative notamment dans des eaux de surface et des zones de baignade.

Cependant cette fiabilité doit être nuancée, pour deux raisons :

- comme précédemment évoqué, il apparaît que les Entérocoques et les spores de *Clostridium* ne présentent qu'une spécificité relative. Du fait de ce manque de spécificité, les conclusions concernant la mise en évidence d'une contamination d'origine fécale ne doivent être portées que si des données sont disponibles pour plusieurs indicateurs et que ces dernières constituent un faisceau d'indices concordants.
- plusieurs études tendent à montrer que ce panel de bactéries n'est pas totalement représentatif de la totalité des microorganismes d'origine fécale potentiellement pathogènes. En particulier les indicateurs bactériens usuels ne semblent pas être prédictifs de la présence des virus entériques (Wait et Sobsey, 2001 ; Colford *et al.*, 2007). Pour cette raison d'autres microorganismes sont régulièrement évoqués pour remplacer et/ou compléter les marqueurs bactériens classiquement utilisés. Certains virus de bactéries (bactériophages) et les adénovirus sont ainsi proposés (Skraber, 2003) de même que certains parasites appartenant aux protozoaires (*Cryptosporidium* et *Giardia*).

Interprétation en termes de recherche de source de contamination fécale

Le dénombrement des indicateurs usuels de contamination fécale s'applique au niveau du genre (Entérocoque) ou de l'espèce (*E. coli*, *Clostridium perfringens*). Ce niveau de précision, ne permet *a priori* pas de distinguer l'origine d'une contamination car ces microorganismes sont aussi bien présents dans le tractus intestinal des hommes que dans celui des animaux.

Pour contourner ce problème, très tôt une première approche consistant à déterminer le rapport entre les coliformes totaux et les streptocoques fécaux a été évaluée. Cet outil a été proposé au début des années 1970 (Geldreich et Kenner, 1969) sur la base du constat que les fèces humaines seraient plus riches en coliformes thermotolérants que les fèces animales et qu'à l'inverse, les excréments animaux contiendraient plus de streptocoques fécaux que les selles humaines. Ainsi, dans les eaux de surface ou les rejets, un ratio supérieur à 4 serait significatif d'une contamination humaine tandis qu'un ratio inférieur ou égal à 0,7 traduirait une contamination non humaine. **Cette méthode qui présente l'avantage d'être très facilement mise en œuvre n'a cependant pas fournie satisfaction. En effet, les travaux français de Pourcher *et al.* (1991) ont montré l'incapacité de cet outil à identifier l'origine humaine ou animale d'une pollution.**

A noter, toujours au niveau français, que cette piste a fait l'objet de travaux complémentaires notamment grâce à des études réalisées sur des élevages de différentes natures : porcs, vaches, poules pondeuses et de chair (AESN, 1998 ; AESN, 1999). Il semble cependant que ces investigations complémentaires n'aient pas permis une meilleure interprétation du ratio entre Entérocoque et *E. coli*. Les différences importantes de survie qui interviennent dans le milieu naturel entre les différents genres bactériens constituent une source de biais important dans l'interprétation des ratios. Ainsi, l'évolution des proportions entre les Entérocoques et les *E. coli* évolue d'autant plus que l'on s'éloigne de la source d'excrétion.

Devant l'impossibilité de déterminer l'origine d'une contamination à partir des données classiquement disponibles, d'autres approches ont été développées selon deux axes qui sont d'une part l'adaptation de nouvelles méthodes d'interprétation applicables aux indicateurs usuels déjà en place, et d'autre part l'emploi d'indicateurs alternatifs associés à de nouvelles méthodes d'interprétation. Parmi ces nouveaux indicateurs se trouvent d'autres microorganismes mais également des traceurs de natures chimiques.

La description des nouvelles méthodes d'analyses est abordée dans la seconde partie du document tandis que les indicateurs alternatifs, sur lesquels peuvent s'appliquer les méthodes récemment développées, sont à présent abordés.

3.1.3. Notion d'indicateurs potentiels de contamination fécale

Dans un premier temps sont rapidement présentés les marqueurs physicochimiques qui ne font pas partie du champ de cette étude et dans un second temps sont décrits les microorganismes indicateurs utilisés en complément ou en remplacement des indicateurs classiques.

3.1.3.1. Les marqueurs physicochimiques

Ces marqueurs peuvent être recherchés dans les rejets selon trois catégories, ceux qui sont naturellement présents dans les selles (les stérols et stanols), ceux qui sont spécifiques du régime alimentaire et qui une fois ingérés sont partiellement métabolisés, la caféine en est l'exemple type mais de nombreuses substances pharmaceutiques sont également concernées (même si leur présence dans les effluents n'est pas systématique). La dernière catégorie concerne les molécules évacuées dans les rejets et qui sont caractéristiques d'activités humaines, il s'agit des constituants des composés lessiviels, des parfums, des retardateurs de flamme, ...). Les principaux marqueurs sont présentés ci-dessous :

☚ La caféine

Sa présence dans certains médicaments mais surtout dans de très nombreuses boissons strictement humaines, comme le café, le thé, les sodas, permet son utilisation pour identifier les contaminations d'origine humaine. Excrétées dans les urines, sa concentration dans les effluents domestiques varie entre 20 et 300 µg/L (Rogers *et al.*, 1986). En revanche sa concentration et sa persistance dans le milieu environnemental reste à vérifier (Scott *et al.*, 2002).

☚ Les stérols et les stanols

La nature et la concentration des stanols présents dans les selles peuvent être corrélées à l'alimentation des animaux et pourraient permettre par exemple de distinguer les excréments provenant d'animaux d'élevages ou de selles humaines ou bien encore de distinguer les excréments des bovins de celles des porcins. En effet, les configurations isomériques des stanols semblent caractéristiques et spécifiques des espèces animales (Marvin *et al.*, 2001 ; Blanch *et al.*, 2004).

Dans cette approche, certains stanols pourraient présenter un intérêt plus marqué (Scott *et al.*, 2002). Par exemple, le coprostanol qui est un composé formé pendant le catabolisme du cholestérol ne serait présent dans les fèces animales qu'à des niveaux au moins dix fois inférieurs à ceux observés dans les selles humaines. Par ailleurs, d'autres molécules proches du coprostanol pourraient également être des marqueurs efficaces pour identifier les pollutions dues par exemple aux herbivores (24-ethyl-coprostanol). De même, le rapport coprostanol sur épicooprostanol pourrait également être un critère discriminant (Gilpin *et al.*, 2002 ; Blanch *et al.*, 2004) ; en effet, tandis que dans l'intestin humain le cholestérol est métabolisé en coprostanol, il est au contraire métabolisé en épicooprostanol dans l'intestin des animaux.

☚ Autres composés proposés pour tracer les contaminations d'origine humaine

D'autres composés ont également été proposés pour mettre en évidence des rejets d'origine humaine, mais ces derniers semblent pour le moment moins étudiés ; il s'agit notamment des substances qui composent les produits lessiviels tels que les agents blanchissants, les détergents, le sodium tripolyphosphate, les Alkyl benzène linéaires. Les parfums (benzophenone), les retardateurs de flamme, pourraient également être utilisés (Scott *et al.*, 2002). Cette liste n'est pas exhaustive.

3.1.3.2. Les marqueurs microbiologiques alternatifs

En préambule, à la présentation des marqueurs microbiologiques alternatifs, il convient certainement d'apporter les éléments nécessaires à la compréhension des niveaux de distinction qui sont utilisés pour différencier les microorganismes dans les stratégies de recherche de sources de contamination fécale.

Du point de vue de la classification des microorganismes, rappelons qu'un genre bactérien regroupe différentes espèces et qu'à l'intérieur même de ces espèces de faibles différences peuvent exister en fonction d'éléments de pression sélective de l'environnement. C'est cette pression qui peut entraîner des variations phénotypiques ou génotypiques relativement limitées mais suffisantes pour distinguer une « souche » bactérienne d'une autre. La distinction de différentes souches peut en particulier être établie à partir de faibles différences observées dans des régions clés du génome des bactéries, ce qui amène à considérer la notion de génogroupe. Du point de vue de la hiérarchisation un résumé peut être schématisé comme suit :

Genres > espèces > souches / génogroupes.

Les principaux critères de sélection des marqueurs sont la sensibilité et la spécificité : le marqueur est-il excrété à des niveaux suffisants et persiste-t-il suffisamment pour être retrouvé dans l'environnement ? Sa présence constitue-t-elle une signature totalement caractéristique de tel ou tel hôte ?

Il apparaît justement que les microorganismes retenus dans les nouvelles approches méthodologiques développées ces dernières années, l'ont été pour leur capacité à se décliner soit en espèces soit en souches présentant des caractéristiques spécifiques de tel ou tel vecteur de contamination (Savichtcheva et Okabe, 2006). Les nouvelles méthodologies, s'appliquant à ces microorganismes, permettent de discerner des différences phénotypiques ou génotypiques qui révèlent la nature de l'hôte (Homme, ruminants, bovins, porcs, ...). Ces marqueurs sont décrits dans les paragraphes suivants à partir d'un regroupement réalisé sur la base de leur appartenance aux bactéries (anaérobies ou non), aux virus ou aux parasites protozoaires.

🚩 *Les bactéries non anaérobies strictes*

Parmi les bactéries autres que les anaérobies strictes, deux espèces peuvent être mentionnées, il s'agit de *Rhodococcus coprophilus* et de *Lactobacillus amylovorus*.

- *Rhodococcus coprophilus*

Cet microorganisme a été identifié à la fin des années 1970 et il a été décrit comme un germe essentiellement présent dans les fèces des herbivores. Du fait de son caractère aérobie, il est probable que ce germe soit plus persistant dans l'environnement que d'autres bactéries de la flore intestinale telles que *Bacteroides* et *Bifidobacterium*.

Cet actinomycète (nocardioforme) a finalement fait l'objet d'un nombre limité d'études. En effet avec des périodes d'incubation de 21 jours, les méthodes de culture de cette espèce se sont révélées particulièrement longues et difficiles (Mara et Oragui, 1983). Par ailleurs, les méthodes de biologie moléculaire ne paraissent pas avoir relancé l'étude de ce microorganisme. Ainsi, il semble qu'une seule publication ait abordé l'étude de ce microorganisme avec ces méthodologies (Savill et al., 2001).

Avant de pouvoir utiliser ce micro-organisme comme indicateur, sa spécificité ainsi que sa prévalence dans le tractus des animaux doivent être testées de manière plus approfondie.

- *Lactobacillus amylovorus*

Les *Lactobacillus* sont des bactéries anaérobies facultatives, Gram positif, non sporogènes. Quelques travaux faisant appel aux méthodes de biologie moléculaire sont à mentionner : Tynkynen et al., (1999) ainsi que Leser et al. (2002).

Des travaux français récents ont proposé que l'espèce *Lactobacillus amylovorus* soit considérée comme un marqueur des contaminations porcines (Marti et al., 2009).

Dans l'attente de capitaliser plus de recul, le potentiel de ce genre bactérien en tant qu'indicateur d'origine fécale reste à confirmer.

🚩 *Les bactéries anaérobies strictes*

Les bactéries anaérobies constituent une part importante de la flore fécale mais elles sont souvent difficiles à mettre en évidence par les méthodes de culture. C'est sans doute pour cette raison qu'aucune d'entre elles n'est présente parmi les indicateurs utilisés en routine. Leur caractère anaérobie présente pourtant certains avantages pour la recherche des sources de contamination fécale. Ainsi, d'une part elles sont incapables de se multiplier dans l'environnement et d'autre part leur survie est très limitée. Ces bactéries sont donc utiles pour témoigner de contaminations récentes.

Les évolutions des méthodes de détection et de dénombrement, en particulier l'apparition et le développement dans les laboratoires des méthodes de biologie moléculaire, ont redonné à ces bactéries toute leur légitimité en tant qu'indicateurs de contamination fécale. Deux genres de bactéries anaérobies strictes non sporulantes sont principalement ciblés dans les démarches de recherche de source de contamination fécale, il s'agit d'une part du genre *Bifidobacterium* et d'autre part du genre *Bacteroides*.

- *Bifidobacterium spp.*

Les bifidobactéries (genre *Bifidobacterium*) sont présentes en grand nombre dans l'intestin humain où elle constituerait le troisième genre bactérien le plus représenté (Bitton, 2005). Elles ont été proposées comme indicateur de contamination fécale dès le début des années 1980 (Resnick et Levin, 1981). Certaines souches sont particulièrement adaptées à la détermination des sources de contamination fécale.

En l'occurrence, les souches de *Bifidobacterium* capables de fermenter le sorbitol, ne sont que très rarement présentes dans l'intestin des animaux voire totalement absentes. Une méthode de culture permettant la croissance sélective des *Bifidobacterium* capables de fermenter le sorbitol (abrégiée SFB), a donc été développée. Elle s'appuie sur l'utilisation d'un milieu de culture spécifique et sélectif (HBSA pour Human Bifid Sorbitol Agar). A noter que ces dernières pourraient cependant être rarement détectées chez les porcs (Long *et al.*, 2005).

Depuis des méthodes de biologie moléculaire ont également été mis en œuvre (Bonjoch *et al.*, 2004). L'espèce *Bif. adolescentis* (BA) est notamment étudiée avec ces nouvelles méthodes (Lynch *et al.*, 2002 ; Bonjoch *et al.*, 2009) car il s'agirait d'une espèce dominante dans les fèces humaines (Matsuki *et al.*, 1999). De même l'espèce *Bif. dentium* serait également un marqueur pertinent des contaminations d'origine humaine (Nebra *et al.*, 2003). Pour ces deux dernières espèces, certains auteurs décrivent malgré tout leur présence dans une proportion limitée de fèces animales (Bonjoch *et al.*, 2004 ; Blanch *et al.*, 2006).

- *Bacteroides spp.*

Tout comme les bifidobactéries, les bactéries du genre *Bacteroides* sont présentes en grande quantité dans les selles. Des concentrations de 10^{10} bactéries par gramme de selle, soit environ 1/3 du nombre des bactéries fécales, sont avancées par certains auteurs (Bitton, 2005). Dans les fèces des animaux à sang chaud, les *Bacteroides* seraient ainsi en quantité nettement supérieure à celle des coliformes thermotolérants. Le genre *Bacteroides* comporte de nombreuses espèces mais toutes ne présentent pas le même intérêt pour identifier la source d'une contamination fécale. Les espèces de *Bacteroides* les plus représentées sont *B. fragilis*, *B. vulgatus*, *B. thetaomicron*, *B. ovatus* et *B. distasonis* (Fiksdal *et al.*, 1985).

Des méthodes de biologie moléculaire sont développées pour mettre en place des systèmes de PCR s'appuyant sur l'ADNr 16S des différentes espèces de *Bacteroides*. Ces systèmes seraient susceptibles de différencier l'origine de l'hôte (Layton *et al.*, 2006 ; Stricker *et al.*, 2008). Des difficultés d'interprétation semblent être mises en évidence pour certains de ces systèmes PCR (Mc Lain *et al.*, 2009). Les travaux en lien avec cette piste sont cependant actuellement très nombreux. Ainsi, de multiples équipes ont développé et testent des systèmes PCR ciblant ce genre bactérien, ou l'ordre des *Bacteroidales* ou encore le phylum des *Bacteroidetes* ; au moins 30 publications sur ce sujet ont été produites depuis le début de l'année 2009. Au niveau français, il est possible de citer l'équipe de M. GOURMELON (IFREMER) qui utilise des marqueurs *Bacteroidales* ciblant notamment les porcs (Miezkin *et al.*, 2009a) et les ruminants (Miezkin *et al.*, 2009b).

Du point de vue des méthodes qui ne font pas appel à la biologie moléculaire, l'espèce *B. fragilis* semble particulièrement adaptée pour mettre en évidence les sources de contamination. En effet, en s'appuyant sur la présence de phages spécifiques, certaines études (Tartera et Jofre, 1987 ; Puig *et al.*, 1999) ont mis en évidence que l'espèce *B. fragilis* comportait des souches présentes dans les selles d'une fraction de la population humaine (au moins 10%) et manifestement totalement absente des selles animales. Il s'agit des souches de *B. fragilis* HSP 40, RYC 2056 (Scott *et al.*, 2002). La présence de ces souches particulières ne semble pas avoir été expliquée cependant il s'agit actuellement des bactéries les plus utilisées dans les études visant à caractériser l'origine d'une contamination fécale, notamment en association avec les phages qui les infectent spécifiquement.

Les virus

o Les bactériophages

Les bactériophages peuvent être définis comme des virus de bactéries. L'infection d'une bactérie par un phage entraîne généralement sa lyse et par la même occasion la libération de nombreux bactériophages.

Au-delà de l'aspect strictement quantitatif, il existe une relation plus ou moins stricte d'hôte de telle sorte que le développement de bactériophages dans un milieu révèle indirectement la présence et la nature des bactéries hôtes qui ont permis leur multiplication. De nombreux phages infectant les bactéries naturellement présentes dans le tractus intestinal des animaux à sang chaud existent. Aussi, des stratégies utilisant les bactériophages et visant à mettre en évidence des espèces et des souches de bactéries indicatrices spécifiques ont été développées. Il peut s'agir de chercher à révéler des bactéries anaérobies comme *Bacteroides fragilis* ou des bactéries plus banales comme *E. coli*. Trois groupes de bactériophages pourraient présenter un intérêt en tant qu'indicateur de contamination fécale : les phages de *Bacteroides fragilis*, les coliphages somatiques, et les phages ARN f-spécifiques.

Au niveau français des études ont été menées pour évaluer la relation qui pourrait exister entre les concentrations des indicateurs bactériens usuels dans les eaux naturelles et les concentrations en bactériophages somatiques et ARN f spécifiques. L'étude de l'Agence de l'Eau Seine Normandie de 1997 en est un exemple (AESN, 1997).

- Les bactériophages de *Bacteroides fragilis*

Comme précédemment évoqué, les bactéries du genre *Bacteroides* sont proposées comme indicateur. Il existe des phages qui infectent spécifiquement les bactéries appartenant à ce genre, et ces derniers sont exploités pour faciliter la mise en évidence de ces bactéries difficilement cultivables.

Les phages de *Bacteroides fragilis* seraient les moins nombreux dans les eaux usées brutes (10^4 à 10^5 UFP/100mL – Puig *et al.*, 1999 ; Lucena *et al.*, 2003), mais seraient en revanche les plus résistants dans l'environnement (Duran *et al.*, 2002). Ils seraient par ailleurs incapables de se multiplier en dehors de leurs hôtes.

Comme évoqué précédemment, la souche *Bacteroides fragilis* HSP 40 serait absente des selles animales et par conséquent spécifique des selles humaines. Les phages infectant cette souche sont donc des marqueurs indirects beaucoup plus faciles à mettre en évidence que la souche elle-même. Ces phages, qui par ailleurs ne se multiplient pas dans l'environnement, sont par conséquent considérés comme hautement spécifiques des contaminations humaines. Leur utilisation en tant qu'indicateur pourrait cependant rester limitée d'une part parce que leur absence a déjà été constatée dans des eaux pourtant fortement polluées et d'autre part parce qu'ils ne seraient pas mis en évidence dans certaines zones géographiques notamment en Europe du Nord et aux USA (Puig *et al.*, 1999 ; Field et Samadpour, 2007 ; Ogorzaly, 2009).

La recherche des phages de *Bacteroides fragilis* de la souche RYC2056 permettrait de résoudre les difficultés rencontrées avec les phages de la souche *B. fragilis* HSP 40 mais ces derniers seraient beaucoup moins spécifiques des contaminations d'origine humaine (Araujo *et al.*, 2001 ; Skrabber, 2003). Leur intérêt en tant qu'indicateur de source de contamination fécale est donc limité.

Finalement, Payan *et al.*, (2005) ont isolé une 3^{ème} souche de *Bacteroides* dénommée *Bacteroides fragilis* BA17 (ou *B. thetaiotaomicron*). Cette dernière pourrait résoudre les problèmes rencontrés avec les phages détectés avec les des deux précédentes souches (Blanch *et al.*, 2006 ; Costan-Longares *et al.*, 2008).

- Les coliphages somatiques

Il s'agit des phages rencontrés en plus grand nombre au niveau des eaux usées avec des concentrations de l'ordre de 10^6 à 10^7 UFP/100mL (Lucena *et al.*, 2003 ; Lodder et de Roda Husman, 2005). Les coliphages somatiques sont des phages à ADN décrits comme de potentiels indicateurs de contamination fécale au début des années 1970 (Kott *et al.* 1974). Ils sont susceptibles d'infecter les bactéries de la famille des entérobactéries en particulier *E. coli*.

Il semble que les méthodes de détection classiquement utilisées ne permettent la mise en évidence que d'une faible partie de ces phages. Par ailleurs, une capacité de multiplication dans l'environnement est également suspectée (Havelaar *et al.*, 1993). Enfin il faut ajouter que la présence de coliphages somatiques dans un environnement est difficile à interpréter en termes d'origine de contamination fécale car ces phages semblent aussi bien présents dans les selles humaines que dans les selles animales (Havelaar *et al.*, 1993 ; Grabaw *et al.*, 1995). Pour ces différentes raisons, ils ne sont actuellement pas considérés comme les meilleurs phages indicateurs.

- Les bactériophages ARN f-spécifiques

Les phages ARN f-spécifiques infectent les bactéries qui possèdent des pilis sexuels. Ces phages ont été proposés comme indicateur de contamination fécale dans les eaux marines (Bitton, 2005). Ils sont relativement abondants dans les eaux usées. Les bactériophages ARN f-spécifiques infectent spécifiquement les bactéries Gram négatif possédant des pilis sexuels (*E. coli* ...). Ils sont présents de manière plus ou moins durable dans le tractus intestinal des hommes et des animaux et sont largement mis en évidence dans les eaux usées brutes (10^4 à 10^6 UFP/mL - Lodder et De Roda Husman, 2005 ; Mandilara *et al.*, 2006; Gourmelon *et al.*, 2007). Leur multiplication dans le milieu environnemental est très peu probable car la synthèse des pilis sexuels par les bactéries hôtes, n'intervient que pour des températures supérieures à 25°C (Woody et Cliver, 1995).

Ces bactériophages sont excrétés aussi bien dans les selles humaines que dans les selles animales. De plus au sein des populations de bactériophages il existe des différences de persistance du pouvoir infectieux qui rendent difficile l'interprétation des résultats obtenus par les méthodes de culture (Ogorzaly, 2009). De ce fait les méthodes de culture qui pourraient leur être associées ne peuvent être utilisées de manière fiable dans les démarches d'identification de source de contamination fécale.

Cependant les méthodes de biologie moléculaire ont radicalement relancé l'intérêt des bactériophages ARN f-spécifiques. En effet, quatre génogroupes différents ont été mis en évidence par Hsu *et al.*, (1995) et une relation a été établie entre la nature du génogroupe et la nature de l'hôte excréteur. Les génogroupes II et III seraient caractéristiques des contaminations d'origine humaine. Le génogroupe IV serait lui fortement lié aux contaminations d'origine animale. Le groupe I moins spécifique serait présent à la fois chez l'Homme et l'Animal.

