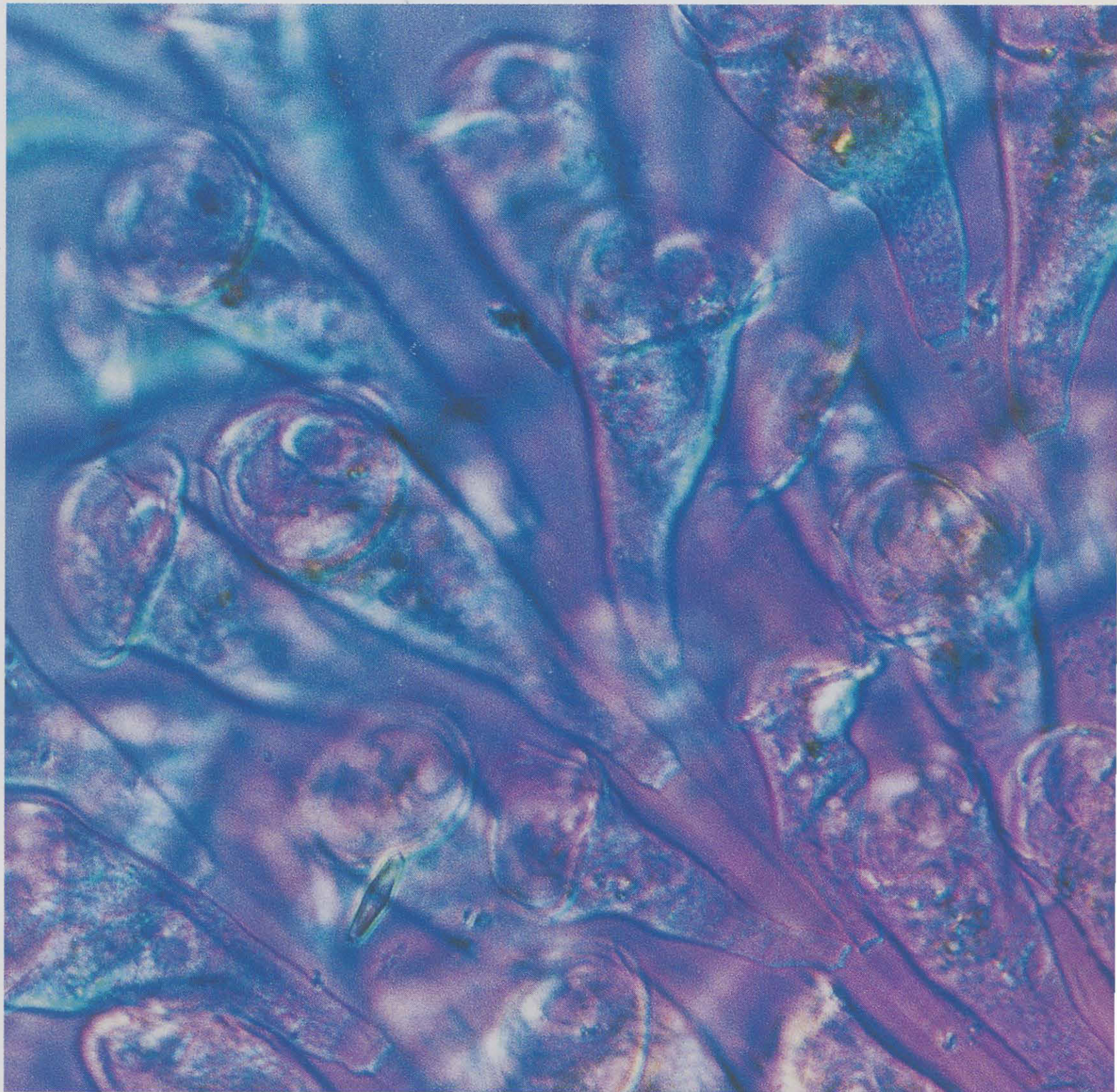


Programme scientifique Seine-Aval

6 • Contaminations bactérienne et virale

Coordinateur
Pierre Servais

6 - Contaminations
bactérienne et virale



6

Programme scientifique
Seine-Aval



Ifremer



571
RES



Présentation du programme Seine-Aval

Seine-Aval est un programme d'études et de recherches interdisciplinaires à caractère appliqué sur l'estuaire de la Seine qui a débuté en 1995. La zone d'étude couvre les 160 km de Poses (en amont de Rouen) à la baie de Seine.

Il réunit plus d'une centaine de chercheurs dans des disciplines aussi diverses que la physique, la géologie, la chimie, l'écologie, l'écotoxicologie, appartenant à plus d'une vingtaine de laboratoires répartis sur l'ensemble du territoire national et en Belgique.

