

# 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

### - SYNTHÈSE DE L'ÉTUDE -

| Version | Etat      | Date     | Rédigé par             | Vérifié par |
|---------|-----------|----------|------------------------|-------------|
| 1       | Définitif | 10/02/10 | T. PARIS<br>T. CHESNOT | M. BOUALAM  |

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

## 1. 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.