Initialement la caractérisation du génogroupe était réalisée par des méthodes d'hybridation sur des membranes en nylon après obtention des plages de lyse sur des milieux de culture, mais à présent des méthodes de PCR quantitatives beaucoup moins lourdes ont été développées (Ogorzaly et Gantzer, 2006).

A l'heure actuelle, ces phages présentent un intérêt tout particulier dans les stratégies de recherche de source de contamination fécale (Schaper *et al.*, 2002 ; Ogorzaly *et al.*, 2009). Il est à noter que les principaux travaux concernant la mise en évidence des différents génogroupes de bactériophages ARN f-spécifiques par PCR quantitative ont été menés au niveau français (Ogorzaly et Gantzer, 2006).


o Les adénovirus

Les adénovirus humains appartiennent à la famille des Adenoviridae et au genre des Mastadenovirus. Il existe au moins 51 sérotypes^(*) d'adénovirus qui, sur la base de propriétés biologiques et sur la base de leur génome, sont répartis en 6 espèces notées de A à F. La plupart des sérotypes se multiplient au niveau du système digestif et sont donc excrétés dans les selles. L'espèce F revêt un intérêt particulier car elle abrite les sérotypes 40 et 41 responsables de diarrhées (éventuellement accompagnées de signes respiratoires) et dont le seul réservoir est l'Homme. Contrairement aux bactériophages, les adénovirus ne sont pas des microorganismes communs de la flore intestinale. L'excrétion de ces derniers est dépendante de la présence d'individus infectés.

Selon Blanch *et al.* (2004) qui s'appuient sur les quantités excrétées et le potentiel discriminant, les adénovirus humains pourraient avoir un intérêt en tant qu'indicateur de contamination fécale. De récents travaux laissent cependant supposer que des adénovirus infectant les animaux, pourraient également être utilisés comme marqueurs spécifiques, notamment en ce qui concerne la mise en évidence de contaminations de l'environnement par des fèces de porcs (Fong et Lipp, 2005 ; Hundesa *et al.*, 2006 ; Hundesa *et al.*, 2009).

Des éléments complémentaires doivent encore être produits mais les adénovirus apparaissent actuellement comme une piste crédible pour établir l'origine des contaminations fécales notamment lorsqu'ils sont employés en complément d'autres indicateurs.

* Sérotype : Subdivision taxonomique de bactéries ou de virus fondée sur les caractéristiques antigéniques de ces microorganismes. Le sérotype est défini à partir de la capacité d'une suspension de microorganismes à interagir en présence d'une suspension d'anticorps spécifiques.

 Les parasites

Les protozoaires *Cryptosporidium* et *Giardia* sont susceptibles d'infecter les hommes comme de nombreux autres animaux. Ces deux parasites présentent des espèces qui infectent spécifiquement différents hôtes. Comme pour les bactéries ou les virus à l'intérieur d'une même espèce des génogroupes spécifiques à telle ou telle espèce animale (Homme, bétail, chiens et chat, ...) ont été décrits. Pour *Cryptosporidium* au moins deux études dont une française décrivent des méthodes de biologie moléculaire afin de distinguer l'origine de sources de contamination fécale (Bonnin *et al.*, 1996 ; Awad-el-Kariem *et al.*, 1998). De même, pour *Giardia*, des travaux français ont été récemment menés pour évaluer le potentiel de ce microorganisme en tant que marqueur de l'origine de la contamination fécale (Bertrand *et al.*, 2005 ; Bertrand et Schwartzbrod, 2007). L'espèce *Giardia lamblia* serait l'espèce la plus susceptible de fournir des informations sur l'origine des contaminations fécales (Blanch *et al.*, 2004). Sept assemblages (ou génogroupes) ont été définis. Bertrand et Schwartzbrod (2007) observent que les assemblages A et B sont présents à la fois chez l'Homme et l'Animal tandis que de manière intéressante l'assemblage E apparaît comme très spécifique des animaux d'élevage.

L'utilisation des protozoaires peut s'avérer pertinente, notons néanmoins que ces derniers ne sont pas des microorganismes habituels de la flore intestinale et que par conséquent leur présence dans les rejets est conditionnée à une infestation d'au moins une partie des populations excrétales. Cependant, parmi le bétail et en particulier chez les jeunes animaux les taux d'infestation chronique sont relativement importants et les quantités excrétées par les animaux porteurs sont très élevées. Ces deux parasites pourraient donc être utilisés comme des indicateurs complémentaires.

3.1.3.3. Conclusions sur les indicateurs alternatifs

Les éléments discutés ci-dessus montrent qu'au-delà des indicateurs recherchés en routine (*E. coli*, Entérocoques, *clostridies*), de nombreux autres microorganismes présentent un intérêt pour l'identification des sources de contamination. En effet, la diversification des méthodes de caractérisation a permis d'élargir la notion d'indicateur à d'autres bactéries (notamment anaérobies), mais également aux virus et aux parasites. Cependant si le nombre d'indicateurs potentiels a effectivement été fortement augmenté, le niveau d'informations apporté par chacun est variable. Certains seraient totalement spécifiques des contaminations humaines, d'autres révèlent aussi bien des contaminations d'origines humaine ou animale.

Le Tableau 1 présenté ci-après propose une synthèse et une comparaison des différents indicateurs décrits précédemment. La comparaison porte sur la spécificité de l'indicateur c'est-à-dire sur la possibilité qu'il soit excrété uniquement par des hommes, ou uniquement par des animaux ou bien encore par les deux. La comparaison porte également, sur l'avancement méthodologique associé à chacun de ces indicateurs, cette notion se veut le reflet de la nature et de la quantité des travaux réalisés sur les différents indicateurs. En dernier point, l'intérêt de chacun des microorganismes pour les démarches d'identification des sources de contamination, est évalué sur la base de la spécificité et de l'avancement méthodologique. Même si les indications fournies sont basées sur l'analyse des principales revues du domaine, la synthèse réalisée dans le tableau 1, reste néanmoins une interprétation qui présente notre analyse de la problématique.

Selon nous, en se basant d'une part sur les données en lien avec la spécificité et d'autre part sur les travaux les plus actuels il nous semble que les bactéries du genre *Bacteroides* et les phages ARN f-spécifiques seraient les indicateurs ayant le plus d'intérêt. En effet, ces deux types de microorganismes présentent un intérêt particulier dans la mesure où des méthodes analytiques sensibles et simples (PCRq) permettent de distinguer des espèces ou des génogroupes soit spécifiques des populations humaines, soit spécifiques de populations animales. Par ailleurs, l'association d'un indicateur bactérien d'une part (les *Bacteroides*) et d'un indicateur viral d'autre part (les phages ARN f-spécifiques) pourrait présenter un avantage du fait d'une certaine complémentarité au niveau de la diversité des hôtes contaminés ou de la survie dans l'environnement.

Tableau 1 : Statut, spécificité et intérêt des principaux indicateurs de contamination fécale pour la recherche des sources de contamination.

	Microorganismes	Espèces, souches et génogroupes présentant un intérêt particulier	Statut		Spécificité		Données disponibles / avancement méthodologique	Intérêt pour l'identification des sources de contamination fécale
			Usuels	Alternatifs	Homme	Animal		
Bactéries	Coliformes thermotolérants	<i>Escherichia coli</i>	X		X	X	++	+/-
	Enterocoques	<i>Enterococcus spp</i>	X		X	X	++	+/-
		<i>Enterococcus faecalis</i>	X		X	(X)	+	+/-
		<i>Enterococcus faecium</i>	X		X	(X)	+	+/-
	Clostridies	<i>Clostridium spp</i>	X		X	X	+	+/-
		<i>Clostridium perfringens</i>	X		X	X	+	+/-
	Actinomycètes	<i>Rhodococcus coprophilus</i>		X		X	-	à vérifier
	Lactobacilles	<i>Lactobacillus amylovorus</i>		X		X	-	à vérifier
	<i>Bifidobacterium</i>	<i>Bifidobacterium spp</i>		X	X	X	++	+
		Souches fermentant le sorbitol (SFB)		X	X		++	+
<i>B. adolescentis</i>			X	X		+	+	
<i>B. dentium</i>			X	X		+	+	
<i>Bacteroides</i>	<i>Bacteroides spp</i>		X	X	X	++	++	
Virus	Bactériophages de <i>Bacteroides fragilis</i>	Phage de <i>Bacteroides fragilis</i> HSP 40		X	X		++	+/-
		Phage de <i>Bacteroides fragilis</i> RYC 2056		X	X	X	++	+/-
		Phage de <i>Bacteroides fragilis</i> BA17		X	X		++	+
	Coliphages somatiques	Coliphages somatiques		X	X	X	++	+/-
	Bactériophages ARN f-spécifiques	Génogroupe I		X	X	X	++	+/-
		Génogroupe II		X	X		++	++
		Génogroupe III		X	X		++	++
		Génogroupe IV		X		X	++	++
	Adénovirus	Adénovirus humains		X	X		+	+
Adénovirus animaux			X		X	+	à vérifier	
Parasites	Protozoaires	<i>Cryptosporidium</i>		X	X	X	+/-	+/-
		<i>Giardia</i> génogroupe A et B		X	X	X	+	à vérifier
		<i>Giardia</i> génogroupe E		X		X	+	à vérifier

3.2. La notion de recherche de sources de contamination fécale

Comme évoqué précédemment, afin de réduire le niveau de contamination fécale de manière durable dans le milieu récepteur de certains bassins versants, il convient d'identifier des sources de pollution plus ou moins variées et diffuses. De ce fait est apparue la notion de recherche de sources de contamination fécale qui consiste à interpréter la présence de divers indicateurs chimiques ou microbiologiques afin d'identifier, et si possible de quantifier, les principales sources de contamination. Cette démarche qui a recours à des outils phénotypiques, génotypiques et chimiques, a inspiré la notion de « Microbial Source Tracking » ou de « Recherche de sources de contamination fécale ».

Les méthodes de recherche de sources de contamination peuvent être divisées en deux groupes, d'une part celles qui font nécessairement appel à des bases de données ou « bibliothèques » et d'autre part celles qui en sont indépendantes. Dans le deuxième cas, les données produites sont directement utilisables sans qu'il y ait besoin au préalable d'obtenir et de collecter des résultats permettant d'interpréter les résultats à venir.

3.3. Les grands principes des méthodes utilisées

3.3.1. Les méthodes dépendantes d'une base de données

Les méthodes dépendantes d'une base de données ou « bibliothèque dépendante » impliquent une première étape de culture et consistent à obtenir un profil caractéristique de bactéries cibles dans l'échantillon. Une fois celui-ci obtenu il est confronté aux profils déjà existants obtenus avec des méthodologies identiques et collectés dans la base de données. La similarité entre le profil obtenu et un profil déjà existant caractéristique d'une pollution soit humaine soit animale, permet de conclure sur l'origine de la contamination qui affecte la ressource étudiée. La comparaison des profils peut être réalisée sur des comparaisons directes ou sur la base d'outils statistiques. Les différents profils de souches sont alors appelées sous-types, unité taxonomique opérationnelle, « Fingerprints », Les bibliothèques sont construites à partir des souches de microorganismes cibles isolées dans des échantillons de selles d'origines connues (humaine ou animale, bovins, cochons, chevaux, ...). Initialement les souches soumises à identification étaient elles-mêmes incluses dans la base de données pour l'enrichir (library self-cross). Cette méthode a été écartée afin de produire des bases de données plus représentatives. Par ailleurs les bases de données souffrent généralement de leur trop petite taille ce qui conduit à des difficultés d'interprétation. Aussi ces dernières années des méthodes indépendantes de bibliothèques ont été développées.

3.3.2. Les méthodes indépendantes d'une base de données

Les méthodes non dépendantes d'une base de données, font appel soit à des méthodes de culture, soit à des méthodes de biologie moléculaire (généralement des méthodes de PCR) visant des marqueurs spécifiques. Dans le cas des méthodes de culture, des espèces ou des souches de microorganismes (bactéries ou bactériophages) spécifiques d'hôtes sont recherchées sur des milieux de culture sélectifs. En ce qui concerne les méthodes de biologie moléculaire, l'essentiel des marqueurs utilisés sont issus des gènes codant pour l'ARNr 16S ou des gènes codant pour les toxines bactériennes « hôte spécifique ». Des marqueurs orientés sur le génome des virus humains ou des bactériophages sont également utilisés. L'interprétation des méthodes « bibliothèque indépendante » est facilitée dans la mesure où la conclusion sur l'origine de la contamination est déduite de la présence ou de l'absence du marqueur dans l'échantillon.

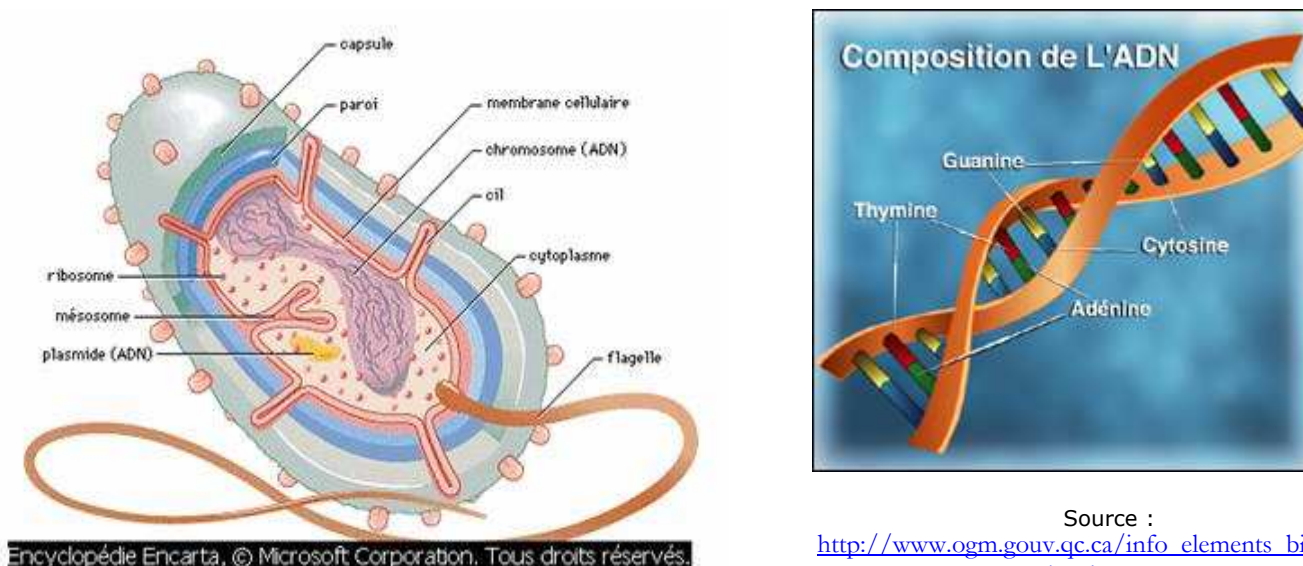
3.3.3. Rappels sur les méthodes de biologie moléculaire

Un bref rappel est proposé sur les principes de base des méthodes de biologie moléculaire utilisées dans les démarches de recherche de sources de contamination fécale.

3.3.3.1. La PCR conventionnelle

L'essentiel des microorganismes possède un génome sous forme d'ADN. Dans le cas des bactéries, l'ADN est sous la forme d'un chromosome circulaire ou sous la forme de structures circulaires indépendantes de petite taille nommées plasmides (Figure 1). L'ADN constitue le matériel génétique de la cellule, lequel peut être étudié par des méthodes dites de biologie moléculaire.

L'ADN est composé de quatre nucléotides que sont la Guanine, la Cytosine, la Thymine et l'Adénine ; ces quatre molécules s'imbriquent pour former une double hélice enroulée (Figure 1). L'ordre dans lequel sont associés les nucléotides constitue une séquence génétique qui est stable et fidèlement transmise d'une génération de microorganismes à une autre.



Source :
http://www.ogm.gouv.qc.ca/info_elements_bio.html

Figure 1 : Ultrastructure d'une bactérie et de l'ADN.

A partir d'une succession d'une vingtaine de nucléotides une séquence peut être spécifique d'une portion de génome d'un microorganisme, c'est-à-dire que cette succession précise de nucléotides ne sera retrouvée que dans le génome de ce microorganisme. Cette propriété est utilisée dans des méthodes de recherche et de dénombrement des microorganismes en particulier dans les méthodes de PCR.

Le principe de la PCR repose sur l'amplification d'une séquence génétique (ou séquence nucléotidique) choisie pour sa spécificité à un genre ou à une espèce de microorganismes. La séquence à amplifier est délimitée par le choix d'amorces (Figure 2). Chaque copie de la séquence ciblée est destinée à être reproduite au cours d'une réaction en chaîne. Ainsi, chaque copie de la séquence ciblée peut à son tour être copiée de sorte que le nombre de copies augmente de manière exponentielle (Figure 3). A l'issue d'une amplification par PCR, l'ADN amplifié peut être visualisé après marquage avec un composé fluorescent puis migration électrophorétique sur un gel de polymère (gel d'agarose par exemple). Sous exposition UV, l'ADN amplifié est visible sous forme de bandes fluorescentes (Figure 4).

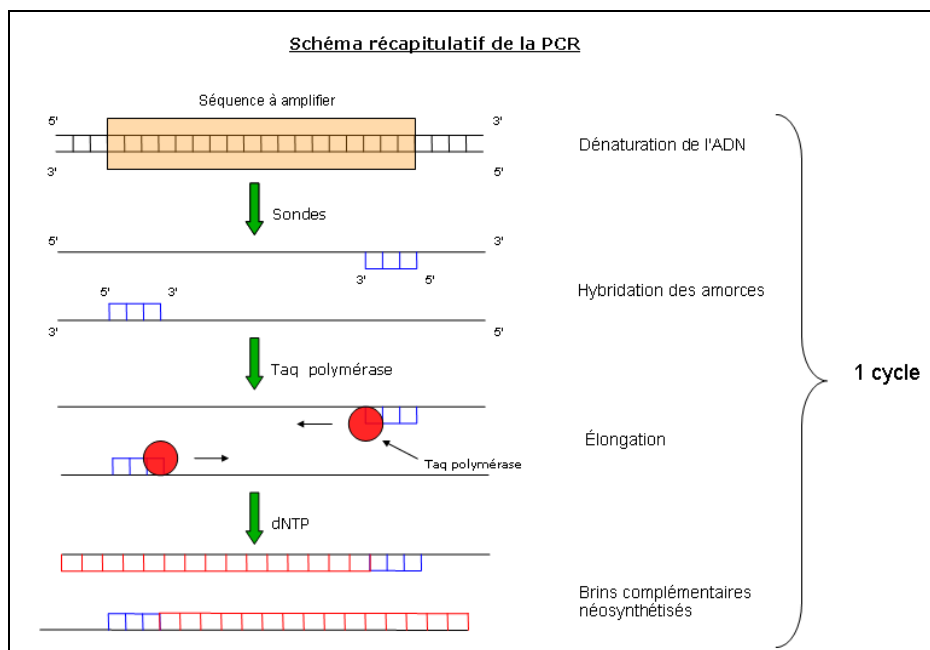


Figure 2 : Principe d'une PCR conventionnelle.
 (Source : <http://ev-lefevre.fr/images/techniques/pcr1.png>)

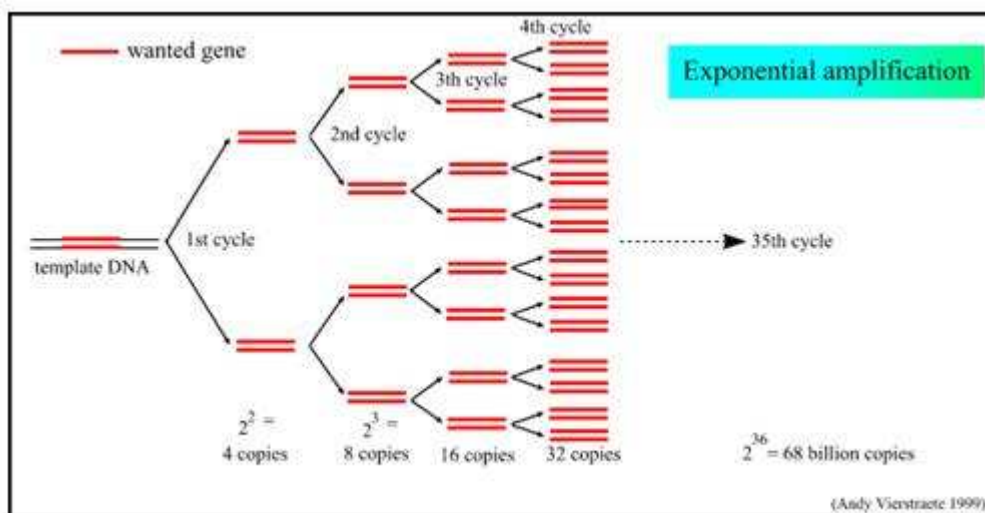


Figure 3 : Principe de réplication exponentielle de la PCR.
 (Source : http://www.htds.fr/sciences_vie/img/pcr.jpg)

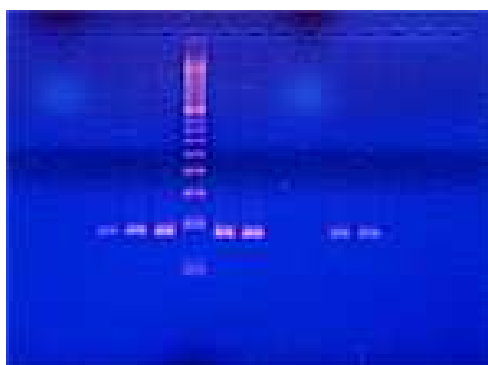


Figure 4 : Fragments d'ADN après migration électrophorétique et marquage (Observation sous U.V.).

3.3.3.2. La notion d'empreinte génétique

Au cours de la migration la taille du fragment d'ADN, c'est-à-dire le nombre de nucléotides qui le composent, définit la vitesse de migration et donc la distance de migration au niveau du gel. Des fragments d'ADN de différentes tailles migreront plus ou moins loin, de sorte que la migration d'un mélange de fragments d'ADN produit une association de bandes. Un mélange de fragments d'ADN peut être obtenu par l'amplification simultanée de différents fragments (cas des profils de rep-PCR), ou par le découpage d'un seul fragment amplifié au terme d'une PCR (cas des profils de restriction). Dans les deux cas, à l'issue de l'étape de migration, la position relative des différents fragments d'ADN constitue un profil également appelé empreinte génétique. L'empreinte génétique, vise à caractériser très finement une région caractéristique de l'ADN chez une espèce bactérienne par exemple. La Figure 5 ci-dessous présente un exemple d'empreintes génétiques obtenues après amplification de séquences répétitives (tirées de Dombek *et al*, 2000).