Le programme Seine-Aval est piloté par un comité exécutif constitué par un directeur, M. Louis-Alexandre Romaña, et trois membres, MM. Daniel Cossa, Ghislain de Marsily et Robert Meyer.

Les objectifs principaux fixés au programme Seine-Aval sont de fournir les connaissances nécessaires à la compréhension du fonctionnement de l'écosystème estuarien et de développer des outils d'aide à la décision pour les acteurs régionaux et nationaux :

- dans l'optique d'une restauration de la qualité des eaux de la Seine et de la préservation des milieux naturels de la vallée,
- dans le souci de concilier les différents usages identifiés.

Pour structurer la démarche opérationnelle, quatre axes de recherche ont été développés :

▮ **Hydrodynamique et transport sédimentaire** : sont concernés le régime des eaux, l'érosion et la sédimentation. Ces processus ont une incidence directe sur la formation du bouchon

vaseux, phénomène majeur pour le fonctionnement du système estuarien. Cet axe permet aussi de comprendre le transport et le devenir des contaminants qu'ils soient chimiques ou biologiques ;

▮ **Microbiologie et oxygénation** : ont été étudiés les organismes microscopiques jouant un rôle essentiel dans le maintien de la qualité de l'eau, notamment le taux d'oxygène dissous qui connaît de graves déficits en période estivale. Sont concernés aussi les germes d'intérêt sanitaire ;

▮ **Dynamique des contaminants** : on cherche la détermination des niveaux de concentrations des contaminants chimiques et à mieux connaître les processus régissant le comportement de certaines espèces chimiques dans l'estuaire ainsi qu'à développer et intégrer la modélisation biogéochimique aux modèles hydro-sédimentaires ;

▮ **Édifices biologiques** : le constat de l'état biologique de l'estuaire, l'étude des relations trophiques entre les organismes vivants, la bioaccumulation le long de certaines chaînes alimentaires font partie de ce thème. Cela a impliqué de connaître l'état des populations, d'évaluer leur niveau de contamination et d'apprécier les effets de cette contamination sur les organismes (poissons, mollusques bivalves, etc.).

En outre, un important travail de modélisation mathématique a permis d'intégrer les données obtenues dans ces différents domaines. La traduction, sous une forme synthétique et simplifiée, des mécanismes étudiés permet de produire, dans la mesure du possible, des outils descriptifs et prédictifs du fonctionnement de cet écosystème continuellement en cours de réaménagements.



Partenaires du programme Seine-Aval

Le programme scientifique Seine-Aval est inscrit au contrat de plan État-Région de Haute-Normandie et au contrat de plan interrégional du Bassin parisien.

Les travaux et recherches réalisés dans ce cadre sont financés par les partenaires suivants :

▮ la Région Haute-Normandie (maître d'ouvrage) et les autres Régions du Bassin parisien (Ile-de-France, Basse-Normandie, Pays de la Loire, Centre, Picardie, Champagne-Ardenne, Bourgogne) ;

▮ le ministère de l'Aménagement du Territoire et de l'Environnement ;

▮ les industriels de Haute-Normandie ;

▮ l'agence de l'Eau Seine-Normandie.



ASICEN



Moyens nautiques

Les moyens nautiques sont fournis par les partenaires suivants :

▮ l'Ifremer ;

▮ l'Insu/CNRS ;

▮ la cellule antipollution de la Seine.

Ifremer



DREAL NORMANDIE

SMCAP/BARDO

N° d'inventaire : 7360

Introduction

Contaminations bactérienne et virale

Coordinateur : Pierre Servais⁽¹⁾

Auteurs : Pierre Servais⁽¹⁾, Nathalie Castignolles⁽²⁾,
Fabienne Petit⁽³⁾, Isabelle George⁽¹⁾,
Claudine Buffet-Janvresse⁽²⁾, André Ficht⁽⁴⁾

(1) Université libre de Bruxelles, groupe de microbiologie des milieux aquatiques

(2) CHU Rouen, laboratoire de virologie, JE 2008 Iprès

(3) Université de Rouen, laboratoire de microbiologie du froid, IFR, CNRS, Inserm 61

(4) Service de la navigation de la Seine, cellule antipollution

Sommaire

Introduction	3
Chapitre I - Contaminations bactérienne et virale des eaux	
Microorganismes pathogènes et incidence sur la santé	4
Les normes et le contrôle de la qualité microbiologique de l'eau	5
Les problèmes méthodologiques	7
Chapitre II - Contrôle régulier de la qualité microbiologique de l'estuaire	9
Chapitre III - Développements méthodologiques réalisés dans le cadre du programme Seine-Aval	
Détection des coliformes fécaux par méthode enzymatique	13
Détection moléculaire des microorganismes	16
Chapitre IV - Dynamique des bactéries fécales dans la Seine	
Abondance des coliformes le long de la Seine	18
Résultats expérimentaux	18
Première ébauche de modélisation de la dynamique des coliformes dans la Seine	20
Détection de <i>Salmonella</i> non cultivables dans les eaux de l'estuaire de la Seine	21
Chapitre V - Contamination virale de l'estuaire de la Seine	22
Conclusion	24
Références bibliographiques	25
Glossaire	26

Introduction

Principalement amenés par les rejets d'eaux usées, les bactéries et les virus d'origine fécale sont les principaux microorganismes qui altèrent la qualité sanitaire des eaux de surface. Le premier chapitre de ce fascicule présente les principaux microorganismes pathogènes, leur incidence sur la santé ainsi que les normes de contrôle de la qualité microbiologique de l'eau. Dans l'estuaire de la Seine, la qualité microbiologique des eaux est régulièrement mesurée. Des énumérations de bactéries indicatrices de contamination fécale, telles que les coliformes, et de certaines bactéries pathogènes, telles que les salmonelles, sont réalisées selon les méthodes classiques d'énumération après mise en culture sur milieux spécifiques. Des exemples de résultats récents de ces mesures sont présentés au chapitre II. Dans le cadre du programme Seine-Aval, un effort méthodologique considérable a été accompli afin de développer des techniques de détection et d'énumération de bactéries et de virus d'intérêt sanitaire ne présentant pas certains biais des techniques de mise en culture. Une méthode enzymatique permettant l'énumération rapide d'*Escherichia coli*, le coliforme d'origine fécale le plus abondant, a été développée (chapitre III). Par ailleurs, des techniques basées sur les progrès récents de la biologie moléculaire ont été développées pour rechercher divers types de bactéries et virus (chapitre III). L'utilisation de ces techniques a permis un net progrès dans la compréhension de la dynamique des bactéries fécales dans un milieu aquatique particulier, tel qu'un estuaire (chapitre IV). La recherche des principaux virus entériques a permis, par ailleurs, d'appréhender la variabilité spatiale et temporelle de la répartition de la contamination virale dans l'estuaire de la Seine (chapitre V).

Chapitre I

Contaminations bactérienne et virale des eaux

Microorganismes pathogènes et incidence sur la santé

Les eaux de surface véhiculent de nombreux microorganismes comme des bactéries, des virus, des protozoaires, des algues. Ainsi, les eaux de l'estuaire de la Seine hébergent entre 5 et 20 millions de bactéries par millilitre d'eau. Une grande partie de ces bactéries sont naturellement présentes dans le milieu aquatique où elles se multiplient. Ces bactéries appelées autochtones* jouent un rôle considérable dans les cycles biogéochimiques de divers éléments constitutifs de la matière vivante comme le carbone, l'oxygène, l'azote ou le soufre (voir fascicule « L'oxygène : un témoin du fonctionnement microbiologique »). À l'opposé, certaines bactéries dites allochtones* sont apportées dans les milieux aquatiques alors que ceux-ci ne constituent pas leur environnement habituel. Il en est ainsi des bactéries d'origine fécale présentes dans les eaux usées et les rejets de stations d'épuration, et des bactéries telluriques (présentes dans les sols) apportées par les eaux de ruissellement. Alors que les bactéries autochtones sont adaptées à la vie dans l'estuaire, les bactéries allochtones auront un temps de survie variable selon l'espèce et les conditions du milieu. Parmi les microorganismes allochtones susceptibles d'être présents dans les milieux aquatiques naturels, les bactéries d'origine fécale ont une importance sanitaire et épidémiologique car elles sont responsables de diverses maladies chez l'homme.

Pendant plusieurs siècles, les maladies bactériennes d'origine hydrique ont été responsables dans nos pays de vastes épidémies de dysenterie, fièvre typhoïde, choléra... La mise en évidence, au XIX^e siècle, du caractère hydrique de ces épidémies couplée aux progrès de l'hygiène collective et individuelle, de la nutrition, de l'antibiothérapie, des vaccinations et des techniques de production d'eau potable (filtration et désinfection) et d'épuration des eaux usées ont permis aujourd'hui l'éradication presque complète dans le monde occidental des plus graves de ces maladies. L'introduction des contrôles

bactériologiques des eaux de surface et des eaux destinées à la consommation humaine a également contribué, dans les pays développés, à la régression de ces épidémies qui constituent, par contre, encore un fléau dans la plupart des pays en voie de développement. À l'échelle planétaire, l'Organisation mondiale de la santé considère qu'aujourd'hui la mauvaise qualité microbiologique des eaux consommées reste la première cause de problèmes de santé.