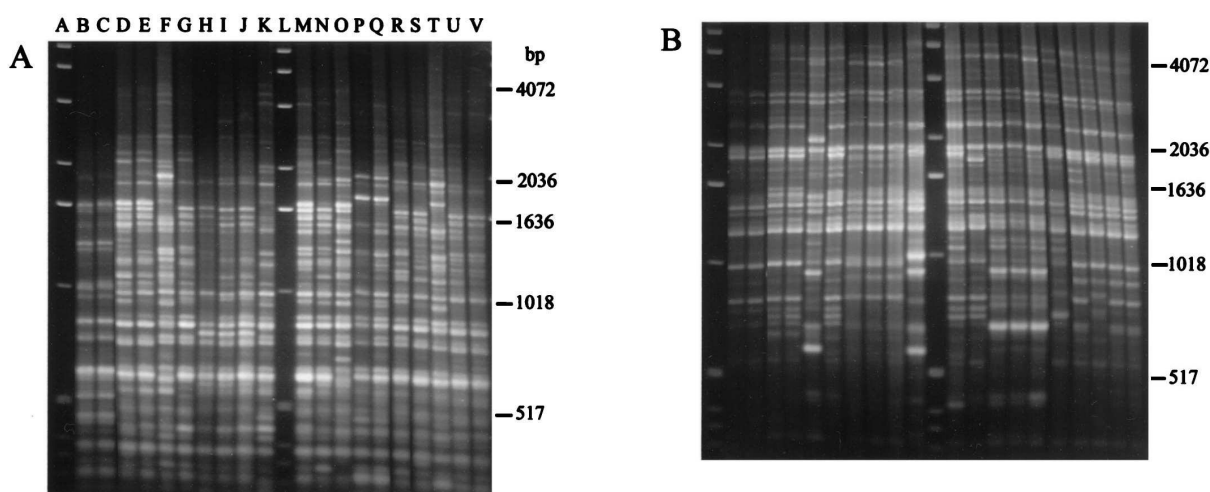


Figure 5: Profil d'empreintes génétiques obtenues après amplification de séquences d'ADN répétitives chez des souches de *E. coli* isolées de bétail.

3.3.3.3. La PCR quantitative

Au cours d'une PCR, la reproduction des séquences nucléotidiques est basée sur un mécanisme enzymatique contrôlé par une succession de cycle de température ; les thermocycleurs permettent d'automatiser le processus. De plus, plusieurs procédés permettent de relier un signal fluorescent dont l'intensité augmente au fur et à mesure que le nombre de copies synthétisées augmente. L'interprétation de ce signal fluorescent, en particulier l'observation du nombre de cycles PCR nécessaires à sa détection permet de réaliser une quantification du nombre de copies de la séquence génétique initialement présente dans un volume d'échantillon (Figure 6).

Les méthodes de PCR quantitative présentent l'avantage d'une visualisation de l'amplification en temps réel et sans qu'il y ait besoin d'avoir recours à une migration électrophorétique. Le simple suivi de la fluorescence dans le temps permet de vérifier la présence de la séquence d'ADN cible. Cette méthodologie est employée pour mettre en évidence des souches ou des génogroupes spécifiques à une catégorie d'hôte précise.

Cette méthode est très sensible et très spécifique, en revanche elle peut être partiellement ou totalement inhibée pas des composés présents dans les échantillons environnementaux. Pour être parfaitement quantitatif des contrôles de rendement d'extraction du génome ainsi que des contrôles d'inhibition doivent être pratiqués. Ces contrôles sont à présent courants dans les laboratoires qui pratiquent ces méthodes et doivent faire partie intégrante des analyses réalisées.

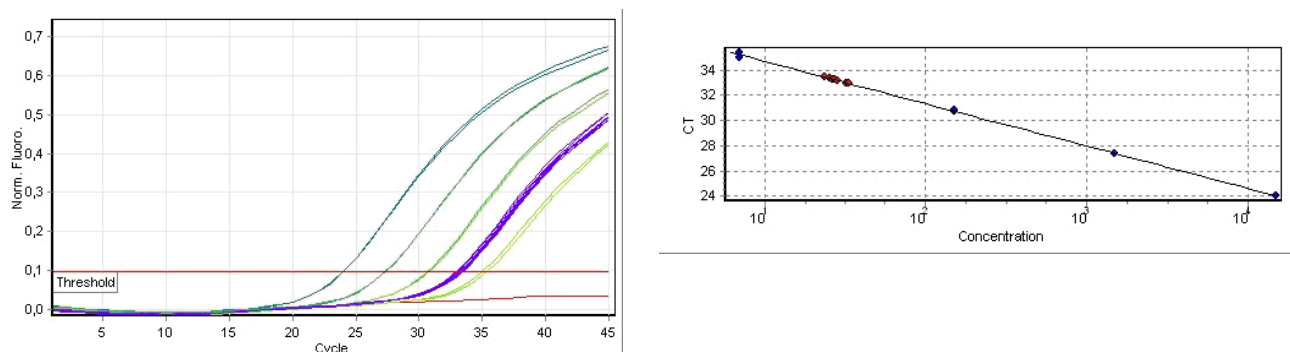


Figure 6 : Exemple de profil obtenu en PCR quantitative (à gauche : courbes d'amplification ; à droite : Gamme étalon permettant la quantification) / Source : Laboratoire IPL sed EST.

4. PRESENTATION DES METHODES SUSCEPTIBLES D'ETRE UTILISEES POUR LA RECHERCHE DES SOURCES DE CONTAMINATION FECALE

Après une brève description de leur principe et quelques éléments méthodologiques, les méthodes susceptibles d'être utilisées pour la recherche de contamination fécale sont discutées du point de vue de critères tels que leur fiabilité, leur niveau de développement actuel, leur coût, leur possibilité de mise en œuvre à grande échelle et la rapidité de réponse.

Les méthodes sont abordées successivement depuis les plus contraignantes, c'est-à-dire celles nécessitant obligatoirement une étape de culture et une base de données vers les moins contraignantes à savoir celles ne nécessitant ni culture ni base de données. Deux tableaux de synthèse (Tableau 2, Tableau 3) regroupant les informations essentielles sur chacune des méthodes sont disponibles en fin de partie.

4.1. Méthodes dépendant de la culture et d'une base de données

Un grand nombre de méthodes ayant recours à la culture sont dépendantes d'une base de données. Ces bases de données sont construites à partir d'isolats provenant directement d'hôtes connus ou de sources environnementales. L'utilisation d'échantillons fécaux directement prélevés au niveau de l'hôte a pour avantage de limiter les risques de contaminations extérieures. En revanche, l'utilisation d'échantillons environnementaux peut permettre d'obtenir une image plus précise de la flore survivant dans l'environnement.

Par ailleurs, la stabilité géographique et temporelle des bases de données reste sujet à controverse, la taille de la base de données nécessaire à une bonne identification des hôtes sources étant le facteur le plus discuté.

4.1.1. Méthodes phénotypiques

4.1.1.1. Résistance aux antibiotiques

Principe

L'étude des profils de résistance aux antibiotiques est une méthode d'identification des sources de contamination basée sur le fait que la pression sélective exercée par les antibiotiques sur les hôtes engendre des résistances aux antibiotiques spécifiques au niveau des communautés microbiennes des différents hôtes qui pourraient être utilisées pour identifier les sources de contamination fécale. Afin d'être pertinent, le choix des antibiotiques à cibler doit être effectué après avoir identifié les sources de contamination potentielles ainsi que leurs traitements. Enfin, les antibiotiques choisis doivent être adaptés à l'organisme cible utilisé. A titre d'exemple, *E. coli* étant

intrinsèquement résistante à la vancomycine, le suivi de cet antibiotique ne sera pas informatif avec ce type de micro-organisme.

Trois approches ont été utilisées jusqu'à présent : l'analyse des résistances aux antibiotiques (ARA), la résistance multiple aux antibiotiques (MAR) et la susceptibilité aux antibiotiques (Kirby-Bauer). Dans les études MAR, les bactéries sont testées pour leur résistance à plusieurs antibiotiques. Les études ARA diffèrent par l'utilisation de plusieurs concentrations pour chaque antibiotique. Les tests de Kirby-Bauer utilisent des disques en papier filtre imprégnés d'antibiotiques. La taille de la zone d'inhibition est utilisée pour quantifier la résistance aux antibiotiques.

Un problème potentiel lié à l'utilisation des profils de résistance aux antibiotiques pourrait provenir de la possibilité d'échange des gènes de résistance entre les bactéries dans l'environnement. En effet, les gènes de résistance sont souvent retrouvés sur des éléments génétiques mobiles (notamment les plasmides). Cependant, pour que ce phénomène affecte les proportions de cellules résistantes dans la population globale, il faudrait des taux de transfert très élevés ou une recroissance massive des micro-organismes dans l'environnement.

Bases méthodologiques

Pour les analyses ARA et MAR, la première étape consiste en l'établissement d'une base de données de profils de résistances aux antibiotiques (ARP) de bactéries indicatrices isolées de fèces ou d'effluents provenant d'hôtes connus. Les colonies sont isolées sur des milieux de culture spécifiques par étalement ou après filtration. Les isolats sont ensuite transférés sur des plaques 96 puits, puis repiqués sur une série de milieux de culture contenant des antibiotiques. Les isolats sont alors notés positifs ou négatifs en fonction de la croissance sur chaque milieu. Typiquement, un ARP consiste en une trentaine de points de données. Les ARPs de sources connues sont ensuite analysés par analyses de variance, qui permettent d'établir les règles de classification. La base de données est alors testée à l'aide d'ARP de sources connues.

Les tests de Kirby-Bauer sont réalisés selon le protocole NCCLS (National Committee for Clinical Laboratory Standards 1999). Pour cette méthode, des disques en papier filtre avec des concentrations connues d'antibiotiques sont placés dans des boîtes de Pétri inocuées à des concentrations élevées de la bactérie d'intérêt. L'antibiotique diffuse dans la gélose réalisant ainsi un gradient de concentration. La boîte est généralement incubée 24 h avant que ne soit mesurée la zone d'inhibition. La taille de la zone d'inhibition peut varier en fonction du milieu de culture, des conditions d'incubation et de la concentration en antibiotique. Ainsi, tous ces paramètres doivent être constants pour pouvoir comparer deux expériences.

Coût, temps de main d'œuvre et délai d'obtention des résultats

La première phase de cette méthode consiste en la constitution d'une base de données. Pour ce faire, les ARPs d'au moins une centaine d'isolats d'hôtes connus doivent être réalisés. Le temps nécessaire et le coût de mise en place de cette base de données est donc non négligeable. Pour être représentative, la base de données doit prendre en compte la variabilité temporelle de la population de l'organisme cible, ce qui implique une période de collecte s'étalant dans le temps (classiquement sur plusieurs mois). Cependant, une fois la bibliothèque construite, cette méthode est relativement rapide et peu coûteuse. Une fois les organismes cibles isolés (le temps nécessaire à l'isolement dépend de l'organisme cible et varie de 48 h à quelques jours), la détermination d'ARP nécessite 48 h à 5 jours selon la méthode utilisée. Le temps technique est relativement réduit dans la mesure où il s'agit uniquement d'inoculation et de lecture de boîtes. Le coût matériel est également relativement restreint, les consommables les plus coûteux étant les microplaques et les antibiotiques.

Niveau de développement actuel - Fiabilité

L'utilisation des ARPs en recherche de source de contamination fécale a pris son essor au début des années 80 (Krumperman, 1983). Cette méthode a dans un premier temps été utilisée afin de déterminer la prévalence des organismes multi-résistants dans différents milieux afin d'évaluer le risque potentiel en termes de pathogénicité. Au cours des années 90, la méthode a

évoluée suite à l'introduction d'analyses de variance de la base de données (Wiggins, 1996). Grâce à l'analyse statistique des bases de données, les ARPs ont pu être reliés à des hôtes ouvrant ainsi la voie à l'utilisation de cette méthode pour la recherche des sources de contamination fécale.

Cette méthode a été largement utilisée du fait de sa rapidité, de sa simplicité et de son faible coût. De plus, elle nécessite peu de qualification technique et pas d'équipement spécialisé. Elle est donc aisément transférable à grande échelle. Cependant, il n'existe pas à l'heure actuelle de normes concernant les tests de résistance aux antibiotiques (d'où une grande diversité de méthodes). Par ailleurs, la standardisation des tests ARPs est questionnable dans la mesure où les profils d'antibiotiques à utiliser vont dépendre du contexte de l'étude.

Sur un panel de quelques études, le taux de classification correct de la méthode est compris entre 62 et 84 % (Wiggins, 1996 ; Parveen *et al.*, 1997 ; Wiggins *et al.*, 1999 ; Hagedorn *et al.*, 1999 ; Harwood *et al.*, 2000). Lorsque les sources de contamination sont regroupées (ex : dinde et poulet dans le groupe volaille) le taux de classification correcte peut monter jusqu'à 98 % (Wiggins, 1996).

Possibilité d'utilisation à grande échelle

Un frein important à l'utilisation des ARPs réside dans la difficulté, voire l'impossibilité, de construire une base de données représentative. En effet, pour être représentative, cette base de données doit traduire la structure et la dynamique des populations d'organismes cibles des différents hôtes. Cependant, la variabilité naturelle des populations d'organismes cibles peut s'exprimer à différents niveaux : au sein de l'hôte (suite à des modifications de la pression en antibiotiques par exemple), au cours du temps ou encore selon la zone géographique. Une étude d'Anderson *et al.* (2006) avec pour organisme cible *E. coli* conclue que cette variabilité est telle que l'utilisation de cette méthode en MST est fortement compromise.

4.1.1.2. Profils d'utilisation du carbone

Principe

Le principe des profils d'utilisation du carbone (et de l'azote) est assez proche de celui des profils de résistance aux antibiotiques. En effet, cette méthode compare la capacité des isolats bactériens à utiliser un panel de sources carbonées et azotées. L'utilisation du substrat peut facilement être mise en évidence par la formation d'une coloration violette due à la réduction du tétrazolium mélangé au substrat. Les substrats sont disposés dans les puits d'une microplaque. La lecture peut se faire automatiquement à l'aide d'un lecteur de microplaques. Généralement, suite à une analyse de variance, seule une partie des substrats de la plaque (la partie la plus discriminante) est retenue pour l'analyse des profils (une trentaine pour Hagedorn *et al.*, 2003). Afin que cette méthode puisse être utilisée en MST, la constitution d'une base de données à partir d'isolats provenant d'hôtes connus est nécessaire.

Bases méthodologiques

Dans la mesure où des microplaques commerciales sont utilisées (Biolog - Hayward, CA) et PhenePlate (PhP plates, Stockholm, Sweden), très peu de préparation est nécessaire. Dans un premier temps les isolats sont cultivés et une suspension de cellules de turbidité standardisée est utilisée pour inoculer les plaques. Après 24 h d'incubation à 37°C, la présence ou l'absence de croissance dans les puits est déterminée manuellement ou automatiquement grâce à un lecteur de plaque (Microlog™ System, Biolog). Le même type de traitement que pour les ARPs est ensuite utilisé pour déterminer quelle combinaison de substrats permet la meilleure discrimination de l'hôte.

✚ Coût, temps de main d'œuvre et délai d'obtention des résultats

Le coût de cette méthode est relativement faible. Les dépenses les plus importantes en termes de consommables concernent les microplaques avec substrats (type Biolog et Pheneplate). Le temps technique nécessaire est également restreint (isolement des souches, inoculation des plaques et lecture (éventuellement automatisée) des microplaques. Le délai d'obtention des résultats dépend du type d'organisme cible (généralement *E. coli*). 4 à 5 jours sont généralement nécessaires pour l'isolement des souches. Une fois les microplaques inocuées 24 h d'incubation sont nécessaires. La lecture des microplaques se fait de manière quasiment instantanée grâce aux lecteurs de microplaques. Le délai total d'obtention des résultats est donc de l'ordre d'une semaine.

✚ Niveau de développement actuel - Fiabilité

Cette méthode a été testée uniquement à petite échelle. Les pourcentages d'identifications correctes sont généralement de l'ordre de 90 %. A titre d'exemple, Hagedorn *et al.* (2003) rapportent un taux d'identification correcte de 92,7 % pour une classification humain vs non-humain et de 81,9 % pour une classification humain vs animaux d'élevage vs animaux sauvages vs animaux domestiques. Cependant, des proportions importantes de faux-positifs peuvent être enregistrées (jusqu'à 50 %) (Harwood *et al.*, 2003).

✚ Possibilité d'utilisation à grande échelle

Cette méthode a été développée pour ses atouts en termes de rapidité, de facilité de mise en œuvre (probablement la méthode demandant le moins de compétences techniques) et de faibles qualifications techniques nécessaires. Elle a été mise en œuvre avec succès pour l'identification d'isolats cliniques de bactéries Gram-négatives. Son utilisation pour des échantillons environnementaux reste controversée pour des problèmes de reproductibilité. L'utilisation de microplaques commerciales de type Biolog (Hayward, CA) et PhenePlate (PhP plates, Stockholm, Sweden) rend la mise en œuvre de cette méthode relativement aisée.

4.1.2. Méthodes génotypiques

Les méthodes génotypiques nécessitant une base de données peuvent être réparties en deux catégories : celles analysant directement le génome et celle l'analysant indirectement après PCR. La sensibilité de la PCR, la rapidité et la possibilité d'amplifier une séquence dans un rapport de 10^6 en font une technique attractive qui est utilisée dans beaucoup de nouvelles méthodes de recherche des sources de contamination. Généralement, les méthodes utilisant la PCR sont plus rapides que celles travaillant directement sur le génome. L'utilisation des méthodes génotypiques nécessite au minimum un personnel avec des connaissances de base en biologie moléculaire et un laboratoire avec un équipement dédié.

4.1.2.1. Analyse des séquences d'ADN répétitives (rep-PCR DNA fingerprinting)

✚ Principe

Des séquences d'ADN répétées et conservées existent naturellement chez la plupart des micro-organismes. La rep-PCR utilise la PCR et des amorces spécifiques complémentaires de ces régions pour amplifier ces parties du génome microbien qui sont ensuite visualisées après électrophorèse. De nombreux types de séquences répétées existent ; les trois plus utilisées pour la rep-PCR sont les REP (Repetitive Extragenic Palindromes), les ERIC (Enterobacterial Repetitive Intragenic Consensus) et les Box. L'utilisation d'amorces spécifiques conduit à l'amplification de portions de génomes localisées entre deux portions répétitives adjacentes. Le mélange d'ADN résultant est ensuite séparé sur gel d'agarose, produisant un profil de bandes qui sert d'empreinte pour l'identification des souches et l'analyse des populations. Les bactéries possédant la même empreinte sont considérées comme appartenant à la même souche, celles ayant un profil proche sont considérées comme génétiquement apparentées.

🚩 Bases méthodologiques

La rep-PCR est utilisable avec des échantillons d'ADN produits à partir d'un grand nombre de méthodes incluant les cultures liquides et solides et l'ADN purifié. Parmi les amorces utilisées pour la rep-PCR, l'amorce Box A1R s'est révélée être la plus utile pour discerner les isolats environnementaux d'*E. coli* (Dombek *et al.*, 2000 ; Johnson *et al.*, 2004). Il existe deux grandes façons de réaliser une rep-PCR. La méthode conventionnelle consiste à visualiser les fragments d'ADN après marquage au bromure d'éthidium. Cependant, à cause de problèmes de distorsion, la lecture des gels est souvent difficile. Pour résoudre ces problèmes, une seconde méthode a été développée : la HFERP (Horizontal Fluorophore-Enhanced Rep-PCR).

🚩 Coût, temps de main d'œuvre et délai d'obtention des résultats

L'utilisation de cette méthode nécessite la création d'une base de données. Selon les études, la taille de cette base de données varie de façon importante : d'une centaine à plusieurs milliers de souches. Ce critère va influencer de façon non négligeable sur le taux de classification correcte. Une fois la base de données créée, le processus total de classification d'un échantillon prend *a minima* 7 jours (mise en culture de l'échantillon, isolement des souches, PCR, électrophorèse sur gel et interprétation). Comparativement aux autres méthodes génotypiques le temps technique nécessaire est relativement faible (mise en culture, PCR, préparation de l'électrophorèse et interprétation). En revanche, cette technique requiert l'utilisation pendant une vingtaine d'heures d'un appareil d'électrophorèse. Il est cependant à noter que dans certaines études, ce temps est limité à 4 h (Carson *et al.*, 2003).

🚩 Niveau de développement actuel – Fiabilité

Cette méthode a été largement utilisée du fait de sa rapidité et de sa relative simplicité. Parmi les méthodes de génotypage, cette méthode est la moins coûteuse et celle qui nécessite le moins d'expertise technique. Dans les études où cette méthode a été comparée à d'autres méthodes, elle s'est avérée permettre une meilleure prédiction que le ribotypage (Carson *et al.*, 2003) et que l'ISR-PCR (Intergenic Spacer Region). Des taux de classification correcte compris entre 90 et 100 % sont généralement rapportés (Dombek *et al.*, 2000). Il n'existe à notre connaissance pas de données concernant le taux de faux positifs résultant de l'utilisation de cette méthode.

🚩 Possibilité d'utilisation à grande échelle

Cette outil est relativement simple à mettre en œuvre. Seules des techniques de base de la biologie moléculaire sont utilisées. Cependant, l'utilisation d'un appareil d'électrophorèse durant une vingtaine d'heures pour chaque échantillon rend difficile le traitement rapide d'un grand nombre d'échantillons.

4.1.2.2. Analyse d'ADN polymorphique aléatoirement amplifié (RAPD)

🚩 Principe

La RAPD et l'AP-PCR (Arbitrary Primed PCR) sont deux méthodes développées indépendamment mais proches conceptuellement. Elles reposent sur le fait qu'une PCR réalisée avec des amorces à faible spécificité (AP-PCR) ou avec des amorces non-sélectives mais à haute spécificité (RAPD) produisent une série de produits PCR dépendant de l'extrait d'ADN et des amorces. Une fois marqués au bromure d'éthidium et séparés sur gel d'agarose, ces produits PCR produisent une série de bandes spécifiques de la souche ou de l'espèce.

Bases méthodologiques

Bien que ces deux méthodes diffèrent dans leur mise en œuvre, l'AP-PCR et la RAPD sont quelques fois utilisées comme synonymes. Pour l'AP-PCR, une ou quelques fois deux amorces sont utilisées dans des conditions peu spécifiques, conduisant à quelques erreurs d'amorçage. En revanche, la RAPD se déroule dans des conditions très spécifiques mais avec des amorces peu sélectives conduisant à moins d'erreurs d'amorçage. Classiquement, la RAPD est réalisée avec des ensembles de 10 amorces. Ces ensembles d'amorces sont disponibles commercialement.

Coût, temps de main d'œuvre et délai d'obtention des résultats

Les analyses RAPD sont relativement peu coûteuses en comparaison du ribotypage et de la PFGE (Pulse Field Gel Electrophoresis) et ne nécessitent pas de connaissance préalable du génome. Elle nécessite une main d'œuvre limitée. Une fois les isolats obtenus, le résultat peut être rendu en une journée.