Le tableau 1 reprend quelques bactéries pathogènes responsables d'infections d'origine hydrique. Parmi ces bactéries, les plus connues sont les espèces du genre *Salmonella* qui sont presque toutes pathogènes (responsables de fièvres typhoïdes et paratyphoïdes ainsi que de gastroentérites) et les *Escherichia coli* dont certaines souches sont responsables de redoutables gastroentérites et diarrhées. Ces bactéries pathogènes, qui sont principalement amenées vers les eaux de surface par les rejets d'eaux usées domestiques et les rejets d'élevage, peuvent contaminer l'homme soit par consommation directe d'eau, soit lors d'un bain ou d'un contact avec des eaux à usage récréatif, soit par consommation d'aliments contaminés par l'eau. Cette dernière voie de transmission semble avoir une importance croissante ; les produits de la mer, tels que fruits de mer et poissons, récoltés dans des zones microbiologiquement contaminées sont souvent mis en cause.

Tableau 1 - Quelques bactéries pathogènes responsables d'infections d'origine hydrique.

Bactéries	Infections
<i>Salmonella</i> sp.	Fièvres typhoïdes et paratyphoïdes, gastroentérites aiguës
<i>Shigella</i> sp.	Dysenteries, gastroentérites
<i>Escherichia coli</i>	Gastroentérites, diarrhées
<i>Yersinia enterocolitica</i>	Gastroentérites
<i>Vibrio cholerae</i>	Choléra, diarrhées

Qu'est-ce qu'un virus ?

Les virus sont des entités particulières qui se situent entre les êtres vivants et les macromolécules. D'organisation beaucoup plus simple qu'une cellule, ils sont incapables de se multiplier par eux-mêmes et se comportent comme des parasites obligatoires des cellules vivantes dont ils détournent le fonctionnement. Les virus sont constitués par un génome entouré ou protégé par une coque protéique, la capsid, l'ensemble formant la nucléocapside. Le génome est une molécule d'acide nucléique qui peut être selon les virus de l'ARN (acide ribonucléique) ou de l'ADN (acide désoxyribonucléique). La capsid est formée par un ensemble de

protéines dont l'organisation détermine la symétrie du virus. Chez certains virus dits enveloppés, la nucléocapside est entourée par une bicouche lipoprotéique, par opposition aux virus nus constitués uniquement de la nucléocapside. La classification des virus repose sur leurs caractéristiques morphologiques et physicochimiques : nature et organisation du génome, symétrie de la capsid, présence ou absence d'enveloppe (virus enveloppés et virus nus) et sur d'autres caractères plus mineurs tels que la taille, le site et le mode de multiplication.

(*) expliqué dans le glossaire.

S'il est admis depuis longtemps que la pollution de l'eau par les déjections humaines représente un risque significatif de maladie, l'implication des virus comme vecteur possible d'infections est beaucoup plus récente. La présence et la possible transmission de virus dans l'eau ont été initialement démontrées vers 1950 par la détection de poliovirus chez des singes traités par des échantillons de l'environnement (Metcalf *et al.*, 1995). Depuis, la surveillance séroépidémiologique des gastroentérites non bactériennes avec découverte progressive de nouveaux virus et la reconnaissance d'épisodes épidémiques pouvant être causés par la transmission de virus entériques dans l'environnement (hépatite A, par exemple) ont entraîné le développement de la virologie des milieux hydriques.

La grande variété d'agents viraux potentiellement responsables d'épidémies d'origine hydrique constitue l'un des faits les plus marquants des deux dernières décennies, en matière d'épidémiologie hydrique (Schwartzbrod, 1991 ; Gantzer *et al.*, 1998 ; Nicand *et al.*, 1998). Les virus impliqués sont appelés « virus entériques ». Ils appartiennent à des groupes taxonomiques (familles et genres) distincts. Malgré leur grande diversité, ces virus ont en commun une étape obligatoire de leur cycle de multiplication, l'intestin de l'hôte, avec pour conséquence l'existence d'un cycle de transmission féco-oral impliquant l'homme ou les animaux et leur environnement hydrique. Ces virus se caractérisent aussi par une certaine stabilité dans le milieu naturel et une résistance à de nombreux agents de dénaturation physico-chimiques.

Les virus entériques sont responsables de diverses manifestations cliniques (gastroentérites, entéroviroses, hépatites) parfois graves (tab. 2). Les mieux connus sont les entérovirus, les virus des gastroentérites (rotavirus, astrovirus, virus de Norwalk et calicivirus apparentés), les virus des hépatites, les adénovirus (fig. 1). Bien que la transmission directe de personne à personne soit la plus fréquente pour l'ensemble de ces virus, la transmission indirecte par consommation ou contact avec de l'eau est de plus en plus incriminée. Leur

infectivité est élevée puisque l'ingestion de 10 à 100 particules suffit à provoquer l'infection. Plus de 150 espèces virales pathogènes transmises par voie féco-orale peuvent être incriminées dans les infections virales. Aujourd'hui, on admet que le nombre réel d'infections est sous-estimé puisque la plupart sont asymptomatiques*.

Enfin, d'autres agents pathogènes, non viraux et non bactériens, sont aussi impliqués dans des épidémies liées à la consommation d'eau de distribution. Ils ont été récemment mis en évidence, principalement aux États-Unis ; il s'agit de protozoaires appartenant aux genres *Giardia* et *Cryptosporidium* qui présentent la particularité de former des kystes* particulièrement résistants dans les eaux.

Les normes et le contrôle de la qualité microbiologique de l'eau

L'eau peut ainsi être un facteur de dissémination des microorganismes pathogènes. Le suivi et le contrôle de la qualité microbiologique de l'eau sont donc un élément majeur dans la préservation de la santé publique. À l'heure actuelle, les contrôles sanitaires des eaux de surface sont généralisés pour les eaux de baignade et celles utilisées pour la production d'eau potable.

Le contrôle microbiologique de l'eau repose principalement sur la recherche de bactéries indicatrices de contamination fécale comme les coliformes totaux et les coliformes fécaux (aussi appelés thermotolérants*) qui n'ont pas nécessairement un caractère pathogène par eux-mêmes mais dont la présence indique l'existence d'une contamination fécale et donc d'un risque épidémiologique. Les premières normes de contrôle microbiologique des eaux de baignade au niveau européen ont été édictées en 1975 ; elles sont reprises au tableau 3. Ces normes définissent, pour divers types de populations bactérienne et virale, à la fois une norme impérative à ne pas dépasser (à respecter dans 95 % des situations) et une norme guide (à respecter dans 80 % des situations). La recherche des salmonelles, que la directive ne préconise que

Tableau 2 - Principaux virus pathogènes responsables d'infections d'origine hydrique.

Genres	Espèces (sérotypes)	Taille	Type de génome	Infections
Entérovirus	Poliovirus (3)	2-30 nm	ARN	P, M, F
	Coxsackie A (23)			MR, M, F
	Coxsackie B (6)			MR, M, F
	Échovirus (32)			M, MR, F, GE
	Entérovirus 68-71 (4)			M, E, MR, F, CH
Hépatovirus	Hépatite A (1)	27-28 nm	ARN	H
Réovirus	Réovirus humains			Non établie
Rotavirus	Rotavirus humains	70-80 nm	ARN	GE, D
Calicivirus	Virus de Norwalk	26-32 nm	ARN	GE, V, D, F
	Petits virus ronds (SRV)	30-38 nm	ARN	GE, V, D
	Virus de l'hépatite E	27-34 nm	ARN	H
Astrovirus	Astrovirus humains (7)	28 nm	ARN	GE
Coronavirus	Coronavirus humains	120 nm	ARN	GE
Mastadénovirus	Adénovirus humains	70-80 nm	ADN	MR, C, GE

Abréviations : F : fièvre, M : méningite, D : diarrhée, GE : gastroentérite, P : paralysie, MR : maladie respiratoire, E : encéphalite, C : conjonctivite, CH : conjonctivite hémorragique, V : vomissement, H : hépatite.