Niveau de développement actuel – Fiabilité

Les analyses RAPD ont été largement utilisées pour déterminer la diversité génétique d'*E. coli* isolées d'animaux ou d'humains. En revanche, très peu de données sont disponibles quant à son utilisation en MST. Une étude de 2003 (Ting *et al.*, 2003) rapporte que cette méthode pourrait être utilisée pour déterminer l'origine humaine / animale lors de contaminations à *E. coli*. Cette méthode n'a donc fait l'objet que de tests préliminaires pour son utilisation dans la détermination des sources de contamination microbiologiques. Par ailleurs, une grande variabilité inter-laboratoires a été rapportée.

Possibilité d'utilisation à grande échelle

La disponibilité de kits d'amorces commerciaux permet une mise en œuvre relativement aisée. Comme précédemment évoqué, le manque de reproductibilité entre laboratoire limite cependant une utilisation à grande échelle (EPA, 2005) ; en effet, pour un même échantillon traité dans deux laboratoires, les profils obtenus peuvent être différents car la méthode est sensible à de nombreux paramètres analytiques (nature du tampon utilisé, amorces choisies, mode de préparation de l'ADN, ...). Ces difficultés de reproductibilité doivent être résolues avant que la méthode ne puisse être banalisée dans les méthodes de diagnostic.

4.1.2.3. Analyse du polymorphisme de longueur de fragments amplifiés (AFLP)

Principe

L'AFLP utilise une combinaison de digestion de l'ADN génomique par des enzymes de restriction et de PCR. Suite à la digestion enzymatique, de courts adaptateurs sont reliés à la fin des fragments d'ADN digérés afin de leur donner suffisamment de longueur pour leur utilisation en PCR. L'amplification par PCR de la totalité des fragments digérés conduirait à un grand nombre de produits qui serait trop difficile à résoudre. Pour surmonter ce problème, des amorces PCR supplémentaires sont ajoutées. Ces amorces diffèrent des amorces initiales par l'ajout de 1 à 3 nucléotides résultant ainsi en l'amplification d'un sous-groupe des fragments initiaux. L'augmentation du nombre de nucléotides accroît la spécificité des amorces et par conséquent diminue le nombre de produits PCR. Dans la plupart des cas, 3 groupes d'amorces sont nécessaires afin d'obtenir une résolution suffisante pour discriminer des isolats.

✚ Bases méthodologiques

Les isolats sont analysés à l'aide de kits commerciaux selon les instructions du fabricant. La première étape consiste en une extraction de l'ADN à l'aide d'une méthode classique. L'ADN purifié est ensuite digéré par deux enzymes de restriction : une « frequently cutting », MseI et une « less frequently cutting », EcoRI. Les fragments sont ensuite liés à des adaptateurs EcoRI et MseI pour générer un ADN adapté à l'amplification PCR. Le mélange obtenu est ensuite dilué puis amplifié à l'aide d'amorces EcoRI et MseI (amplification pré-sélective). L'amplification sélective est ensuite réalisée grâce à des amorces sur lesquelles sont ajoutées des séquences arbitraires de 1 à 3 nucléotides. Les amorces utilisées sont associées à des marqueurs fluorescents permettant ainsi la détection des différents produits au moyen d'un séquenceur automatique. Les informations récupérées par le séquenceur sont ensuite analysées sur la base de la présence ou de l'absence de bandes dans chaque profil.

✚ Coût, temps de main d'œuvre et délai d'obtention des résultats

Le coût de cette méthode résulte à la fois du temps de main d'œuvre nécessaire ainsi que du prix des consommables. En effet, il faut compter 4 à 5 jours pour obtenir un résultat. Le temps technique nécessaire est de plusieurs heures par série d'échantillons. De plus, les réactifs d'AFLP ont un coût relativement élevé.

✚ Niveau de développement actuel – Fiabilité

La plupart des études utilisant l'AFLP sont orientées vers l'épidémiologie et non vers la détermination de l'origine des contaminations microbiologiques. Cependant, les quelques études réalisées suggèrent que la résolution de cette méthode est au moins aussi bonne que celle des autres méthodes génotypiques. Leung et al. (2004) rapportent des taux d'identification correcte supérieurs à 90 % pour les catégories « Humain », « Bovin » et « Porcin ». Par ailleurs, il semblerait qu'une base de données de relativement petite taille soit suffisante pour obtenir une bonne discrimination (une centaine d'isolats) avec *E. coli*. A notre connaissance, il n'existe pas de données concernant le pouvoir prédictif de cette méthode ou encore le taux de faux positifs.

De plus, davantage d'études sont nécessaires pour déterminer les meilleurs groupes d'amorces à utiliser pour la MST. En effet, actuellement, il n'existe pas de groupe d'amorces conçus pour la détermination de l'origine des contaminations microbiologiques.

✚ Possibilité d'utilisation à grande échelle

Avant d'utiliser cette technique, l'expertise et le temps nécessaires ainsi que le coût doivent être mis en balance avec la précision souhaitée. Etant donné la complexité technique de cette méthode et le temps de main d'œuvre nécessaire, cet outil semble difficilement utilisable à grande échelle à court terme. Son emploi peut être envisagé pour des études de cas spécifiques.

4.1.2.4. Electrophorèse sur gel en champ pulsé (PFGE)

✚ Principe

La PFGE (Pulse Field Gel Electrophoresis) est la méthode de génotypage la plus couramment utilisée dans les études d'épidémiologie. Dans cette méthode, le génome microbien est directement analysé sans avoir recours à une PCR : l'ADN génomique est digéré à l'aide d'enzymes possédant des sites de restriction peu communs. Cette digestion conduit à la production de 10 à 30 grands fragments. Ces fragments sont trop grands pour être séparés par des électrophorèses classiques, la taille des pores limitant leur migration. Pour surmonter cette limitation, l'orientation du champ électrique est modifiée à différents intervalles de temps permettant aux grandes molécules de se réorienter et de se faufiler à travers les pores. La taille des fragments est déterminée par comparaison avec des molécules de taille connue.

Bases méthodologiques

Cette méthode peut être utilisée sur n'importe quelle bactérie, sous réserve que les conditions d'extraction de l'ADN soient optimisées. Les isolats sont cultivés dans des conditions standards, puis l'ADN est extrait sur des gels d'agarose afin de minimiser les coupures indésirables. Les cellules sont centrifugées puis suspendues dans de l'agarose fondue (suffisamment de biomasse pour obtenir 1 µg d'ADN est nécessaire). Une fois l'agarose solidifié, une série de traitements est appliquée afin de détruire les cellules, d'éliminer les protéines et l'ARN. Cette série de traitement peut prendre de quelques heures à deux jours. L'ADN purifié, toujours inclus dans le gel d'agarose est ensuite digéré à l'aide d'enzymes possédant des sites de restriction rares (généralement XbaI). Une électrophorèse d'une trentaine d'heures est ensuite réalisée, puis le gel est marqué au bromure d'éthidium. Il est souvent nécessaire de dissiper le marquage pendant plusieurs heures afin d'optimiser le contraste des bandes. Les données obtenues sont binaires, basées sur la présence ou l'absence de bandes dans chaque profil.

Coût, temps de main d'œuvre et délai d'obtention des résultats

Bien que cette méthode exige un équipement important, l'opérateur n'a besoin que de connaissances limitées en biologie moléculaire.

Niveau de développement actuel – Fiabilité

Le nombre d'études de MST utilisant la PFGE est très limité. Dans une étude sur une plage, la PFGE sur *E. coli* s'est révélée plus discriminante qu'avec les autres coliformes. Dans les quelques études réalisées, la PFGE s'est avérée aussi discriminante que l'AFLP et légèrement plus discriminante que la rep-PCR (McLellan *et al.*, 2003). Cependant, une haute résolution des profils n'est pas toujours un avantage dans la mesure où cela conduit à la nécessité d'une base de données plus importante.

Possibilité d'utilisation à grande échelle

Cette méthode est laborieuse et consommatrice en temps et peut, par conséquent s'avérer inadéquate pour l'identification d'un grand nombre de souches. Il n'existe pas de méthode standardisée pour l'utilisation de la PFGE en MST.

4.1.2.5. Ribotypage

Principe

Le ribotypage est une version de la méthode RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) qui a été largement utilisée pour le typage d'une grande variété de bactéries à Gram-négatif et à Gram-positif. Comme la PFGE, cette méthode n'utilise pas la PCR à l'exception des sondes marquées d'ADNr. Les profils de RFLP classiques contiennent trop de bandes pour être analysés facilement. Le ribotypage utilise l'hybridation sélective d'un petit nombre de fragments pour permettre l'identification des souches. Cette méthode est basée sur la détection de différences génétiques à l'intérieur ou à proximité des gènes codant pour l'ARNr 16S et 23S. L'hybridation de l'ADN digéré avec des sondes ADNr marquées produit une échelle de fragments (5 à 15 fragments pour *E. coli*) dont l'analyse peut être automatisée. Si un pouvoir discriminant supérieur est nécessaire plusieurs enzymes de restriction peuvent être utilisées pour digérer l'ADN, conduisant à des profils composés.

Bases méthodologiques

Le ribotypage est une méthode qui se déroule en plusieurs étapes : une digestion de l'ADN génomique par une ou plusieurs enzymes de restriction, la séparation des fragments par électrophorèse sur gel, l'immobilisation des fragments d'ADN sur une matrice solide par Southern transfer et l'hybridation à l'aide de sondes marquées. Pour les études de MST, les enzymes de restriction généralement utilisées sont EcoRI, PvuII et Hind III. Cependant, il semblerait que l'utilisation combinée de 2 enzymes améliore le pouvoir de discrimination de cette méthode. Les sondes utilisées correspondent classiquement à l'opéron *rrnB rRNA* d'*E. coli* marqué par du ³²P ou par des marqueurs chimio-luminescents. Les profils sont ensuite détectés par autoradiographie ou par la formation de couleur.

Coût, temps de main d'œuvre et délai d'obtention des résultats

Le ribotypage est une technique exigeante nécessitant plusieurs étapes ainsi que de l'équipement spécifique. De plus, la nécessité d'une main d'œuvre spécialisée, le coût important des réactifs et le temps nécessaire sont des freins importants à l'utilisation de cette méthode. Cependant, le récent développement d'un appareil de ribotypage automatique (Dupont-Qualicon, Wilmington, Delaware) est à l'origine d'une recrudescence de l'intérêt portée à cette méthode pour les études aussi bien épidémiologiques que de MST. Toutefois, il semblerait que cet appareil ne soit pas aussi fiable que les analyses manuelles et le coût des analyses reste élevé.

Niveau de développement actuel – Fiabilité

Le ribotypage a été largement utilisé pour les études de MST. La comparaison entre les études réalisées reste cependant difficile dans la mesure où les protocoles utilisés sont rarement strictement les mêmes. Ces études rapportent des résultats variables quant à la capacité de cette méthode de discriminer entre les différentes sources de contamination. De plus, la taille de la base de données, la distribution géographique des isolats bactériens et la présence de répliquats modifient la capacité du ribotypage à différencier les hôtes-sources.

Possibilité d'utilisation à grande échelle

Du fait de sa complexité technique, cette méthode semble difficile à mettre en œuvre à grande échelle. Toutefois, elle conserve un intérêt en termes de recherche pour l'étude de cas spécifiques.

4.2. Méthodes dépendant de la culture / sans base de données

Lorsque les organismes cibles sont en faible quantité, il est nécessaire dans un premier temps d'avoir recours à un enrichissement de l'échantillon dans des conditions favorisant le développement de l'organisme cible. Les méthodes présentées dans ce paragraphe sont basées sur la présence ou l'absence d'organismes ou de gènes cibles et sont par conséquent indépendantes d'une base de données.

4.2.1. Typage des bactériophages ARN f-spécifiques

Principe

Les bactériophages ARN f-spécifiques peuvent être utilisés pour distinguer des sources de contaminations humaines et animales grâce au typage des isolats dans 4 sous-groupes. En effet, des études ont mis en évidence que le groupe IV correspondrait généralement à des fèces animales tandis que les groupes II et III sont généralement associés à des effluents humains, le groupe I étant moins spécifique (Hsu *et al.*, 1995). Cependant, bien que ces associations soient statistiquement significatives des exceptions peuvent exister (Schaper *et al.*, 2002). Deux méthodes de classification existent : le sérotypage ou le génotypage peuvent être utilisés pour le typage des bactériophages ARN f-spécifiques. Pour le sérotypage, des antisérums spécifiques de chaque groupe sont utilisés tandis que pour le génotypage, l'hybridation avec des groupes d'oligonucléotides spécifiques est employée.

Bases méthodologiques

Les virus isolés sont incubés en présence de RNase afin de permettre la distinction entre les bactériophages ARN f-spécifiques et les bactériophages ADN f-spécifiques. Après isolement, les virus sont soit génotypés, soit sérotypés. Pour le sérotypage, l'infectiosité des virus est testée en présence d'antisérums groupes-spécifiques. L'inhibition de l'infectiosité d'un coliphage en présence d'un antisérum permet d'identifier à quel groupe il appartient. Pour le génotypage, des sondes spécifiques pour chaque groupe sont utilisées. L'extraction des acides nucléiques n'est pas nécessaire et les plaques peuvent être utilisées directement pour l'hybridation.

Coût, temps de main d'œuvre et délai d'obtention des résultats

Les méthodes de culture des bactériophages sont simples et peu coûteuses mais nécessitent une étape de culture longue. Des méthodes moléculaires ont été développées afin de permettre une caractérisation plus rapide des bactériophages (notamment, la RT-PCR). De plus, l'étude de phages est peu développée et de nouveaux sous-groupes permettant une meilleure identification des hôtes devraient pouvoir être identifiés.

Niveau de développement actuel – Fiabilité

L'exploitation des cultures de bactériophages ARN-f spécifiques est indépendante d'une base de données mais ne permet à l'heure actuelle que de distinguer grossièrement entre les contaminations animales et humaines. La quantification des sources de contamination peut s'avérer problématique dans la mesure où la survie des différents sous-groupes dans l'environnement et notamment dans les milieux hydriques, n'est pas identique.

Possibilité d'utilisation à grande échelle

Cette méthode étant relativement simple et ne nécessitant pas de matériel coûteux, sa mise en œuvre à grande échelle est *a priori* envisageable. De plus, les laboratoires français sont au premier plan au niveau du développement de cette technique ce qui permettrait un transfert de compétence relativement aisé. Toutefois, le développement de méthodes de RT-PCR permettant de s'affranchir de l'étape de culture et améliorant la sensibilité de détection des bactériophages tend à rendre cette méthode obsolète en l'état. La méthode utilisant la RT-PCR est quant à elle parmi les plus prometteuses est fait l'objet d'un paragraphe dans la partie suivante (4.3.3).

4.2.2. PCR gène-spécifique

Principe

Cette méthode est basée sur le fait que certains gènes d'entérotoxines retrouvés chez des *E. coli* entérotoxiques sont fortement spécifiques des espèces infectées. A titre d'exemple, les gènes STIb, LTIIa et STII sont respectivement spécifiques d'une origine humaine, bovine et porcine (Chern *et al.*, 2004 ; Khatib *et al.*, 2003). Des biomarqueurs ont également été identifiés pour les oiseaux, les chiens et les lapins (Jiang *et al.*, 2007). Sur le même principe, des gènes de virulence des Entérocoques ont été utilisés comme marqueurs d'hôtes spécifiques (Scott *et al.*, 2005).

Bases méthodologiques

Après isolement des colonies d'intérêt (*i.e.* *E. coli* ou entérocoques), l'ADN est extrait par une méthode classique. Consécutivement à l'extraction de l'ADN, les échantillons sont généralement analysés par PCR nichée. A la différence d'une PCR classique où un seul jeu d'amorces est mis en œuvre, deux jeux d'amorces sont utilisés, le second amplifiant une séquence des amplicons du premier jeu d'amorces. Récemment des billes magnétiques ont été utilisées afin d'améliorer la sensibilité du biomarqueur LTIIa (Tsai *et al.*, 2003). Dans cette variante, l'ADN est extrait directement des échantillons environnementaux. Le gène LTIIa est ensuite séparé de l'extrait d'ADN par hybridation avec des billes magnétiques contenant une sonde LTIIa. Finalement, une PCR est utilisée pour amplifier le gène LTIIa. L'utilisation des billes magnétiques permet d'augmenter la sensibilité jusqu'à un facteur 10 000 par rapport à la PCR nichée.

Coût, temps de main d'œuvre et délai d'obtention des résultats

Cette méthode en deux temps est relativement simple et peut être réalisée en deux jours (après isolement des colonies d'intérêt). Seul un équipement de base de biologie moléculaire est nécessaire (thermocycleur). Le temps de main d'œuvre est relativement restreint par rapport aux méthodes génotypiques décrites précédemment. En revanche, la nécessité d'une étape de culture et le temps de main d'œuvre rendent le délai et le coût de cette méthode supérieur à celui d'une PCR quantitative.

Niveau de développement actuel – Fiabilité

A notre connaissance, une seule étude de MST utilisant la PCR gène-spécifique a été réalisée à ce jour (Jiang *et al.*, 2007). Un consensus semble avoir été trouvé quant aux gènes à utiliser pour caractériser les sources de contamination. Toutefois, il n'existe pas à ce jour de kits commerciaux pour les amorces utilisées pour les PCRs nichées. D'autre part, le recours à des billes magnétiques ou à une PCR nichée ainsi que l'optimisation des conditions opératoires restent à définir. Cette méthode semble être l'une des plus fiables en termes de sélectivité. A titre d'exemple, dans une étude de Khatib *et al.* (2003), la sélectivité du gène STII (biomarqueur porcin) a été testée sur 110 extraits d'ADN provenant d'humains, d'oiseaux et d'autres animaux d'élevage (vache, chèvre, mouton,...). Aucune réaction positive n'a été enregistrée. D'autres études confirment cette sélectivité : Hammermueller *et al.* (1995) ne retrouvent pas le gène STII dans une population de chiens sains mais dans 4,4 % des chiens atteints de diarrhées.

Possibilité d'utilisation à grande échelle

Les avantages de cette méthode résident dans sa sélectivité et dans l'absence de base de données. Toutefois, pour pouvoir être mise en œuvre à grande échelle, quelques barrières doivent être levées. D'une part, le mode opératoire doit être standardisé et du recul sur son utilisation en MST est nécessaire. Par ailleurs, la nécessité de réaliser une PCR par type d'hôte recherché peut engendrer un coût analytique non négligeable.

4.3. Méthodes indépendantes de la culture et de base de données

Les méthodes indépendantes de la culture utilisées pour la MST sont essentiellement basées sur des techniques de biologie moléculaire et dérivent de l'écologie microbienne moléculaire. L'écologie microbienne moléculaire s'est développée avec comme idée directrice de classer l'ensemble des organismes uniquement sur la base des séquences de leurs gènes codant pour l'ARNr. Les méthodes d'écologie moléculaire utilisées pour la MST peuvent être regroupées en trois grandes familles : celles visant à caractériser et identifier les membres d'une communauté bactérienne, celles visant à mesurer les changements au sein d'une communauté et celles visant à identifier et quantifier certains membres spécifiques d'une communauté.

4.3.1. Analyse globale d'une communauté

4.3.1.1. Identification à l'aide des bases de données de gènes codant pour l'ARNr 16S

Principe

Les communautés microbiennes d'échantillons environnementaux sont fréquemment analysées par la construction de base de données de gènes codant pour l'ARNr 16S. La construction de ces bases de données est l'une des méthodes indépendantes de la culture la plus coûteuse et la plus longue à réaliser. Elle nécessite la combinaison de plusieurs techniques de biologie moléculaire incluant l'extraction d'acides nucléiques, la PCR, la ligation d'ADN, la transformation bactérienne et l'isolement de plasmide. Récemment cette technique a été simplifiée par l'utilisation de kits commerciaux. Ainsi, un technicien avec uniquement les connaissances de base en biologie moléculaire peut construire avec succès une base de données. Le séquençage de l'ADN implique l'utilisation d'un matériel coûteux et la plupart des laboratoires sous-traitent leur séquençage à des unités spécialisées. Ainsi, une large part du coût de cette méthode découle du nombre de clones à séquencer. Par ailleurs, l'analyse des séquences d'ADN produit un grand nombre de données qui peuvent se révéler longues à traiter.

Bases méthodologiques

Les acides nucléiques sont extraits puis amplifiés à l'aide d'amorces visant l'ARNr 16S compatibles avec le plus grand nombre d'espèces bactériennes possibles. Les gènes d'ARNr 16S de la communauté microbienne sont ensuite clonés dans des plasmides et transformés dans *E. coli*. Les souches d'*E. coli* obtenues sont cultivées, puis leur ADN est séquencé. Les gènes d'ARNr 16S sont ensuite comparés aux bases de données publiquement disponibles.

Coût, temps de main d'œuvre et délai d'obtention des résultats

Le coût et le temps nécessaire à la réalisation de cette méthode peuvent être évalués entre 5 et 10 k€ pour un mois de travail pour une base de données de 100 clones.

Niveau de développement actuel – Fiabilité

Du fait de son prix, cette méthode n'est donc pas largement utilisée pour la MST. Toutefois, deux études démontrent que la communauté bactérienne originale d'une eau est modifiée par l'addition de contamination fécale (Cho et Kim, 2000 ; Simpson *et al.*, 2004).

Possibilité d'utilisation à grande échelle

Ces deux facteurs en font une méthode non adaptée pour une utilisation à grande échelle en MST mais dont l'intérêt réside au niveau de son potentiel en termes de recherche.

4.3.1.2. Structure des communautés par empreinte génétique

Principe

Les méthodes d'empreinte génétique sont souvent utilisées pour suivre les modifications au sein d'une communauté ou pour comparer plusieurs communautés. Ces méthodes examinent la taille et la conformation de profils d'ADN obtenus après amplification PCR des gènes d'ARNr ou de fragments d'ADN amplifiés aléatoirement. Les amplicons peuvent être séparés par DGGE (Denaturing Gradient Gel Electrophoresis) ou TGGE (Temperature Gradient Gel Electrophoresis). Les amplicons peuvent également être séparés en fonction de leur taille avant (LH-RFLP : Length Heterogeneity Restriction Fragment Length Polymorphism) ou après (T-RFLP : Terminal - RFLP) digestion par des enzymes de restriction. Le principe sous-jacent à toutes les méthodes d'empreintes génétiques réside dans les différences de profil résultant des différences d'espèces microbiennes dans les communautés. L'amplification d'échantillons environnementaux à l'aide d'amorces PCR générales conduit à l'obtention d'un grand nombre de bandes qui sont analysées par des outils informatiques. Les bandes d'ADN peuvent être extraites du gel et séquencées pour permettre l'identification des membres clés de la communauté.

Bases méthodologiques

Ces techniques utilisent la PCR pour amplifier le gène de l'ARNr. Généralement, des amorces universelles ciblant le gène de l'ARNr 16S sont utilisées pour amplifier des séquences directement extraites d'échantillons environnementaux. Cependant, des amorces plus spécifiques peuvent s'avérer plus utiles pour la MST. Le plus souvent, les amorces utilisées pour la T-RFLP amplifient la totalité du gène de l'ARNr 16S tandis que les amorces utilisées pour la DGGE amplifient des séquences de plus petite taille réduisant ainsi les artefacts. Pour la DGGE, les produits PCR sont directement analysés par électrophorèse sur gel tandis que pour la T-RFLP les produits PCR sont préalablement digérés par une enzyme peu spécifique (à site de restriction fréquent). Dans la T-RFLP, les amorces sont marquées à l'aide d'une sonde fluorescente et les fragments sont séparés en fonction de leur taille. Pour la DGGE, les gels sont composés d'un gradient de dénaturants chimiques qui modifient la migration des séquences en fonction de leur composition chimique.