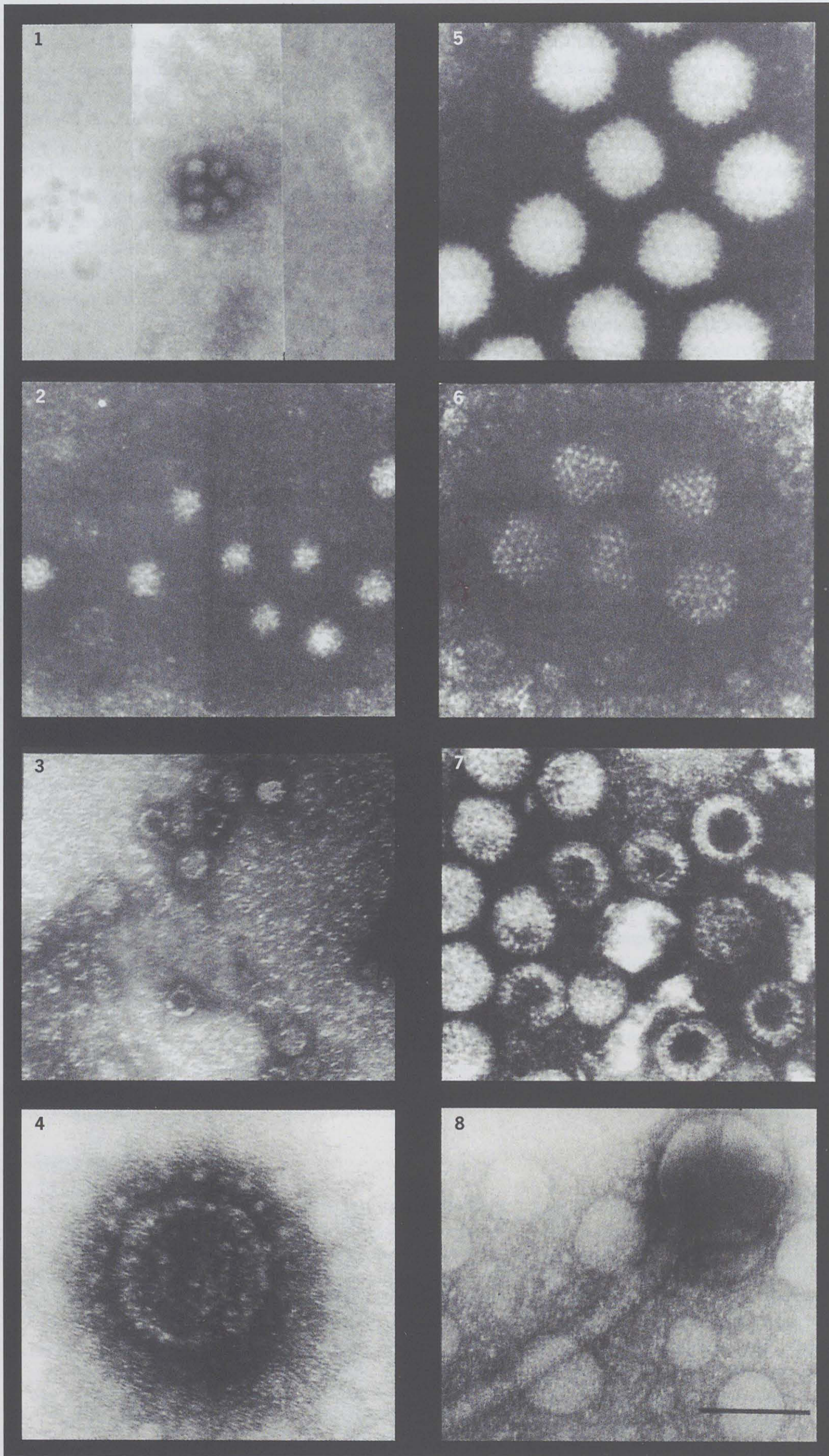


Figure 1 - Photographies de virus entériques en microscopie électronique (barre 100 nm). 1. Entérovirus ; 2. Astrovirus ; 3. Virus de Norwalk ; 4. Coronavirus ; 5. Adénovirus ; 6. Adénovirus ; 7. Rotavirus ; 8. Bactériophages.

dans les cas où une contamination fécale est déjà révélée, obéit à une autre logique que celle des germes indicateurs car ces bactéries constituent elles-mêmes des agents pathogènes. Cette directive a été légèrement modifiée récemment ; les coliformes totaux ont été abandonnés et les coliformes fécaux remplacés par *Escherichia coli*. Par ailleurs, il faut souligner que l'ensemble des contrôles bactériologiques des eaux ne prennent en compte que le risque lié à la voie de contamination d'origine fécale, les autres modes de contamination étant négligés.

L'analyse des virus présents dans l'environnement n'est pour l'instant pas réalisée en routine. Le seul paramètre viral inclus dans la réglementation européenne contrôlant la qualité des eaux de baignade est la présence d'entérovirus, quantifié sur culture cellulaire. Cette seule recherche semble insuffisante puisque certaines études ont montré qu'il n'y avait pas de relation entre la présence d'entérovirus et celle des virus de gastroentérites, notamment dans les eaux de surface (Gantzer *et al.*, 1998). L'intérêt d'une analyse plus exhaustive des virus est de plus en plus pris en compte dans les réflexions actuelles au niveau international sur les dispositifs de suivi et de contrôle de la qualité microbiologique de l'eau. Devant la difficulté d'isoler des virus entériques infectieux dans un contrôle de routine, il est envisagé d'avoir recours à des indicateurs de contamination. Plusieurs approches sont actuellement à l'étude. La prise en compte du paramètre virologique dans le contrôle sanitaire des eaux se traduit à l'heure actuelle par la surveillance de l'excrétion virale humaine, l'étude du devenir et du comportement des virus rejetés dans les eaux de rivière, la recherche des virus contaminants avec, à terme, le choix d'un indicateur viral de pollution fécale et la détermination d'un seuil d'alerte. Ces études devraient permettre d'identifier la source de contamination associée à une épidémie observée sur le terrain, étape souvent manquante pour démontrer le rôle d'un micro-organisme dans une épidémie associée à l'eau.

Les problèmes méthodologiques

Les normes de qualité définissent, en plus des niveaux de contamination acceptables, les méthodes d'analyse. Ainsi, par exemple, pour les coliformes totaux et fécaux, les bactéries les plus couramment recherchées, deux types de techniques peuvent être utilisés : méthode par culture en milieu liquide de dilutions successives de l'échantillon et détermination du

nombre le plus probable (NPP) ou méthode par filtration sur membrane et culture sur milieu gélosé approprié. Il est aujourd'hui clairement établi que ces méthodes basées sur la mise en culture des bactéries recherchées ne sont pas bien adaptées à leur dénombrement dans les eaux naturelles (Servais & Billen, 1990). De nombreuses publications montrent en effet que, après leur introduction dans un milieu aquatique naturel, les bactéries fécales perdent assez rapidement leur faculté de croître dans les milieux supposés optimums utilisés mais conservent beaucoup plus longtemps certaines activités métaboliques telles qu'activité enzymatique, activité de respiration, utilisation de substrat... (Colwell *et al.*, 1985 ; Grimes & Colwell, 1986 ; Roszack & Colwell, 1987 ; Barcina *et al.*, 1989 ; Amann *et al.*, 1995 ; Davies *et al.*, 1995 ; Pommepuy *et al.*, 1996). On parle alors de bactéries « viables mais non cultivables » ; ces bactéries bien que viables ne peuvent être dénombrées par les méthodes classiques. Cette perte de cultivabilité est le résultat de divers stress (stress nutritionnel, thermique, lumineux...) que subissent les bactéries fécales lorsqu'elles sont rejetées dans un milieu aquatique naturel. Ceci a pour conséquence une sous-estimation considérable de l'abondance totale des bactéries recherchées dans les eaux de surface par les techniques de mise en culture. Des études ont, par ailleurs, montré que ces bactéries viables mais non cultivables pouvaient conserver leur pathogénicité* (Colwell *et al.*, 1985 ; Grimes & Colwell, 1986). Bien que l'on puisse être critique sur certains fondements scientifiques des méthodes de dénombrement après mise en culture, force est de reconnaître que leur relative simplicité de mise en œuvre et leur faible coût permettent des mesures de routine qui, si elles ne sont pas parfaites, s'avèrent néanmoins bien utiles.

Dans les eaux de surface, la concentration apparente des virus pathogènes est généralement très faible et il devient très difficile de les détecter directement. Aussi, le préalable indispensable à la mise en évidence des virus dans l'eau est une étape de concentration. Après cette étape, la détection des virus fait appel à diverses techniques de mise en évidence semblables aux techniques de diagnostic issues de la virologie médicale (Beytout & Laveran, 1994 ; Laveran & Traore, 1997). Les entérovirus (poliovirus, coxsakivirus B, échovirus) et certains adénovirus sont capables de se multiplier en provoquant l'apparition d'effets cytopathogènes* caractéristiques. Ces virus, dont la culture est relativement aisée sur des systèmes usuels, sont recherchés et identifiés

Tableau 3 - Qualité microbiologique requise pour les eaux de baignade (directive européenne de décembre 1975).

	Norme guide	Norme impérative	Fréquence d'échantillonnage
Coliformes totaux	500/100 ml	10000/100 ml	Bimensuelle
Coliformes fécaux	100/100 ml	2 000/100 ml	Bimensuelle
Streptocoques fécaux °	100/100 ml	-	(1)
Salmonelles	-	0/100 ml	(1)
Entérovirus	-	0/100 ml	(1)

(1) Teneur à vérifier par les autorités compétentes lorsqu'une enquête effectuée dans la zone de baignade en révèle la présence possible ou une détérioration de la qualité des eaux.