Coût, temps de main d'œuvre et délai d'obtention des résultats

Les techniques PCR utilisant des thermocycleurs standards sont relativement faciles à réaliser et peu coûteuses. Les méthodes d'empreintes génétiques peuvent être effectuées en un jour et sont suivies d'une électrophorèse qui peut être effectuée pendant la nuit permettant l'analyse des données le lendemain matin. Le coût de cette méthode est fonction des méthodes de séparation utilisées. La LH-RFLP et T-RFLP sont parmi les méthodes de séparation les plus coûteuses. Le séquençage des fragments d'ADN peut être sous-traité à des unités spécialisées.

Niveau de développement actuel – Fiabilité

Les méthodes d'empreinte génétique ont été peu utilisées pour la MST, vraisemblablement car dans les échantillons d'eau la proportion de la communauté qui peut être reliée à un hôte spécifique est très réduite. Toutefois, ces méthodes peuvent être utilisées avec des amorces plus spécifiques produisant moins de bandes d'ADN. Dans une étude de MST, la LH-PCR a été utilisée avec *Bacteroides* et a permis la mise en évidence d'une bande spécifique des bovins. De plus, la digestion des amplicons PCR par des enzymes de restriction (T-RFLP) a permis la mise en évidence de deux marqueurs bovins supplémentaires et d'un marqueur humain.

Possibilité d'utilisation à grande échelle

Trop peu de données relatives à la MST sont actuellement disponibles pour que l'utilisation de cette méthode à grande échelle soit envisageable à court terme. De plus, au vu des connaissances actuelles, cette méthode ne semble pas la plus pertinente pour répondre à la problématique de recherche de contamination dans des échantillons environnementaux.

4.3.1.3. Cibles alternatives

Bien que la plupart des méthodes indépendantes de la culture et d'une base de données ciblent les bactéries et les virus, les cellules eucaryotes peuvent être utilisées comme marqueur de sources de contamination fécale. A titre d'exemple, les espèces du genre *Cryptosporidium* ont montré un certain degré de spécificité à l'hôte sur la base de la séquence de leur gène d'ARNr (Bonnin *et al.*, 1996). Cette caractéristique a été utilisée pour identifier les sources de contamination fécale dans des eaux de surface et dans des eaux usées. Cependant, le faible nombre de *C. parvum* dans les échantillons environnementaux risque de poser un certain nombre de problème pour leur utilisation en MST, notamment en termes de concentration de volume important d'échantillon.

Récemment, des études PCR ciblant les gènes mitochondriaux ont été utilisées pour discriminer les contaminations fécales humaine, porcine et ovine (Martellini *et al.*, 2005). L'utilisation de cette méthode est basée sur le fait que les cellules épithéliales intestinales sont relarguées dans la lumière de l'intestin lorsqu'elles deviennent sénescents et s'intègrent ainsi aux fèces. La présence d'un nombre important de gènes mitochondriaux par cellule améliore la sensibilité de cette méthode par rapport à des PCR gène-spécifiques. Cependant, la survie supposée limitée de ces cellules pourrait limiter l'utilisation de cette méthode à l'étude de contaminations fécales récentes.

4.3.2. Identification et quantification de bactéries spécifiques

L'identification et la quantification de micro-organismes dans des échantillons environnementaux par des méthodes indépendantes de la culture est fonction de la disponibilité d'informations sur leurs séquences génétiques. Ces méthodes peuvent être divisées en deux catégories :

- ◆ des méthodes de sondage direct ne nécessitant pas de PCR,
- ◆ des méthodes basées sur la PCR.

4.3.2.1. Sondage direct de gènes spécifiques

Principe

Les méthodes de sondage direct étaient utilisées à l'origine pour quantifier des micro-organismes sans passer par la culture. Généralement, ces méthodes utilisent des petites séquences oligonucléotidiques appelées sondes et qui sont conçues pour s'hybrider avec des séquences cibles d'ADN. La méthode FISH (Fluorescent *In Situ* Hybridization) peut aussi être utilisée directement sur les cellules bactériennes sur une lame de microscopie. La procédure complète peut prendre 1 à 2 jours et là encore, le coût des réactifs est relativement faible. Cependant, la visualisation des cellules fluorescentes nécessite un microscope à épifluorescence de bonne qualité ou un microscope confocal qui sont des équipements coûteux.

Bases méthodologiques

Pour l'hybridation dot-blot, les extraits d'ADN sont fixés sur une membrane nylon et les sondes sont marquées avec du ^{32}P ou des marqueurs non-radioactifs. Après hybridation et lavage, la quantité de radioactivité sur le filtre correspond à la quantité de cibles présente dans l'échantillon. Dans la méthode FISH, la sonde est marquée par un composé fluorescent. La sonde est hybridée en présence des cellules complètes qui sont traitées pour être rendues plus perméables. Les cellules qui se sont hybridées avec la sonde sont ensuite visualisées par microscopie à épifluorescence.

🚧 Niveau de développement actuel – Fiabilité

Cette méthode n'a pas été utilisée directement pour la MST malgré l'existence de nombreuses sondes conçues pour les bactéries fécales du fait de la concurrence de la QPCR (PCR Quantitative) dont la sensibilité est beaucoup plus élevée. La méthode FISH est une bonne méthode pour suivre les populations dans des échantillons fécaux mais est peu utilisée en MST du fait des faibles concentrations en bactéries. De plus, il arrive que la concentration en ARNr intracellulaire des bactéries fécales environnementales soit sous le seuil de détection de cette méthode. Toutefois, le couplage de la méthode FISH et de la cytométrie en flux pourrait améliorer la sensibilité de cette méthode et la vitesse d'analyse des échantillons.

🚧 Coût, temps de main d'œuvre et délai d'obtention des résultats

Ces méthodes sont modérément consommatrices de temps et peuvent nécessiter du personnel qualifié selon la méthode de marquage utilisée (sondes radioactives). La réalisation complète de la méthode peut prendre 1 à 3 jours. Le coût des réactifs est relativement limité.

🚧 Possibilité d'utilisation à grande échelle

La nécessité d'un personnel qualifié ainsi que le recours à des équipements qui peuvent être coûteux rendent le développement à grande échelle de ces méthodes peu envisageable en l'état actuel.

4.3.2.2. Méthodes basées sur la PCR à cibles spécifiques

🚧 Principe

Dans les années 80, plusieurs genres ou espèces dont *Bacteroides* (Fiksdal *et al.*, 1985), *Bifidobacterium* (Resnick et Levin, 1981), *Rhodococcus coprophilus* (Mara et Oragui, 1981) avaient été pressenties comme marqueurs hôtes-spécifiques alternatifs à *E. coli* et aux coliformes. Bien que certaines d'entre elles aient montré un potentiel, des difficultés de culture et les délais d'incubation ont rendu ces méthodes inadéquates pour la MST. Avec les progrès des méthodes indépendantes de la culture, ces bactéries ont été ré-évaluées pour la MST. Ainsi, des méthodes telles que la multiplex PCR (détection simultanée de plusieurs cibles), la PCR nichée ou encore la QPCR ont été testées avec ces bactéries. Chaque essai étant spécifique d'un micro-organisme, plusieurs essais par échantillon sont nécessaires afin d'identifier plusieurs sources de contamination fécale. La multiplication des essais peut par ailleurs renforcer les arguments d'identification des sources.

♦ *Bacteroidetes* / *Bacteroidales* / *Bacteroides*

Dans les années 80, les *Bacteroides* ont été proposés comme un indicateur de contamination fécale alternatif (et potentiellement plus fiable) (Fiksdal *et al.* 1985). Le choix de *Bacteroides* vient du fait que la quantité de ce micro-organisme pouvant être cultivée dans les fèces humains est environ 1000 fois supérieure au niveau d'*E. coli*. D'autre part, ces bactéries ne conservent leur cultivabilité que peu de temps dans l'environnement du fait de leur faible tolérance à l'oxygène. Ce genre bactérien est parmi les micro-organismes les plus utilisés pour les études MST en PCR à cible spécifique. Des amorces et des sondes PCR spécifiques ont été conçues pour permettre de différencier 3 espèces de *Bacteroides* et notamment *B. fragilis* et *B. vulgatus* qui sont présentes à des concentrations très fortes dans les fèces humains (Kreader, 1995). Récemment, des méthodes QPCR pour détecter l'ensemble des espèces de *Bacteroides*, les *Bacteroides* humain-spécifiques (Seurinck *et al.*, 2005) les *Bacteroides* bovin-spécifiques (Layton *et al.*, 2006) ont été développées.

Cependant, actuellement, et en particulier en France, la tendance semble être à l'utilisation des *Bacteroidales* (Gourmelon *et al.*, 2007 ; Lee *et al.*, 2008 ; Mieskin *et al.*, 2009). Les *Bacteroidales* sont un ordre bactérien incluant notamment les genres *Bacteroides* et *Prevotella* qui constituent la majeure partie de la flore intestinale humaine et animale. La sensibilité et la spécificité de marqueurs généraux, humains, ruminants et porcins ont été testées dans un contexte français.

D'autres groupes de chercheurs se sont intéressés à l'utilisation du phylum *Bacteroidetes* (phylum comprenant notamment l'ordre des *Bacteroidales*) (Dick et Field, 2004 ; Reischer *et al.*, 2006). A notre connaissance, à l'heure actuelle, seul un marqueur de contamination humaine a été identifié. L'utilisation de cette méthode permet une meilleure sensibilité que les marqueurs *Bacteroides* et évite la présence de faux-positifs (32 % de faux-positifs dans l'étude de Layton *et al.* en 2006).

◆ *Bifidobacterium*

Plusieurs espèces de *Bifidobacterium* incluant *Bif. adolescentis*, *Bif. dentium* et *Bif. longum* ont été proposées comme indicateurs de contamination humaine (Bonjoch *et al.*, 2004 ; Matsuki *et al.*, 2004). Des amorces PCR pour détecter l'ensemble des espèces du genre *Bifidobacterium* ainsi que des amorces espèces spécifiques pour les trois espèces citées précédemment ont été mises au point. A l'heure actuelle, seuls des marqueurs humains existent pour ce genre bactérien.

◆ *Entérocoques (Streptococcus de Lancefield du groupe D)*

Le taxon des *Streptococcus* de Lancefield du groupe D contient à la fois des *Streptococcus* et des *Enterococcus*. Les espèces de ce groupe ont été nommées en fonction de l'hôte depuis lequel elles ont été isolées d'où la suspicion de spécificité d'hôte. Toutefois, la spécificité d'hôte n'est pas très claire, *Streptococcus bovis* se retrouvant couramment lors d'infections humaines. Bien que non utilisées jusqu'à présent pour les études de MST, des amorces PCR ont été conçues pour détecter des souches humaines et non-humaines de *Streptococcus* et d'*Enterococcus* (Whitehead et Cotta, 2000). De plus, dans le cadre d'applications en lien avec l'eau potable et les eaux de baignade, des méthodes de QPCR ont également été mises au point. Cependant, pour leur utilisation en MST la spécificité d'hôte de ces souches doit être confirmée (Vancanneyt *et al.*, 2002).

◆ *Rhodococcus coprophilus*

Cette bactérie n'a actuellement pas été utilisée pour des études MST car sa distribution parmi les hôtes n'a pas été évaluée à ce jour. *Rhodococcus coprophilus* se retrouve dans le système digestif de la plupart des ruminants et est transmis *via* l'herbe contaminée (Mara et Oragui, 1981). Une méthode QPCR a été mise au point pour ce micro-organisme (Savill *et al.*, 2001), mais elle ne semble pas avoir été étudiée depuis.

🌈 *Bases méthodologiques*

L'application d'une PCR cible-spécifique à des échantillons d'eau nécessite généralement une étape de concentration. En effet, le volume d'échantillon utilisé pour la réaction PCR n'est que de quelques μL . Du fait de la dilution et de la dispersion des échantillons d'eau, des volumes plus importants sont nécessaires pour être représentatifs. De plus, en supposant que la limite de détection de cette méthode est de 1 copie d'ADN et que cette copie d'ADN correspond à une bactérie, des niveaux de contamination très importants seraient nécessaires pour permettre une détection (10^6 micro-organismes par mL environ). Dans la plupart des cas, la filtration de 100 mL est souhaitable. Suite à la concentration, l'ADN est extrait à l'aide de kits commerciaux adaptés à la nature de l'échantillon (boues, sols, eaux de surface, fèces,...). Après extraction, l'ADN est amplifié par PCR ou par une méthode dérivée (QPCR, PCR nichée, multiplex-PCR).

✚ *Coût, temps de main d'œuvre et délai d'obtention des résultats*

Les méthodes PCR à cible spécifique sont probablement les moins coûteuses des méthodes indépendantes de la culture. De plus, elles ne nécessitent pas de compétences techniques spécifiques et peuvent être réalisées en 1 jour. Les méthodes PCR en présence / absence sont moins coûteuses que la QPCR (nécessité d'un thermocycleur avec détection de fluorescence pour la QPCR). En revanche, les essais en présence / absence sont plus long à réaliser. En QPCR, l'analyse complète peut être réalisée en 3 h.

✚ *Niveau de développement actuel – Fiabilité*

L'utilisation de la QPCR est largement développée en France dans les laboratoires d'analyses, notamment afin de répondre au besoin de suivi des niveaux de contamination en *Legionella* au niveau des tours aéro-réfrigérantes. La QPCR orientée vers la recherche des sources de contamination fécale a été testée en France (voir les études de cas § 4), et est actuellement au stade du transfert vers les laboratoires d'analyses.

Cette méthode semble parmi les plus fiables : sensibilité généralement comprise entre 95 et 100 % (*i.e.*, 95 à 100 % de positifs dans les échantillons *a priori* positifs) et spécificité comprise entre 90 et 100 % (*i.e.* % d'identification correcte).

✚ *Possibilité de développement à grande échelle*

L'utilisation de la QPCR au niveau des laboratoires d'analyses pour les applications *Legionella* pourrait permettre une utilisation à grande échelle de cette méthode relativement aisée. Les barrières à lever pour permettre son utilisation sont (entre autres) : la disponibilité des amorces PCR (kits commerciaux), la standardisation des marqueurs utilisés et des protocoles, la signification des résultats obtenus en termes de quantification des sources de contamination et de corrélation avec les indicateurs de contamination classiques (*E. coli* et Entérocoques).

4.3.3. Identification et quantification de virus spécifiques par (RT)-PCR

✚ *Principe*

L'identification de virus entériques à spectre d'hôtes réduit peut être utilisée pour distinguer des sources de contamination fécale (Noble *et al.*, 2003). Ainsi, les adénovirus et les entérovirus spécifiques de l'homme sont des candidats pour la détection de contaminations humaines. De même, les entérovirus bovins et les adénovirus bovins et porcins (Hundesha *et al.*, 2009) sont étudiés pour la détection de contaminations animales. D'autres virus sont susceptibles d'être utilisés pour les études de MST mais le développement de méthodes reste nécessaire.

✚ *Bases méthodologiques*

Les méthodes de biologie moléculaire telle que la (RT)-PCR permettent une détection rapide des virus. Ces méthodes sont par ailleurs souvent plus sensibles, moins complexes techniquement et plus rapides que les méthodes par culture. Des méthodes QPCR ont été développées pour certains virus permettant ainsi la quantification de leurs niveaux de contamination.

✚ *Coût, temps de main d'œuvre et délai d'obtention des résultats*

Cette méthode étant conceptuellement très proche de la PCR à cible spécifique orientées vers les bactéries, son coût, le temps de main d'œuvre nécessaire et le délai d'obtention des résultats sont comparables.

Niveau de développement actuel – Fiabilité

Des méthodes PCR pour la recherche d'adénovirus et de polyomavirus humains, d'adénovirus porcin et de polyomavirus bovin ont été mises au point (Bofill-Mas *et al.*, 2000, 2006 ; Hundesa *et al.*, 2006). Cependant, le nombre d'étude de MST y ayant recours reste limité. Malgré cela, au moins une étude réalisée dans un contexte français est disponible (Ogorzaly et Gantzer, 2006). Pour certains virus, le faible taux de porteur de la population humaine peut conduire à la non-détection de contamination provenant de petits échantillons de population. Les bactériophages ARN f-spécifiques sont actuellement les virus pour lesquels les méthodes de (RT)-PCR quantitatives sont les plus avancés.

Possibilité de développement à grande échelle

De même que pour la PCR à cible spécifique orientée vers les bactéries la mise en œuvre à grande échelle de cette méthode semble parmi les plus faciles du fait de l'utilisation répandue de la QPCR dans les laboratoires français.

4.4. Conclusions sur les différentes méthodes susceptibles d'être utilisées dans les recherches de sources de contamination fécale.

La Figure 7, le Tableau 2 et le Tableau 3 présentent une synthèse des méthodes abordées ci-dessus. En complément, l'intérêt des différentes méthodes est discuté ci-après.

Les méthodes phénotypiques font appel essentiellement à l'étude des résistances aux antibiotiques et à l'étude des substrats carbonés assimilables par les populations bactériennes. Ces méthodes s'appliquent uniquement à des microorganismes cultivables, les indicateurs usuels tels que *E. coli* et les Entérocoques, sont de ce fait les plus étudiés. Ces méthodes présentent des coûts de mise en œuvre généralement restreints et un niveau technique accessible à de nombreux laboratoires. En revanche, la nécessité de constituer des bases de données conséquentes et régulièrement renouvelées pour prendre en considération les évolutions de pression sélective qui s'exercent sur les indicateurs rejetés dans l'environnement, pénalise ces méthodes qui peuvent *a priori* être avantageusement remplacées par des techniques aussi fiables, et permettant d'étudier des indicateurs plus informatifs mais difficilement cultivables telles que les bactéries anaérobies (méthodes de PCR à cibles spécifiques).

Toujours en ce qui concerne les méthodes d'étude faisant appel à des étapes de culture sur milieux nutritifs, le sérotypage ou le génotypage des phages ARN f-spécifiques sont deux méthodes qui peuvent être mises en parallèle des méthodes phénotypiques évoquées ci-dessus. Dans ce cas de figure, la constitution d'une base de données n'est pas utile, en revanche une phase de culture demeure incontournable pour isoler les phages puis définir leurs sérotypes ou leurs génotypes. Cette méthode a apporté des résultats probants en termes de spécificité entre les hôtes et les génogroupes mais reste lourde à mettre en œuvre. Pour cette approche, les méthodes de génotypage ont par ailleurs été préférées à celles de phénotypage. Le glissement de la caractérisation des microorganismes isolés par culture par des méthodes de génotypage au détriment des méthodes de phénotypage est par ailleurs visible à l'analyse de la diversité des méthodes de génotypage décrites dans la bibliographie ; les nombreuses méthodes décrites dans les paragraphes précédents le montrent (Rep-PCR, RAPD, PFGE, Ribotypage, ...). Il s'agit du premier virage méthodologique qui a été adopté dans les stratégies de recherche de source de contamination fécale.

Les méthodes de génotypage après culture ont montré qu'elles apportaient des informations fiables par la comparaison très fine de souches présentes dans des fèces et des effluents. Mais clairement certaines de part le niveau de technicité requis dans la mise en œuvre et l'interprétation, semblent difficiles à transférer en dehors du cadre des laboratoires experts ; il s'agit des méthodes de Ribotypage, de PFGE et d'AFLP. Les méthodes de rep-PCR et de RAPD sont certainement plus abordables en routine, malgré tout, les inconvénients que sont d'une part le recours à une phase de culture et d'autre part la constitution d'une base de données, perdurent. Ces méthodes restent par conséquent limitées à un nombre restreint d'indicateurs cultivables et l'emploi de base de données implique de prendre en considération les variations spatiales et temporelles des populations de microorganismes à l'échelle locale. Ainsi, dans l'hypothèse d'une application en routine, il en résulte un manque de souplesse. Les méthodes basées sur la culture, dépendante ou non à une base de données tendent donc à être abandonnées au profit des méthodes de PCR à cibles spécifiques apparues ces dernières années.

L'exemple de la recherche des différents génogroupes de bactériophages ARN f-spécifiques illustre bien les avantages apportés par les méthodes de PCR à cibles spécifiques. Dans le cas de ces phages, si la méthode de génotypage après culture a permis de confirmer que la spécificité des phages ARN f-spécifiques était une méthode manifestement pertinente pour la recherche des sources de contamination fécale, l'avènement des méthodes de PCR (quantitative) a rendu cette méthode caduque. En effet, la PCR permet d'obtenir des informations comparables sur la base des génogroupes mais avec une mise en œuvre largement facilitée et un coût par conséquent plus réduit. De plus la fiabilité semble également renforcée car la détection des phages dans l'environnement par PCR permet de s'affranchir au moins en partie des différences de persistance observées avec les méthodes de culture entre les différents génogroupes.

Par ailleurs les méthodes de PCR quantitatives ont également permis de définir des marqueurs spécifiques, à l'Homme, à l'Animal ou à des espèces animales sur des indicateurs plus pertinents que ceux utilisés jusqu'alors. Les Bifidobactéries mais surtout les *Bacteroidales* et *Bacteroides* sont des germes excrétés en plus grande quantité que les indicateurs usuels (notamment *E. coli*) et qui persistent par ailleurs moins longtemps dans l'environnement. L'application des méthodes de PCR quantitatives à ces marqueurs, en particulier aux *Bacteroidales* semble constituer à l'heure actuelle la meilleure méthode d'investigation dans le sens où :

- de nombreux marqueurs spécifiques existent,
- la mise en œuvre est rapide et l'interprétation aisée : une utilisation en routine est possible,
- Le coût de la méthode reste abordable.

Les méthodes de PCR quantitatives constituent un second virage méthodologique. Appliquées aux bactériophages ARN f-spécifiques et aux *Bacteroidales*, elles sont actuellement les méthodes les plus étudiées et sans doute les plus prometteuses.

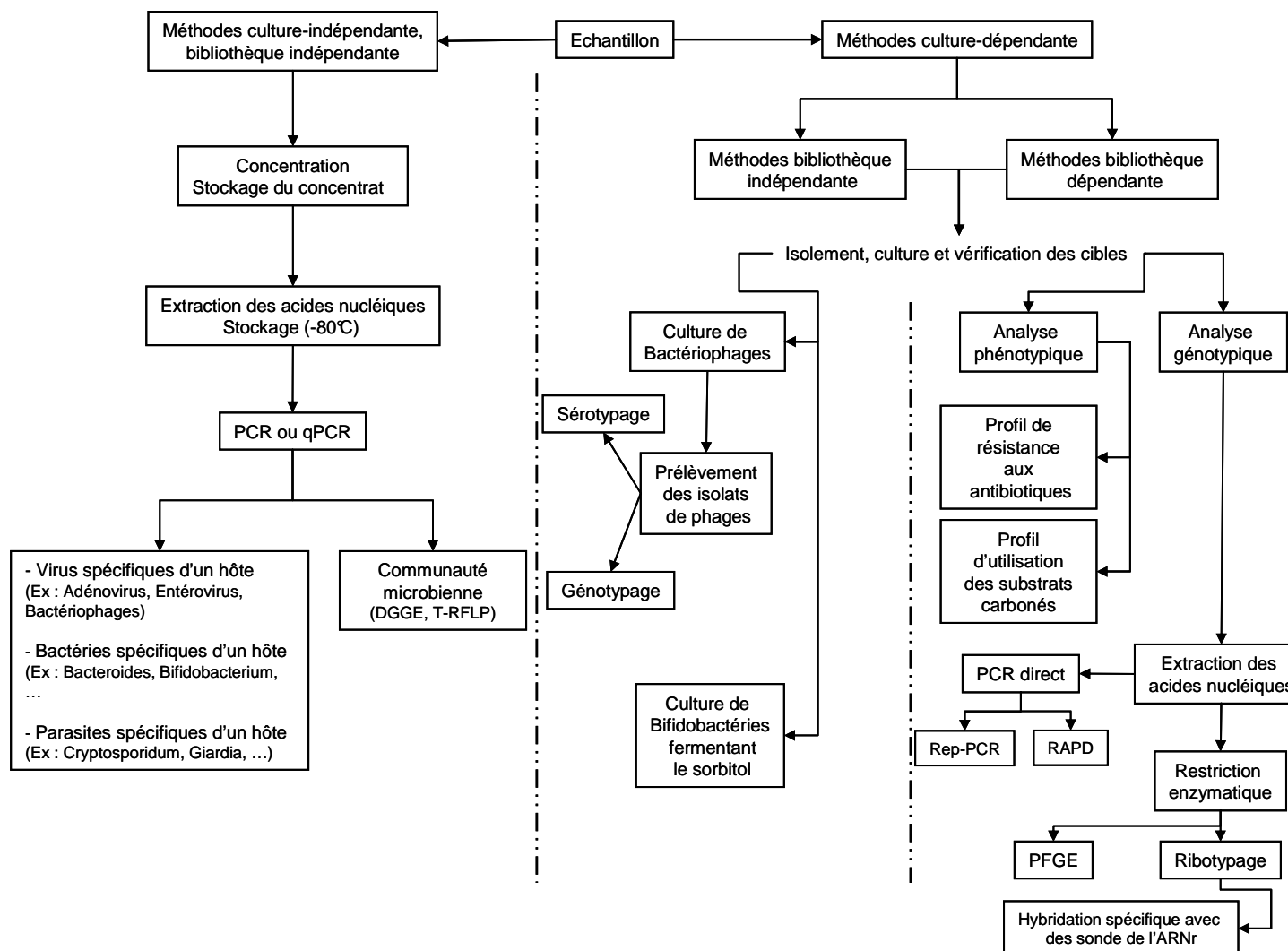


Figure 7 : Schéma de la boîte à outils disponible pour la recherche des sources de contamination fécale (D'après US-EPA, 2005 ; SantoDomingo *et al.*, 2007 ; Ogorzaly, 2009).

Tableau 2 : Synthèse de mise en œuvre des méthodes.

Méthode	Cibles testées	Culture	Base de données	Principaux équipements	Principaux réactifs	Temps nécessaire
Profils de résistance aux antibiotiques	<i>E. coli</i> Streptocoques fécaux <i>Enterococcus spp.</i>	Souches isolées	Oui	/	Antibiotiques Plaques 96 puits	4-5 jours
Profils d'utilisation du carbone	<i>E. coli</i> Streptocoques fécaux <i>Enterococcus spp.</i>	Souches isolées	Oui	Lecteur de plaques (optionnel)	Microplaques avec substrats	2-5 jours
Analyse des séquences répétitives d'ADN rep-PCR	<i>E. coli</i>	Souches isolées	Oui	Thermocycleur Unité d'électrophorèse sur gel "Gel documentation system"	Réactifs PCR Réactifs pour l'électrophorèse sur gel	1 jour
Analyse d'ADN polymorphique aléatoirement amplifié RAPD	<i>E. coli</i>	Souches isolées	Oui	Thermocycleur Unité d'électrophorèse sur gel "Gel documentation system"	Réactifs PCR Réactifs pour l'électrophorèse sur gel	1 jour
Analyse du polymorphisme de longueur de fragments amplifiés AFLP	<i>E. coli</i>	Souches isolées	Oui	Thermocycleur Séquenceur automatique	Kit d'extraction d'ADN Kit d'AFLP	5 jours
Electrophorèse sur gel en champ pulsé PFGE	<i>E. coli</i> <i>Enterococcus spp.</i>	Souches isolées	Oui	Thermocycleur Electrophorèse à gradient pulsé "Gel documentation system"	Réactifs de préparation du gel Enzymes de restriction Réactifs pour l'électrophorèse sur gel	2-4 jours
Ribotypage	<i>E. coli</i> Streptocoques fécaux <i>Enterococcus spp.</i>	Souches isolées	Oui	Unité d'électrophorèse sur gel "Gel blotting/Hybridization oven" "Gel documentation system"	Réactifs de purification de l'ADN Réactifs pour l'électrophorèse sur gel Enzymes de restriction Sondes marquées	1-3 jours
Typage des coliphages ARN-f	Phages ARN-f	Souches isolées	Non	Etuve d'hybridation Aucun si serotypage	Solutions d'hybridation Sondes marquées ou antigènes	1-3 jours
PCR gène spécifique	<i>E. coli</i> (gènes produisant des toxines)	Enrichissement de l'échantillon	Non	Thermocycleur Unité d'électrophorèse sur gel	Réactifs PCR	2 jours
(Q)PCR à cibles spécifiques	<i>Bacteroides</i> <i>Bifidobacteria</i> <i>Enterococcus</i> <i>Rhodococcus</i> Phages ARN-f <i>Enterovirus</i> <i>Adenovirus</i>	Pas de culture	Non	Thermocycleur (à fluorescence) Unité d'électrophorèse sur gel	Unités de filtration Réactifs PCR	6-8 heures (1 à 3 h pour la QPCR)

Tableau 3 : Synthèse des principaux avantages / désavantages des méthodes.

Méthode	Avantages	Désavantages
Profils de résistance aux antibiotiques	Rapide et facile à réaliser Nécessite peu d'expertise Peut être utile pour déterminer l'hôte source	Nécessite une base de données Nécessite la culture des organismes cibles Spécificité spatiale et temporelle de la base de données Pas de méthode standardisée
Profils d'utilisation du carbone	Rapide et facile à réaliser Nécessite peu d'expertise	Nécessite une base de données Nécessite la culture des organismes cibles Spécificité spatiale et temporelle de la base de données Pas de méthode standardisée Résultats souvent peu exploitables
Analyse des séquences répétitives d'ADN rep-PCR	Très reproductible Rapide et facile à réaliser Nécessite peu d'expertise Peut être utile pour déterminer l'hôte source	Nécessite une base de données Nécessite la culture des organismes cibles Spécificité spatiale et temporelle de la base de données
Analyse d'ADN polymorphique aléatoirement amplifié RAPD	Rapide et facile à réaliser Peut être utile pour différencier l'hôte source	Nécessite une base de données Nécessite la culture des organismes cibles Spécificité spatiale et temporelle de la base de données Très peu utilisée pour la recherche de source de contamination
Analyse du polymorphisme de longueur de fragments amplifiés AFLP	Très reproductible Peut être utile pour déterminer l'hôte source	Représente une importante quantité de travail Nécessite une base de données Nécessite un entraînement spécifique Nécessite la culture des organismes cibles Spécificité spatiale et temporelle de la base de données
Electrophorèse sur gel en champ pulsé PFGE	Très reproductible Peut être utile pour déterminer l'hôte source	Représente une importante quantité de travail Nécessite une base de données Nécessite un entraînement spécifique Nécessite la culture des organismes cibles Spécificité spatiale et temporelle de la base de données
Ribotypage	Très reproductible Peut être automatisé Peut être utile pour déterminer l'hôte source	Représente une importante quantité de travail Nécessite une base de données Nécessite un entraînement spécifique Nécessite la culture des organismes cibles Spécificité spatiale et temporelle de la base de données
Typage des coliphages ARN-f	Distingue les contaminations humaines / animales les sous-types sont des caractéristiques stables Facile à réaliser Ne nécessite pas de base de données	Nécessite la culture de phages Les sous-types ne sont pas totalement hôte-spécifiques Faible nombre de coliphages dans certains environnements
PCR gène spécifique	Peut être adaptée pour quantifier le nombre de copie du gène Les gènes de virulence peuvent être ciblés fournissant des preuves directes de la présence d'organismes potentiellement dangereux Ne nécessite pas de base de données	Nécessite un enrichissement en organismes cibles Nécessite un personnel qualifié Les amorces ne sont pas disponibles pour tous les hôtes
(Q)PCR à cibles spécifiques	Ne nécessite pas la culture de l'organisme cible Rapide et facile à réaliser Ne nécessite pas de base de données Spécifique de l'hôte	Peu de connaissance sur la distribution et la survie des organismes cibles dans l'eau Les amorces ne sont pas toutes disponibles

5. ETUDE DE CAS

Deux études de cas françaises récentes sont à présent proposées.

5.1. Evaluation de deux méthodes dans un contexte français : la PCR à cible spécifique (*Bacteroidales*) et le génotypage des phages à ARN f-spécifique

5.1.1. Source d'information

Gourmelon M., Caprais MP., Ségura R., Le Mennec C., Lozach S., Piriou JY., Rincé A., 2007. Evaluation of two library-independent microbial source tracking methods to identify sources of fecal contamination in French estuaries. Appl. Environ. Microbiol. 73:4857-4866.

5.1.2. Description générale

Description du lieu de l'étude

3 estuaires français situés en Bretagne et en Normandie :

- ◆ Estuaire Aber Benoît : bassin versant de 224 km² contenant des zones urbaines (25 000 habitants) et de l'élevage intensif (vaches, porcs et poulets).
- ◆ Estuaire Havre de l'Ay : 211 km², 7000 habitants (population doublée durant l'été), présence de brebis sur le littoral et de bovins en amont.
- ◆ Estuaire Havre de la Vanlée : 60 km², 5 800 habitants (10 à 15 000 durant l'été), élevage ovin et bovin.

Ces 3 estuaires contiennent des zones de conchyliculture et des zones de baignade.

Objectifs

Optimiser et valider les deux méthodes utilisées sur des fèces humaines et animales ainsi que sur des effluents et des boues de STEP et des lisiers de porc.

Application des 2 méthodes sur des échantillons d'eaux collectés à différentes périodes dans les 3 estuaires.

Période de réalisation

Du 13 avril au 13 octobre 2005 pour les échantillons environnementaux.

De avril 2004 à septembre 2005 pour les échantillons de fèces.

5.1.3. Méthodes analytiques

Description des méthodes

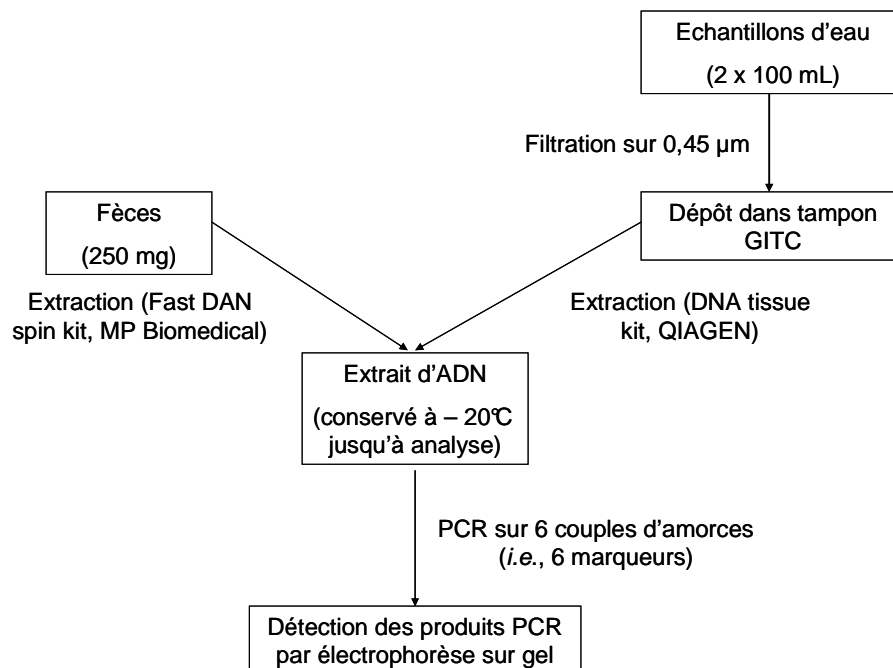
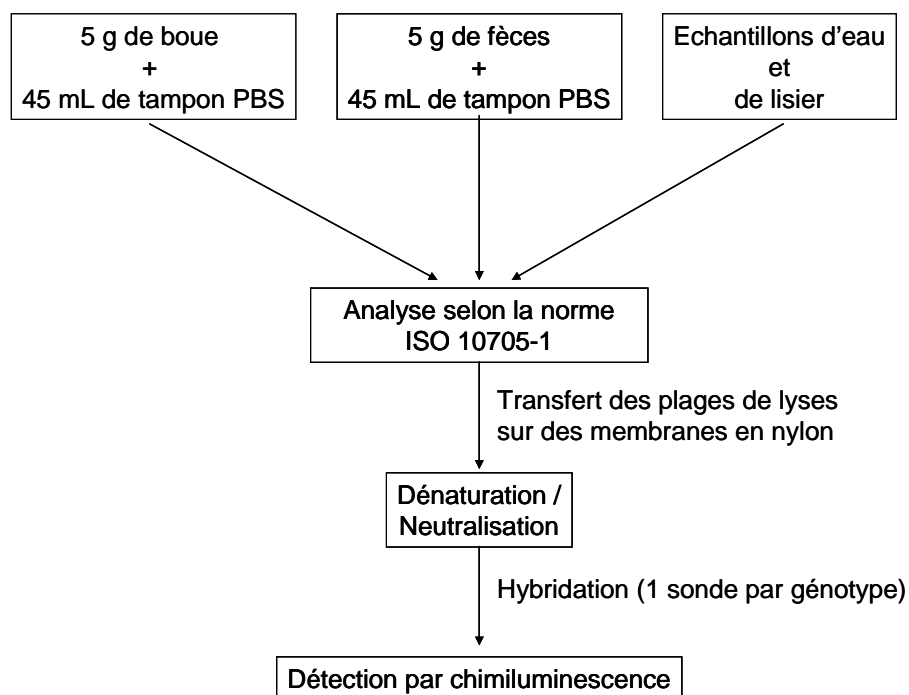
Figure 8 : Schéma de principe de la PCR à cible spécifique (*Bacteroidales*).

Figure 9 : Schéma de principe de la méthode de détection des bactériophages à ARN f-spécifiques.

Hôtes testés

- ◆ PCR cible-spécifique : humains et animaux (bovin, porcin, ovin et oiseaux)
- ◆ Génotypage des bactériophages ARN f-spécifique après culture : humains et animaux.

Approche statistique

Détermination de la sensibilité (pourcentage de positifs parmi les échantillons d'un hôte donné) et de la spécificité (pourcentage de négatifs parmi les échantillons des autres hôtes).

Test de Fisher pour vérifier si les différences de fréquence de détection des marqueurs sont significatives ($p = 0,05$).

5.1.4. Echantillonnage

Nombre et fréquence des prélèvements

- ◆ Estuaire Aber Benoît : 6 points de prélèvement avec 3 points situés en aval de petites agglomérations (dont un également en aval d'un élevage bovin) et 3 points situés en zone agricole. Pour chaque point, 3 prélèvements ont été réalisés : le 13 avril, le 25 juin et le 13 octobre 2005.
- ◆ Estuaire Havre de l'Ay : 4 points de prélèvement avec 1 point en zone urbaine, 1 point en zone rurale et 2 points en zone mixte.
- ◆ Estuaire Havre de la Vanlée : 2 points de prélèvement avec 1 en amont et l'autre en aval de l'estuaire, les deux étant soumis à des influences mixtes urbaine et agricole.

Type de prélèvement

Prélèvements ponctuels sur échantillons d'eau, lisier de porc et effluents de STEP.

Conditions du prélèvement

Pour les fèces, immédiatement après excrétion.

Volume des prélèvements

Flacon de 1 L stérile transporté en glacière et analyse à réception.

5.1.5. Validation des méthodes

Témoins de validation

- ◆ Fèces humains : 44 échantillons provenant d'adultes et d'enfants de Bretagne et de Normandie.
- ◆ Fèces animales : échantillons provenant de 43 vaches, 10 moutons, 26 porcs et 10 poulets.

Tests sur échantillons environnementaux

28 échantillons environnementaux analysés.

Témoins négatifs

Un témoin négatif réalisé pour chaque série d'échantillons.


Comparaison à d'autres données existantes

Corrélation significative entre les concentrations d'*E. coli* et la présence de marqueurs humains (HF183 et génotypes II et III des phages ARN f-spécifiques).

5.1.6. Bilan
 *Sensibilité et spécificité sur témoin de validation*

Tableau 4 : Récapitulatif des sensibilités et spécificités des marqueurs utilisés par Gourmelon et al., (2007).

Méthode	Marqueur	Hôte	Type d'échantillon	Sensibilité (%) (nbre d'échantillons)	Spécificité (%) (nbre d'échantillons)
PCR à cible spécifique (Bacteroidales)	HF183F/Bac708R	Humain	Fèces	98 (44)	94 (86)
			Effluents de STEP	100 (11)	100 (10)
	HF134F/HF654R	Humain	Fèces	84 (44)	99 (86)
			Effluents de STEP	100 (11)	100 (10)
	CF128F/Bac708R	Ruminants	Fèces	100 (44)	69 (86)
			Effluents de STEP	NT	71 (21)
	CF193'F/Bac708R	Ruminants	Fèces	100 (25)	98 (105)
			Effluents de STEP	100 (10)	100 (11)
	PF163F/Bac708R	Porcin	Fèces	100 (25)	98 (105)
			Effluents de STEP	100 (10)	100 (11)
Génotypage des bactériophages ARN f-spécifique	Génotypes II + III	Humain	Fèces	NT	100 (76)
			Effluents de STEP	100 (11)	100 (10)
	Génotypes I + IV	Animaux	Fèces	21 (76)	NT
			Effluents de STEP	40 (10)	100 (11)

 *Résultats et conclusions*

- ♦ Très bonnes sensibilité et spécificité de la PCR à cible spécifique (testées sur les échantillons de fèces d'hôtes connus)
- ♦ Sensibilité moindre des génotypes I et IV des bactériophages à ARN f-spécifique (marqueurs animaux). Le génotypage est proposé comme une méthode de confirmation de contamination humaine (génotypes II et III).
- ♦ Les marqueurs généraux de contamination (population totale de *Bacteroidales*) sont retrouvés dans la quasi totalité des échantillons environnementaux. Aucun échantillon environnemental *a priori* non contaminé n'a été testé.
- ♦ Les marqueurs humains sont fréquemment retrouvés dans des échantillons *a priori* sujets à contamination humaine. Il semble que ces marqueurs sont relativement fiables.
- ♦ Afin d'améliorer la fiabilité de la classification des contaminations animales, l'utilisation de plusieurs marqueurs par catégorie d'hôtes semble être à privilégier.
- ♦ Récemment, des méthodes de PCR en temps réel ont été développées aussi bien pour le génotypage des bactériophages à ARN f-spécifique (Ogorzaly et Gantzer, 2006), que pour la PCR à cible spécifique (*Bacteroidales*) (Mieszkin *et al.*, 2009a). Ces nouvelles méthodes permettent d'une part d'améliorer la sensibilité de la détection (génotypage des bactériophages à ARN f-spécifique) et d'autre part de permettre une quantification des sources de contamination.
- ♦ Peu de recul sur l'utilisation de cette méthode sur des échantillons négatifs : des données sur la fréquence de faux positifs seraient nécessaires.

5.2. Evaluation de PCR en temps réel (*Bacteroidales*) dans un contexte français

5.2.1. Source d'information

Mieszkin S., Yala JF., Joubrel R., Gourmelon M., 2009b. Phylogenetic analysis of *Bacteroidales* 16S rRNA gene sequences from human and animal effluents and assessment of ruminant faecal pollution by real-time PCR. J Appl Microbiol.

5.2.2. Description générale

📌 Description du lieu de l'étude

10 stations de traitement des eaux usées non raccordées à des abattoirs et situées en Bretagne, en Normandie et au Pays de Loire.

📌 Objectifs

Déterminer la spécificité d'un marqueur « ruminant » : Rum-2-Bac.

📌 Période de réalisation

Août 2004 à Avril 2008.

5.2.3. Méthode analytique

📌 Description de la méthode

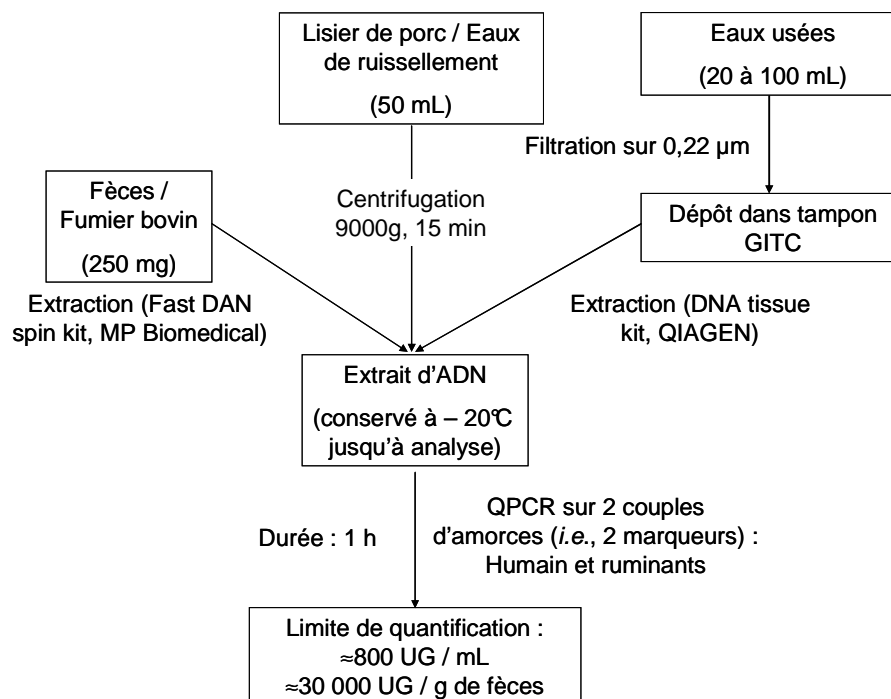


Figure 10 : Schéma de principe de la QPCR cible-spécifique (*Bacteroidales*)

✚ *Hôtes testés*

Humain et ruminants (bovins + ovins).

Spécificité vérifiée également sur des fèces de porcs, de cheval et d'oiseaux sauvages.

✚ *Approche statistique*

Détermination de la sensibilité et de la spécificité.

5.2.4. Echantillonnage

✚ *Nombre de prélèvements*

82 échantillons de fèces et 52 effluents.

Fèces : 17 humains (Bretagne), 19 vaches, 10 moutons, 10 chevaux, 16 porcs, 10 oiseaux sauvages).

Effluents : 10 STEPs en Bretagne, Normandie et Pays de Loire (non reliées à des abattoirs), 20 fumiers bovins, 10 lisiers de porcs et 12 eaux de ruissellement (6 après exposition à du fumier bovins et 6 après exposition à du lisier de porc).

✚ *Type de prélèvement*

Prélèvements ponctuels.

✚ *Conditions de prélèvement*

Pour les fèces, immédiatement après excrétion.

✚ *Volume des prélèvements*

D'après les données fournies un volume d'1 L est suffisant.

5.2.5. Validation de la méthode

✚ *Témoins de validation*

Fèces : 10 bovins, 10 ovins, 10 équins, 10 porcins et 10 provenant d'oiseaux sauvages.

Fumiers : 10 bovins.

✚ *Tests sur échantillons environnementaux*

Pas d'échantillons environnementaux testés.

✚ *Témoins négatifs*

Réalisation d'un témoin négatif pour chaque série d'échantillons.

📌 *Comparaison à d'autres données existantes*

Pas de comparaison.

5.2.6. Bilan

📌 *Sensibilité et spécificité sur témoins de validation*

Tableau 5 : récapitulatif des sensibilités et spécificités des marqueurs Rum-2-Bac et AllBac.

Méthode	Marqueur	Hôte	Type d'échantillon	Sensibilité (%) (nbre d'échantillons)	Spécificité (%) (nbre d'échantillons)
PCR à cible spécifique (<i>Bacteroidales</i>)	Rum-2-Bac	Ruminants (Bovins + Ovins)	Fèces	100 (20)	100 (60)
			Fumiers	90 (10)	Non testée
	AllBac	Marqueur général	Fèces	98 (60)	/
			Fumiers	100 (10)	/

📌 *Résultats et conclusions*

- ◆ Les marqueurs généraux et « ruminants » font preuve de très bonnes sensibilité et spécificité (90 à 100 %).
- ◆ Les marqueurs utilisés pour les différents hôtes ne représentent qu'une petite partie de la population de *Bacteroidales* présents chez ces hôtes (1 à 5 %). La variabilité de ces proportions en fonction de l'hôte considéré et les différences potentielles de survie dans l'environnement de ces marqueurs rendent la comparaison de niveaux de contamination issus des différents hôtes difficile.
- ◆ Cette méthode est un outil sensible et spécifique pour la recherche de l'origine des contaminations fécales. De plus, la QPCR permet un gain de temps sensible par rapport à la PCR classique en supprimant l'étape d'électrophorèse.

6. CONCLUSION GENERALE

Si l'on excepte les indicateurs physicochimiques, les indicateurs de contamination fécale alternatifs font intervenir des bactéries (souvent anaérobies strictes), des virus et des parasites. Pour l'ensemble de ces microorganismes, leur capacité à intervenir dans les démarches de recherche de source de contamination fécale est évaluée sur leur pouvoir discriminant c'est-à-dire sur leur capacité à identifier l'hôte responsable de leur excrétion et ceci sur la base de leur seule présence dans un environnement donné.

Cette notion de spécificité d'hôte est cependant étroitement liée aux outils méthodologiques utilisés. Les nouveaux outils, en particulier ceux permettant de réaliser des empreintes génétiques ou permettant de détecter et de quantifier spécifiquement certains microorganismes, ont permis de beaucoup progresser pour établir des « couples » fiables entre un hôte (un pollueur) et un genre, une espèce, une souche ou encore un génogroupe d'un microorganisme (un indicateur de pollution). L'enjeu à terme est d'associer une méthode de discrimination à un indicateur afin de pouvoir interpréter au mieux sa détection en termes d'identification du pollueur

Le rôle primordial de la méthode de caractérisation utilisée étant incontestable, il devient évident que les conclusions portées sur la fiabilité d'un indicateur ne peuvent l'être que dans le cadre de l'utilisation de cette méthode. Toute nouvelle méthodologie est en effet susceptible d'apporter une nouvelle lecture des informations apportées par les indicateurs sur l'hôte. La meilleure illustration de ceci transparait dans les bouleversements entraînés avec l'arrivée des méthodes de phénotypage puis celles de biologie moléculaire (empreintes génétiques et PCR quantitatives) ; des indicateurs faiblement discriminants avec les méthodes classiques de mise en culture ont livré des renseignements très informatifs sur la nature des rejets responsables de pollutions fécales (Ex : *Bacteroidales*).

Dans une démarche de recherche de source de contamination il est donc nécessaire de faire un double choix, celui de la méthode de caractérisation et celui du ou des microorganisme(s) indicateur(s) qui devront être étudiés. Etant donné que beaucoup des indicateurs peuvent être suivis avec les différentes méthodologies disponibles, il nous semble que dans un premier temps, le choix d'une méthode d'étude peut prévaloir sur celui des microorganismes indicateurs à mettre en œuvre.

Il existe plusieurs critères pour choisir les outils de caractérisation à privilégier, il s'agit donc d'établir un compromis entre la fiabilité des méthodes, leur facilité de mise en application, leur coût, ... Les méthodes de culture montrent des limites souvent au niveau des délais de réponse et de la fiabilité des dénombrements obtenus. Les méthodes de phénotypage et d'empreintes génétiques sont quant à elles relativement lourdes à mettre en œuvre et nécessitent un niveau d'expertise propre au laboratoire de recherche ; le transfert de ces méthodes dans des laboratoires d'analyses serait confronté à la fois à des verrous technologiques et à des coûts d'analyses importants. Les méthodes de PCR quantitatives présentent en revanche selon nous plusieurs avantages, elles sont déjà utilisées en routine dans certains laboratoires d'analyses environnementales et combinent par ailleurs un coût accessible à une rapidité de résultats. Ces éléments en font *a priori* une méthode idéale pour la caractérisation des indicateurs. Au niveau français, il existe actuellement un projet nommé MARQUOPOLEAU ⁽¹⁾ labellisé par le pôle Mer Bretagne et qui vise à mettre sur le marché des PCR quantitatives en tant qu'outils de mesures et de diagnostic permettant d'identifier l'origine humaine ou animale de la pollution fécale mais aussi le cas échéant l'espèce animale concernée.

Une fois le choix de la méthode de caractérisation des indicateurs acté, la question de la sélection des marqueurs microbiologiques se pose. Aux vues des différents éléments accumulés au cours des dernières années, certains indicateurs sont actuellement délaissés (coliphages somatiques, *Rhodococcus coprophilus*, ...), d'autres semblent posséder un potentiel mais nécessitent des travaux complémentaires (phages de *Bacteroides fragilis* BA17, *Lactobacillus amylovorus*, *Bifidobacterium*, *Giardia lamblia*, adénovirus). Enfin les derniers indicateurs sont ceux qui font l'objet d'un relatif consensus au sein des équipes de recherche qui travaillent sur le sujet. Peu de microorganismes appartiennent à la dernière catégorie, et en l'état des travaux actuels, les plus concernés sont certainement les bactéries de l'ordre des *Bacteroidales* et les phages ARN f-spécifiques. Cet état n'est pas figé, les stratégies de détermination des sources

de contamination fécale sont actuellement très étudiées dans les pays industrialisés ; de nombreuses équipes de recherche travaillent sur le sujet y compris au niveau français avec en particulier les travaux de l'IFREMER (contact : M. GOURMELON), du CEMAGREF (Contact : MP CAPRAIS) et du Laboratoire de Chimie, Physique et Microbiologie pour l'Environnement (LCPME, contact C. GANTZER).

A l'analyse des études de cas décrites dans la littérature, la combinaison d'un minimum de deux marqueurs apparaît préférable voire indispensable pour conclure. L'utilisation combinée des *Bacteroidales* et des phages ARN f-spécifiques constitue actuellement selon nous la méthode la plus pertinente. Ces deux types de microorganismes sont en effet susceptibles de permettre une distinction entre les sources de contamination d'origine humaine et celle d'origine animale. Cependant seules les méthodes axées sur les *Bacteroidales* sont pour l'heure en mesure d'approfondir le niveau de distinction jusqu'à une catégorie animale (ex : les ruminants) voire à une espèce (ex : les porcs). Ces deux microorganismes pourraient donc être utilisés en première intention. Si nécessaire d'autres microorganismes indicateurs pourraient être utilisés pour préciser le diagnostic. Dans ce cas de figure, une analyse du contexte environnemental permettant d'émettre les hypothèses les plus probables sur l'origine de la contamination, peut permettre d'orienter le choix de l'indicateur à utiliser en complément des premières analyses réalisées.

La connaissance du contexte environnemental à l'échelle d'un bassin versant par exemple est en effet un préalable indispensable pour faire aboutir une démarche d'identification des sources de contamination fécale. Pour le moment une caractérisation sur la base de quelques prélèvements réalisés dans une eau de surface avec une interprétation basée sur les quantités relatives de tel ou tel indicateur est inenvisageable. Le transfert de l'application des méthodes développées et validées dans des effluents, vers des ressources naturelles plus diluées, pose des problèmes de détection en lien avec la sensibilité des méthodes. Par ailleurs, le mélange de différents rejets qui intervient rapidement dans le milieu récepteur entraîne des difficultés au niveau de la représentativité des échantillons. C'est pourquoi les experts du domaine s'accordent à dire que l'identification des sources de contamination implique une analyse méthodique des sources de pollutions éventuelles, avec une caractérisation au plus près du point de rejet suspecté. Il convient par ailleurs de tenir compte des variations temporelles associées aux point de rejet d'où la nécessité de réaliser plusieurs campagnes.

Sur chacun des points de rejets suspectés, plusieurs niveaux d'analyses de plus en plus fins peuvent être appliqués : le premier niveau consiste à réaliser une distinction sur la base des contaminations d'origine humaine ou animale, en cas de contamination animale il est possible d'avoir recours à des marqueurs plus spécifiques pour déterminer de quels animaux il s'agit (systèmes PCR spécifiques de *Bacteroidales*). En dernier point des méthodes très discriminantes peuvent être utilisées si nécessaire pour définir l'origine précise du rejet (un élevage donné par exemple), ceci grâce à l'utilisation de méthodes génotypiques mais aussi phénotypiques très précises.

⁽¹⁾ <http://www.pole-mer-bretagne.com/marquopoleau.php>

7. SYNTHÈSE

Comme le montre les évolutions récentes de la réglementation, le maintien de la qualité des eaux de baignade et des eaux des bassins conchylicoles constitue un enjeu tout aussi important que la préservation des réservoirs d'eau à potabiliser. Certains de ces environnements hydriques sont soumis à une forte pression anthropique (rejets urbains ou agricoles) et la recherche des bactéries fécales indicatrices telle que définie par la réglementation, permet d'identifier les ressources contaminées. Ainsi, les coliformes thermotolérants (en particulier *Escherichia coli*), les Entérocoques, et dans une moindre mesure les clostridies (notamment l'espèce *Clostridium perfringens*) sont des indicateurs usuels et pertinents pour statuer sur la survenue de contaminations fécales significatives. Cependant, ces microorganismes sont aussi bien présents dans le tractus intestinal des hommes que dans celui des animaux et leur dénombrement avec les méthodes réglementaires actuelles ne permet pas de distinguer l'origine précise de la pollution. Des méthodes d'interprétation basées sur le calcul d'un ratio entre le nombre de coliformes thermotolérants et le nombre d'Entérocoques ont été proposées mais n'ont pas donné satisfaction. Ainsi, il apparaît que les méthodes réglementaires de détection des pollutions fécales s'avèrent utiles pour révéler et éliminer les sources de pollutions les plus évidentes, mais sont inadaptées pour identifier les sources de pollution moins importantes, plus diverses et plus diffuses. Ce constat a incité l'Agence de l'eau Adour Garonne à demander une analyse bibliographique pour déterminer quelles techniques/méthodes pourraient être susceptibles d'aider les gestionnaires des milieux aquatiques à préciser l'origine des contaminations fécales afin de pouvoir y remédier. Sur la base de différents critères tels que le coût, le potentiel discriminant, la faisabilité technique, et les retours d'information disponibles à partir d'études de cas françaises ; une comparaison des différentes méthodologies disponibles a été réalisée pour sélectionner les outils qui semblent à privilégier actuellement.

L'étude bibliographique a montré que de nombreux indicateurs microbiologiques alternatifs sont disponibles. Certains sont actuellement délaissés (coliphages somatiques, *Rhodococcus coprophilus*, ...), d'autres nécessitent des travaux complémentaires (phages de *Bacteroides fragilis* BA17, *Lactobacillus amylovorus*, *Bifidobacterium*, *Giardia lamblia*, Adénovirus). Enfin, un relatif consensus existe sur l'intérêt des bactéries de l'ordre des *Bacteroidales* et des phages ARN f-spécifiques dans la recherche des sources de contamination fécale. L'élargissement du panel d'indicateurs provient de progrès analytiques récents et importants qui non seulement ont rendu possible l'étude de microorganismes difficilement cultivables mais qui ont aussi permis d'approfondir l'analyse des spécificités d'hôtes. Il doit donc être gardé à l'esprit que l'intérêt de tel ou tel indicateur est fonction de la méthode d'étude utilisée et que toute nouvelle avancée technique est susceptible de faire évoluer dans le futur la diversité et la pertinence des différents indicateurs.

En ce qui concerne le volet strictement analytique, il apparaît que les méthodes de caractérisation des indicateurs ont été marquées par deux virages méthodologiques importants. Le premier virage porte sur l'évolution des méthodes de caractérisation des microorganismes cultivables des échantillons environnementaux : celles-ci se sont progressivement déportées des techniques de phénotypage vers celles de génotypage. Les méthodes phénotypiques essentiellement basées sur l'étude des résistances aux antibiotiques et sur l'étude de l'assimilation des substrats carbonés ont été progressivement délaissées car leur interprétation nécessitait de mettre en place des bases de données conséquentes qui devaient être régulièrement actualisées. Quant à elles, les méthodes de génotypage produisent des empreintes génétiques qui permettent des comparaisons très fines de souches présentes dans des fèces et des effluents. De part le niveau de technicité requis dans la mise en œuvre et l'interprétation, le génotypage par ribotypage, PFGE ou AFLP semble difficile à utiliser en dehors du cadre des laboratoires experts ; le génotypage par rep-PCR et RAPD est certainement plus abordable en routine mais le recours à une phase de culture et à la constitution d'une base de données reste nécessaire. Il en résulte un manque de souplesse dans les applications en routine. De ce fait, les méthodes basées sur la culture et l'utilisation de bases de données tendent à être abandonnées au profit des méthodes de PCR à cibles spécifiques qui s'affranchissent de ces deux contraintes. Ces méthodes autorisent l'étude directe des acides nucléiques obtenus à partir des échantillons en permettant le plus souvent la mise en évidence et la quantification de génotypes spécifiques d'hôtes. Les études disponibles récentes confirment que les méthodes de PCR quantitatives permettent de définir des marqueurs spécifiques, à l'Homme, à l'Animal ou à des espèces animales spécifiques. Les verrous

technologiques qui limitaient il y a quelques années l'utilisation de cette méthode sont à présent en passe d'être totalement levés et du fait d'un coût abordable son utilisation dans les laboratoires se banalise. L'application des méthodes de PCR quantitatives aux bactéries anaérobies largement majoritaires dans les fèces semble constituer à l'heure actuelle la meilleure méthode d'investigation.

L'analyse d'études de cas françaises décrites dans la littérature, montre que les méthodes de PCR quantitatives apportent effectivement des résultats probants. Elle montre également que l'étude simultanée d'un minimum de deux marqueurs apparaît préférable voire indispensable pour conclure. L'utilisation combinée des *Bacteroidales* et des phages ARN f-spécifiques constitue actuellement selon nous la méthode la plus pertinente. Ces deux types de microorganismes sont en effet susceptibles de permettre une distinction entre les sources de contamination d'origine humaine et celle d'origine animale. Cependant seules les méthodes axées sur les *Bacteroidales* sont pour l'heure en mesure d'approfondir le niveau de distinction jusqu'à une catégorie animale (ex : les ruminants) voire à une espèce (ex : les porcs). Ces deux microorganismes pourraient donc être utilisés en première intention. Si nécessaire, dans un second temps, d'autres microorganismes indicateurs pourraient être employés en complément pour affiner le diagnostic. Dans ce cas de figure, le choix de l'indicateur complémentaire à étudier doit être orienté à partir des hypothèses les plus probables sur l'origine de la contamination.

Au-delà des éléments techniques et méthodologiques, la connaissance du contexte environnemental (à l'échelle d'un bassin versant par exemple), est un préalable indispensable pour faire aboutir une démarche d'identification des sources de contamination fécale. Pour le moment une caractérisation sur la base de quelques prélèvements réalisés dans une eau de surface avec une interprétation basée sur les quantités relatives de tel ou tel indicateur est inenvisageable. Le transfert de l'application des méthodes développées et validées dans des effluents, vers des ressources naturelles plus diluées, pose des problèmes de détection en lien avec la sensibilité des méthodes. Par ailleurs, le mélange de différents rejets qui intervient rapidement dans le milieu récepteur entraîne des difficultés au niveau de la représentativité des échantillons. C'est pourquoi les experts du domaine s'accordent à dire que l'identification des sources de contamination implique une analyse méthodique des sources de pollutions éventuelles, avec une caractérisation au plus près du point de rejet suspecté. De même, afin de tenir compte des variations temporelles qui affectent les points de rejets la réalisation de plusieurs campagnes apparaît comme nécessaire.

Actuellement il nous semble que la démarche de recherche de sources de contamination fécale peut se décomposer comme suit : sur chacun des points de rejets suspectés, plusieurs niveaux d'analyses de plus en plus fins peuvent être appliqués : le premier niveau consiste à réaliser une distinction sur la base des contaminations d'origine humaine ou animale, en cas de contamination animale il est possible d'avoir recours à des marqueurs plus spécifiques pour déterminer de quels animaux il s'agit (systèmes PCR spécifiques de *Bacteroidales*). En dernier point des méthodes très discriminantes peuvent être utilisées si nécessaire pour définir l'origine précise du rejet (un élevage donné par exemple), ceci grâce à l'utilisation de méthodes génotypiques et/ou phénotypiques très précises.

8. RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

AESN, 1997. Recherche des bactériophages et des indicateurs bactériens de contamination fécale dans les eaux de baignades en mer. Etude 97LITT 10 / D18803.

AESN, 1998. Pré-étude pour le suivi de la pollution microbiologique au sein des exploitations d'élevage. Etude 98LITT 4.

AESN, 1999. Suivi de la pollution microbiologique au sein des exploitations d'élevage - phase II. 99LITT 11.

Afnor, septembre 2000. NF EN ISO 9308-1 : Qualité de l'eau - Recherche et dénombrement des *Escherichia coli* et des bactéries coliformes - Partie 1 : méthode par filtration sur membrane.

Afnor, mars 1999. NF EN ISO 9308-3 : Qualité de l'eau - Recherche et dénombrement des *Escherichia coli* et des bactéries coliformes dans les eaux de surface et résiduaires - Partie 3 : méthode miniaturisée (nombre le plus probable) pour ensemencement en milieu liquide.

Afnor, mars 1999. NF EN ISO 7899-1 : Qualité de l'eau - Recherche et dénombrement des Entérocoques intestinaux dans les eaux de surface et résiduaires - Partie 1 : méthode miniaturisée (nombre le plus probable) par ensemencement en milieu liquide

Afnor, août 2000. NF EN ISO 7899-2 : Qualité de l'eau - Recherche et dénombrement des Entérocoques intestinaux - Partie 2 : méthode par filtration sur membrane

Afnor, juillet 1993. NF EN 26461-2 : Qualité de l'eau - Recherche et dénombrement des spores de micro-organismes anaérobies sulfito-réducteurs (clostridia) - Partie 2 : méthode par filtration sur membrane

Anderson MA., Whitlock JE., Harwood VJ., 2006. Diversity and distribution of *Escherichia coli* genotypes and antibiotic resistance phenotypes en feces of humans, cattle and horses. Appl. Environ. Microbiol. 72 :6914-6922.

Araujo R., Muniesa M., Méndez J., Puig A., Queralt N., Lucena F., Jofre J., 2001. Optimisation and standardisation of a method for detecting and enumerating bacteriophages infecting *Bacteroides fragilis*. J Virol Methods. 93 (1-2) : 127-36.

Awad-El-Kariem FM., Robinson HA., Petry F., McDonald V., Evans D., Casemore D., 1998. Differentiation between human and animal isolates of *Cryptosporidium parvum* using molecular and biological markers. Parasitol Res., 84 (4) : 297-301.

Bertrand I., Albertini L., Schwartzbrod J., 2005. Comparison of two target genes for detection and genotyping of *Giardia lamblia* in human feces by PCR and PCR-restriction fragment length polymorphism. J Clin Microbiol., 43 (12) : 5940-4.

Bertrand I., Schwartzbrod J., 2007. Detection and genotyping of *Giardia duodenalis* in wastewater: relation between assemblages and faecal contamination origin. Water Res., 41 (16) : 3675-82.

Bitton G., 2005. Microbial indicators of fecal contamination : application to microbial source tracking. Rapport, 71 pp.

Blanch A., Belanche-Munoz L., Bonjoch X., Ebdon J., Gantzer C., Lucena F., Ottoson J., Kourtis C., Iversen A., Kühn I., Mose L., Muniesa M., Schwartzbrod J., Skraber S., Papageorgiou G., Taylor H., Wallis J., Jofre J., 2004. Tracking the origin of faecal pollution in surface water : on ongoing project within the European Union Research programme. Journal of water and health, 2 (4) : 249-260.

Blanch AR., Belanche-Muñoz L., Bonjoch X., Ebdon J., Gantzer C., Lucena F., Ottoson J., Kourtis C., Iversen A., Kühn I., Mocé L., Muniesa M., Schwartzbrod J., Skraber S., Papageorgiou GT., Taylor H., Wallis J., Jofre J., 2006. Integrated analysis of established and novel microbial and chemical methods for microbial source tracking. *Appl Environ Microbiol.*, 72 (9) : 5915-26.

Bofill-Mas S., Pina S., Girones R., 2000. Documenting the epidemiologic patterns of polyomaviruses in human populations by studying their presence in urban sewage. *Appl Environ Microbiol.*, 72 (9) : 5915-26.

Bofill-Mas S., Albinana-Gimenez N., Clemente-Casares P., Hundesa A., Rodriguez-Manzano J., Allard A., Calvo M., Girones R., 2006. Quantitation and stability of human adenoviruses and polyomavirus JCpV in wastewater matrices. *Appl. Environ. Microbiol.*, 72:7894-7896.

Bonjoch X., Balleste E., Blanch AR., 2004. Multiplex PCR with 16S rRNA gene-targeted primers of *Bifidobacterium* spp. to identify sources of fecal pollution. *Appl. Environ. Microbiol.* 70 (5) : 3171-3175.

Bonjoch X., Balleste E., Blanch A.R., 2005. Enumeration of bifidobacterial populations with selective media to determine the source of waterborne faecal pollution. *Water Res* 39, 1621-1627.

Bonjoch X, Lucena F, Blanch AR., 2009. The persistence of Bifidobacteria populations in a river measured by molecular and culture techniques. *J. Appl. Microbiol.*, 107 (4) :1178-85.

Bonnin A., Fourmaux MN., Dubremetz JF., Nelson RG., Gobet P., Harly G., Buisson M., Puygauthier-Toubas D., Gabriel-Pospisil G., Naciri M., Camerlynck P., 1996. Genotyping human and bovine isolates of *Cryptosporidium parvum* by polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism analysis of a repetitive DNA sequence. *FEMS Microbiol. Lett.* Apr 1;137(2-3):207-11.

Carson CA., Shear BL., Ellersieck, MR., Schnell JD., 2003. Comparison of ribotyping and repetitive extragenic palindromic-PCR for identification of fecal *Escherichia coli* from humans and animals. *Appl. Environ. Microbiol.*, 69:1836-1839.

Chern EC., Tsai YL., Olson BH., 2004. Occurrence of genes associated with enterotoxigenic and enterohemorrhagic *Escherichia coli* in agricultural waste lagoons. *Appl. Environ. Microbiol.* 70:356-362.

Cho JC., Kim SJ., 2000. Increase in bacterial community diversity in subsurface aquifers receiving livestock wastewater input. *Appl. Environ. Microbiol.* 66:956-965.

Colford JM., Wade TJ., Schiff KC., Wright CC., Griffith JF., Sandhu SK., Burns S., Sobsey M., Lovelace G., Weisberg SB., 2007. Water quality indicators and the risk of illness at beaches with nonpoint sources of fecal contamination. *Epidemiology* 18 (1): 27-35.

Costán-Longares A., Montemayor M., Payán A., Méndez J., Jofre J., Mujeriego R., Lucena F., 2008. Microbial indicators and pathogens: removal, relationships and predictive capabilities in water reclamation facilities. *Water Res.*, 42 (17) : 4439-48.

Desmarais TR., Solo-Gabriele HM., Palmer CJ., 2002. Influence of soil on fecal indicator organisms in a tidally influenced subtropical environment. *Appl. Environ. Microbiol.* 68:1165-1172.

Dick LK., Field KG., 2004. Rapid estimation of numbers of fecal *Bacteroidetes* by use of a quantitative PCR assay for 16S rRNA genes. *Appl. Environ. Microbiol.*, 70:5695-5697.

Dombek PE., Johnson LK., Zimmerley ST., Sadowsky MJ., 2000. Use of repetitive DNA sequences and the PCR to differentiate *Escherichia coli* isolates from human and animal sources. *Appl. Environ. Microbiol.*, 66:2572-2577.

Duran AE., Muniesa M., Mendez X., Valero F., Lucena F., Jofre J., 2002. Removal and inactivation of indicator bacteriophages in fresh waters. *Journal of Applied Microbiology* 92 (2): 338-347.

EPA, 2005. Microbial Source Tracking Guide Document, EPA/600/R-05/064, 123 pages. Disponible en ligne : <http://www.epa.gov/nrmrl/pubs/600r05064/600r05064.pdf>

Field KG, Samadpour M., 2007. Fecal source tracking, the indicator paradigm and managing water quality. *Water Res.*, 41 (16) : 3517-38.

Fiksdal L., Maki JS., Lacroix SJ., Staley JT., 1985. Survival and detection of *Bacteroides spp.*, prospective indicator bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.*, 49 :148-150.

Fong TT., Lipp EK., 2005. Enteric viruses of humans and animals in aquatic environments: health risks, detection, and potential water quality assessment tools. *Microbiol Mol Biol Rev.*, 69 (2) : 357-71.

Geldreich EE., Kenner BA., 1969. Concepts of fecal streptococci in stream pollution. *J. Water Pollut. Control Fed.* 41 : R336-R352.

Gilpin BJ., Gregor JE., Savill MG., 2002. Identification of the source of faecal pollution in contaminated rivers. *Water Sci. Technol.* 46 (3): 9-15.

Gourmelon M., Caprais M.P., Segura R., Le Mennec C., Lozach S., Piriou JY., Rince A., 2007. Evaluation of two library-independent microbial source tracking methods to identify sources of fecal contamination in French estuaries. *Applied and Environmental Microbiology*, 73 (15) : 4857-4866.

Grabaw WOK., Neubrech TE., Haltzhausen CS., Jofre J., 1995. *Bacteroides fragilis* and *E. coli* bacteriophages : excretion by humans and animals. *Water Res.*, 31: 223-230.

Hagedorn, C., Robinson SL., Filtz JR., Grubbs SM., Angier TA., Reneau RB., 1999. Using antibiotic resistance patterns in the fecal streptococci to determine sources of fecal pollution in a rural Virginia watershed. *Appl. Environ. Microbiol.* 65:5522-5531.

Hagedorn C., Crozier JB., Mentz KA., Booth AM., Graves AK., Nelson NJ., Reneau Jr RB., 2003. Carbon source utilization profiles as a method to identify faecal pollution in water. *J. Appl. Microbiol.*, 94:792-799.

Hammermueller J., Kruth S., Prescott J., Gyles C., 1995. Detection of toxin genes in *Escherichia coli* isolated from normal dogs and dogs with diarrhea. *Can. J. Vet. Res.* 59:265-270.

Harwood VJ., Whitlock J., Withington V., 2000. Classification of antibiotic resistance patterns of indicator bacteria by discriminant analysis: use in predicting the source of fecal contamination in subtropical waters. *Appl. Environ. Microbiol.* 66:3698-3704.

Harwood VJ., Wiggins B., Hagedorn C., Ellender RD., Gooch J., Kern J., Samadpour M., Chapman ACH., Robinson BJ., Thompson BC., 2003. Phenotypic library-based microbial source tracking methods: efficacy in the California collaborative study. *J. Wat. Health* 1: 153-166.

Haslay C., Leclerc H., 1993. Microbiologie des eaux d'alimentation. Tec & Doc, Ed. Lavoisier. 495 pp.

Havelaar AH., Van Olphen M., Drost YC., 1993. F-specific RNA bacteriophages are adequate model organisms for enteric viruses in fresh water. *Appl Environ Microb*, 59 : 2956-2962.

Hsu FC., Shieh YS., van Duin J., Beekwilder MJ., Sobsey MD., 1995. Genotyping male-specific RNA coliphages by hybridization with oligonucleotide probes. *Appl. Environ. Microbiol.* 61: 3960-3966.

Hundesda A., Maluquer de Motes C., Bofill-Mas S., Albinana-Gimenez N., Girones R., 2006. Identification of human and animal adenoviruses and polyomaviruses for determination of sources of fecal contamination in the environment. *Appl Environ Microbiol.* 72 (12) : 7886-93.

Hundesda A., Maluquer de Motes C., Albinana-Gimenez N., Rodriguez-Manzano J., Bofill-Mas S., Suñen E., Rosina Girones R., 2009. Development of a qPCR assay for the quantification of porcine adenoviruses as an MST tool for swine fecal contamination in the environment. *J Virol Methods.*, 158 (1-2) : 130-5.

Jiang SC., Chu W., Olson BH., He JW., Choi S., Zhang J., Le JY., Gedalanga PB., 2007. Microbial source tracking in a small southern California urban watershed indicates wild animals and growth as the source of fecal bacteria. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 76:927-934.

Johnson LK., Brown MB., Carruthers EA., Ferguson JA., Dombek PE., Sadowsky MJ., 2004. sample size, library composition, and genotypic diversity among natural population of *Escherichia coli* from different animals influences accuracy of determining sources of fecal pollution. *Appl. Environ. Microbiol.* 70:4478-4485.

Khatib LA., Tsai YL., Olson BH., 2003. A biomarker for the identification of swine fecal pollution in water using the STII toxin gene from enterotoxigenetic *Escherichia coli*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 63:231-238.

Kott Y., Roze N., Sperber S., Betzer N., 1974. Bacteriophages as viral pollution indicators. *Water Research* 8 (3) : 165-171.

Kreader CA., 1995. Design and evaluation of *Bacteroides* DNA probes for specific detection of human fecal pollution. *Appl. Environ. Microbiol.* 61, 1171-1179.

Krumperman PH., 1983. Multiple antibiotic resistance indexing of *Escherichia coli* to identify high-risk sources of fecal contamination of foods. *Appl. Environ. Microbiol.* 46 : 165-170.

(Mc) Lain JE., Ryu H., Kabiri-Badr L., Rock CM., Abbaszadegan M., 2009. Lack of specificity for PCR assays targeting human *Bacteroides* 16S rRNA gene: cross-amplification with fish feces. *FEMS Microbiol Lett.* (Version électronique en attente de parution)

Layton A., McKay L., Williams D., Garrett V., Gentry R., Sayler G., 2006. Development of *Bacteroides* 16S rRNA gene TaqMan-based real-time PCR assays for estimation of total, human, and bovine fecal pollution in water. *Appl Environ Microbiol.* 72 (6) : 4214-24.

Lee YJ., Molina M., Santo-Domingo JW., Willis JD., Cyterski M., Endale DM., Shanks OC., 2008. Temporal assessment of the impact of exposure to cow feces in two watersheds by multiple host-specific PCR assays. *Appl. Environ. Microbiol.*, 74:6839-6847.

Leser TD., Amenuvor JZ., Jensen TK., Lindecrone RH., Boye M., Møller K., 2002. Culture-independent analysis of gut bacteria: the pig gastrointestinal tract microbiota revisited. *Appl Environ Microbiol.*, 68 (2) : 673-90.

Lodder WJ., de Roda Husman AM., 2005. Presence of noroviruses and other enteric viruses in sewage and surface waters in The Netherlands. *Applied and Environmental Microbiology* 71 (3): 1453-1461

Long SC., Arango PC., Plummer JD., 2005. An optimized enumeration method for sorbitol-fermenting Bifidobacteria in water samples. *Can. J. Microbiol.*, 51 (5) : 413-422.

Lucena F., Mendez X., Moron A., Calderon E., Campos C., Guerrero A., Cardenas M., Gantzer C., Shwartzbrood L., Skraber S., Jofre J., 2003. Occurrence and densities of bacteriophages proposed as indicators and bacterial indicators in river waters from Europe and South America. *Journal of Applied Microbiology* 94 (5) : 808-815.

Lynch PA., Gilpin BJ., Sinton LW., Savill MG., 2002. The detection of *Bifidobacterium adolescentis* by colony hybridization as an indicator of human faecal pollution. *J. Appl. Microbiol.* 92, 526-533.

Manafi M., Sommer R., 1993. Rapid identification of Enterococci with a new fluorogenic-chromogenic assay. *Water Sci. Technol.*, 27 : 271-274.

Mandilara GD., Smeti EM., Mavridou AT., Lambiri MP., Vatopoulos AC., Rigas FP., 2006. Correlation between bacterial indicators and bacteriophages in sewage and sludge. FEMS Microbiology Letters 263 (1) : 119-126.

Mara DD., Oragui J., 1981. Occurrence of *Rhodococcus coprophilus* and Actinomycetes in feces, sewage, and freshwater. Appl. Environ. Microbiol., 42:1037-1042.

Mara DD., Oragui JL., 1983. Sorbitol-fermenting bifidobacteria as specific indicators of human faecal pollution. Journal of Applied Bacteriology, 55, 349-357

Martellini A., Payment P., Villemur R. 2005. Use of eukaryotic mitochondrial DNA to differentiate human, bovine, porcine and ovine sources infecally contaminated surface water ; Wat. Res. 39:541-548.

Marti R., Dabert P., Pourcher AM., 2009. Pig manure contamination marker selection based on the influence of biological treatment on the dominant fecal microbial groups. Appl Environ Microbiol., 75 (15) : 4967-74.

Marvin C., Coakley J., Mayer T., Brown M., Thiessen L., 2001. Water quality research journal of Canada, 36, 781-792.

Matsuki T., Watanabe K., Tanaka R., Fukuda M., Oyaizu H., 1999. Distribution of bifidobacterial species in human intestinal microflora examined with 16S rRNA gene-targeted species-specific primers. Appl Environ Microbiol, 65 : 4506-4512.

Matsuki TK., Watanabe K., Fujimoto J., Miyamoto Y., Takada T., Matsumoto K., Tanaka R., 2004. Quantitative PCR with 16S rRNA-gene-targeted species-specific primers for analysis of human intestinal Bifidobacteria. Appl. Environ. Microbiol. 70:167-173.

Mieszkin S., Furet JP., Corthier G., Gourmelon M., 2009a. Estimation of pig fecal contamination in a river catchment by real-time PCR using two pig-specific *Bacteroidales* 16S rRNA genetic markers. Appl Environ Microbiol., 75 (10) : 3045-54.

Mieszkin S., Yala JF., Joubrel R., Gourmelon M., 2009b. Phylogenetic analysis of *Bacteroidales* 16S rRNA gene sequences from human and animal effluents and assessment of ruminant faecal pollution by real-time PCR. J Appl Microbiol. (Version électronique en attente de parution).

Nebra Y., Bonjoch X., Blanch AR., 2003. Use of *Bifidobacterium dentium* as an indicator of the origin of fecal water pollution. Appl. Environ. Microbiol., 69 (5) : 2651-2656.

Noble RT., Allen SA., Blackwood AD., Chu W., Jiang SC., Lovelace GL., Sobsey MD., Stewart JR., Wait DA., 2003. Use of viral pathogens and indicators to differentiate between human and non-human fecal contamination in a microbial source tracking comparison study. J. Wat. Health. 1:195-204.

Ogorzaly L., Gantzer C., 2006. Development of real-time RT-PCR methods for specific detection of F-specific RNA bacteriophage genogroups: application to urban raw wastewater. J. Virol. Methods., 138 (1-2) : 131-9.[Erratum in : J Virol Methods. 2007 Jul ; 143 (1) :122].

Ogorzaly L., Tissier A., Bertrand I., Maul A., Gantzer C., 2009. Relationship between F-specific RNA phage genogroups, faecal pollution indicators and human adenoviruses in river water. Water Res., 43 (5) :1257-64.

Ogorzaly L., 2009. Intérêt du génotypage des phages ARN f-spécifiques pour estimer la pollution fécale et virale des eaux. Thèse de doctorat, LCPME, 203 pages.

OMS, 1994. Directives de qualité de l'eau de boisson, 2è ed., Vol. 1: Recommandations, Genève, pp. 8-30. Page ressource : http://www.who.int/water_sanitation_health/IDQEB/microbiolog.htm

OMS, 2003. Assessing microbial safety of drinking water, improving approaches and methods. IWA publishing. <http://www.wpro.who.int/internet/files/eha/toolkit/web/Technical%20References/Environmental%20Health/Assessing%20microbial%20safety%20for%20drinking%20water.pdf>

Oragui JI., Mara DD., 1983. Investigation of the survival characteristics of *Rhodococcus coprophilus* and certain fecal indicator bacteria. Appl Environ Microbiol., 46 (2) : 356-360.

Parveen S., Murphree RL., Edmiston L., Kaspar CW., Portier KM., Tamplin ML., 1997. Association of multiple-antibiotic-resistance with point and non-point sources of *Escherichia coli* in Apalachicola Bay. Appl. Environ. Microbiol. 63:2607-2612.

Payan A., Ebdon J., Taylor H., Gantzer C., Ottoson J., Papageorgiou GT., Blanch AR., Lucena F., Jofre J., Muniesa M., 2005. Method for isolation of *Bacteroides* bacteriophage host strains suitable for tracking sources of fecal pollution in water. Applied and Environmental Microbiology 71 (9) : 5659-5662.

Pourcher AM., Devriese LA., Hernandez JF., Delattre JM., 1991. Enumeration by a miniaturized method of *Escherichia coli*, *Streptococcus bovis* and enterococci as indicators of the origin of faecal pollution of waters. J. Applied Bacteriol, 70 : 525-530.

Puig A., Queralt N., Jofre J., et Araujo R., 1999. Diversity of *Bacteroides fragilis* strains in their capacity to recover phages from human and animal wastes and from faecally polluted wastewater. Appl. Environ. Microbiol. 65:1772-1776

Reischer GH., Kasper DC., Steinborn R., Farnleitner AH., Mach RL. 2007. A quantitative real-time PCR assay for the highly sensitive and specific detection of human faecal influence in spring water from a large alpine catchment area. Lett. Appl. Microbiol. 44 :351-356.

Resnick IG., Levin MA., 1981. Assessment of bifidobacteria as indicators of human fecal pollution. Appl. Environ. Microbiol., 42 :433-438.

Rogers IH., Birtwell IK., Kruzynski GM., 1986. Organic extractables in municipal wastewater. Can. J. Water Pollut. Res. 21:187-204.

Savill MG., Murray SR., Scholes P., Maas EW., McCormick RE., Moore EB., Gilpin BJ., 2001. Application of polymerase chain reaction (PCR) and TaqMan PCR techniques to the detection and identification of *Rhodococcus coprophilus* in faecal samples. J Microbiol Methods., 47 (3) : 355-68

Savichtcheva O., Okabe S., 2006. Alternative indicators of fecal pollution: relations with pathogens and conventional indicators, current methodologies for direct pathogen monitoring and future application perspectives. Water Res. 40 (13) : 2463-76.

Scott TM, Rose JB, Jenkins TM, Farrah SR, Lukasik J., 2002. Microbial source tracking: current methodology and future directions. Appl Environ Microbiol., 68 (12) : 5796-803.

Scott TM., Jenkins TM., Lukasik J., Rose JB., 2005. Potential use of a host associated molecular marker in *Enterococcus faecium* as an index of human fecal pollution. Environ. Sci; Technol. 39:283-287.

Schaper M., Jofre J., Uys M., Grabow WO., 2002. Distribution of genotypes of F-specific RNA bacteriophages in human and non-human sources of faecal pollution in South Africa and Spain. J Appl Microbiol., 92 (4) : 657-67.

Seurinck S., Defoirdt T., Verstraete W., Siciliano SD., 2005. Detection and quantification of the human-specific HF183 *Bacteroides* 16S rRNA genetic marker with real-time PCR for assessment of human faecal pollution in freshwater. Environ. Microbiol. 7:249-259.

Simpson JM., Santo Domingo JW., Reasoner DJ., 2004. Assessment of equine fecal contamination: the search for alternative bacterial source-tracking targets; FEMS Microbiol. Ecol. 47:65-75.

Skraber S., 2003. Intérêt des bactériophages en tant que témoin de contamination fécale et de présence de virus entériques pathogènes dans les eaux de la rivière Moselle. LCPME, Thèse de doctorat, 211 p.

Stricker AR., Wilhartitz I., Farnleitner AH., Mach RL., 2008. Development of a Scorpion probe-based real-time PCR for the sensitive quantification of *Bacteroides sp.* ribosomal DNA from human and cattle origin and evaluation in spring water matrices. Microbiol Res., 163 (2) :140-7

Tartera C., Jofre J., 1987. Bacteriophages active against *Bacteroides fragilis* in sewage-polluted waters. Appl Environ. Microbiol. 53:1632-1637.

Ting WT., Johnson D., Holler A., Tran K., Tseng C., 2003. A study of the sources of *E. coli* contamination at Marquette Park Beach by random amplified polymorphic DNA typing. Annual meeting of the American Society for microbiology, Washington, D.C.

Tsai YL., Le JY., Olson BH., 2003. Magnetic bead hybridization to detect enterotoxigenic *Escherichia coli* strains associated with cattle in environmental water sources. Can. J. Microbiol. 49:391:398.

Tynkkynen S., Satokari R., Saarela M., Mattila-Sandholm T., Saxelin M., 1999. Comparison of ribotyping, randomly amplified polymorphic DNA analysis, and pulsed-field gel electrophoresis in typing of *Lactobacillus rhamnosus* and *L. casei* strains. Appl. Environ. Microbiol, 65 (9) : 3908-3914.

Vancanneyt M., Lombardi A., Andrighetto C., Knijff E., Torriani S., Björkroth JK., Franz C., Foulquié Moreno MR., Revets H., De Vuyst L., Swings J., Kersters K., Dellaglio F., Holzapfel WH., 2002. Intraspecies Genomic Groups in *Enterococcus faecium* and Their Correlation with Origin and Pathogenicity. Appl. Environ. Microbiol. 68 : 1381-1391.

Wait DA., Sobsey MD., 2001. Comparative survival of enteric viruses and bacteria in Atlantic Ocean seawater. Water Sci Technol., 43 (12) : 139-42.

Whitehead TR., Cotta MA., 2000. Development of molecular methods for identification of *Streptococcus bovis* from human and ruminal origins. FEMS Microbiol. Lett. 182:237-240.

Wiedenmann A., Krüger P., Dietz K., López-Pila JM., Szewzyk R., Botzenhart K., 2006. A randomized controlled trial assessing infectious disease risks from bathing in fresh recreational waters in relation to the concentration of *Escherichia coli*, intestinal enterococci, *Clostridium perfringens*, and somatic coliphages. Environ Health Perspect., 114 (2) :228-36.

Wiggins BA., 1996. Discriminant analysis of antibiotic resistance patterns in fecal streptococci, a method to differentiate human and animal sources of fecal pollution in natural waters. Appl. Environ. Microbiol. 62 : 3997- 4002.

Wiggins BA., Andrews RW., Conway RA., Corr CL., Dobratz EJ., Dougherty DP., Eppard JR., Knupp SR., Limjoco MC., Mettenburg JM., Rinehardt JM., Sonsino J., Torrijos RL., Zimmerman ME., 1999. Use of antibiotic resistance analysis to identify nonpoint sources of fecal pollution. Appl. Environ. Microbiol., 65 :3483-3486.

Wolf S, Hewitt J, Rivera-Aban M, Greening GE., 2008. Detection and characterization of F+ RNA bacteriophages in water and shellfish: application of a multiplex real-time reverse transcription PCR. J Virol Methods., 149 (1) : 123-8.

Woody MA., Cliver DO., 1995. Effects of temperature and host cell growth phase on replication of F-specific RNA coliphage QB. Appl. Environ. Microbiol., 61: 1520-1526.

Zmirou D., Ferley JP., Balducci F., Baleux B., Fera P., Larbaigt G., Jacq E., Moissonnier B., Blineau A., Boudot J., 1990. Evaluation of microbial indicators of health risk related to river swimming places. Rev Epidemiol Sante Publique, 38 (2) :101-10.

Zmirou D., Pena L., Ledrans M., Letertre A., 2003. Risks associated with the microbiological quality of bodies of fresh and marine water used for recreational purposes: summary estimates based on published epidemiological studies. Arch Environ Health., 58 (11) : 703-11.

9. AUTRES RÉFÉRENCES UTILES

MARQUOPOLEAU : détecter l'origine de la pollution des eaux littorales. Projet labellisé par le Pôle Mer Bretagne

<http://www.pole-mer-bretagne.com/marquopoleau.php>