° Les streptocoques sont maintenant appelés entérocoques.

fréquemment par cette méthode. Un certain nombre de virus rencontrés dans le milieu hydrique ne provoquent pas d'effet cytopathogène sur cultures cellulaires (rotavirus, par exemple) ou se multiplient très difficilement (virus de l'hépatite A, par exemple). Pour d'autres virus, leur multiplication dans les cellules *in vitro* n'a pas encore été établie; c'est le cas des astrovirus, du virus de Norwalk et des calicivirus apparentés, du virus de l'hépatite E et de certains adénovirus. Ceci ne préjuge toutefois en rien de l'importance épidémiologique de leur présence dans l'eau (Payment *et al.*, 1994; Pinto *et al.*, 1996; Abad *et al.*, 1997). La mise en évidence de ces virus impossibles à multiplier sur cultures cellulaires, ou à croissance lente et incertaine, a été envisagée à l'aide d'anticorps dirigés contre les protéines virales ou à l'aide d'acides nucléiques spécifiques du génome viral (sondes moléculaires). Les techniques immunologiques ont permis de détecter des rotavirus et virus de l'hépatite A dans des prélèvements hydriques. Les techniques de biologie moléculaire basées sur l'amplification de gènes viraux ont, quant à elles, permis l'étude des astrovirus et calicivirus, virus jusqu'à présent peu connus sur les plans clinique et épidémiologique. Les techniques de biologie moléculaire en plein essor nécessitent toutefois l'obtention de génomes viraux intacts, étape qui impose des développements méthodologiques appropriés à l'environnement et aux milieux hydriques en particulier.

Certains développements méthodologiques et des applications réalisés dans le cadre du programme Seine-Aval sont présentés au chapitre III.

Chapitre II

Contrôle régulier de la qualité microbiologique de l'estuaire

Depuis 1977, la cellule antipollution de Rouen (service de la navigation de la Seine, SNS) suit de manière régulière la qualité microbiologique des eaux de la Seine entre Poses et la mer. Les bactéries suivantes sont recherchées : coliformes totaux et fécaux, streptocoques fécaux (maintenant appelés entérocoques) et salmonelles. Les analyses sont effectuées par le laboratoire municipal de Rouen par les méthodes normalisées de mise en culture. La fréquence des mesures est de vingt-quatre fois par an en trois stations (Poses, La Bouille et Caudebec), de douze fois l'an à Honfleur et Tancarville et enfin de six fois par an pour les autres stations (localisation des stations de prélèvement : voir la carte de la figure 2). Bien qu'il n'existe pas de zone de baignade en Seine, les résultats des mesures sont comparés, pour fixer les idées, aux valeurs indiquées dans la norme de la Communauté européenne pour les eaux de baignade (tab. 3).

La figure 3 présente l'évolution saisonnière en 1997 à trois stations de l'estuaire des coliformes totaux, des coliformes thermotolérants et des streptocoques fécaux. Ces résultats montrent que, quel que soit leur type, les abondances de bactéries sont quasiment toujours supérieures à la valeur de la norme guide des eaux de baignade et parfois plus élevées que la valeur de la norme impérative. Parmi les trois stations présentées à la figure 3, les abondances les plus élevées sont à La Bouille.

La figure 4 présente un exemple de profil longitudinal moyen pour l'année 1996 des divers types de bactéries fécales recherchées. On voit que les abondances croissent dans la

première partie de l'estuaire entre Poses et l'agglomération rouennaise. Les valeurs maximales sont rencontrées dans la zone située en aval de Rouen. Les teneurs en bactéries fécales décroissent de La Bouille à Caudebec pour remonter plus en aval dans la zone du bouchon vaseux où les hautes teneurs en matières en suspension favorisent la présence et la survie des bactéries fécales. Si l'on regarde plus particulièrement les coliformes thermotolérants, on voit que, dans l'ensemble de l'estuaire, les teneurs excèdent dans presque toutes les situations (de 83 à 100 % des échantillons selon les stations) la valeur de 100 coliformes/100 ml qui correspond à la valeur guide de la norme européenne (tab. 3, p. 7). Selon les stations, les pourcentages de dépassement de la valeur de la norme impérative varient de 0 à 83 %.

L'évolution au cours des vingt dernières années des bactéries fécales à La Bouille est présentée à la figure 5. On n'observe pas d'évolution temporelle très marquée pendant une très longue période allant de 1977 à 1996. Par contre, une diminution significative de l'abondance des bactéries fécales en aval de Rouen est constatée en 1997 et 1998 par rapport aux années précédentes. Cette diminution récente doit être la conséquence de l'amélioration générale de l'assainissement en région rouennaise ces dernières années avec, notamment, la mise en service en 1997 de la station d'épuration Émeraude qui traite les eaux usées de l'agglomération de Rouen, un effort de fiabilisation de la collecte des eaux usées et l'introduction de bassins de stockage des eaux usées par temps de pluie.

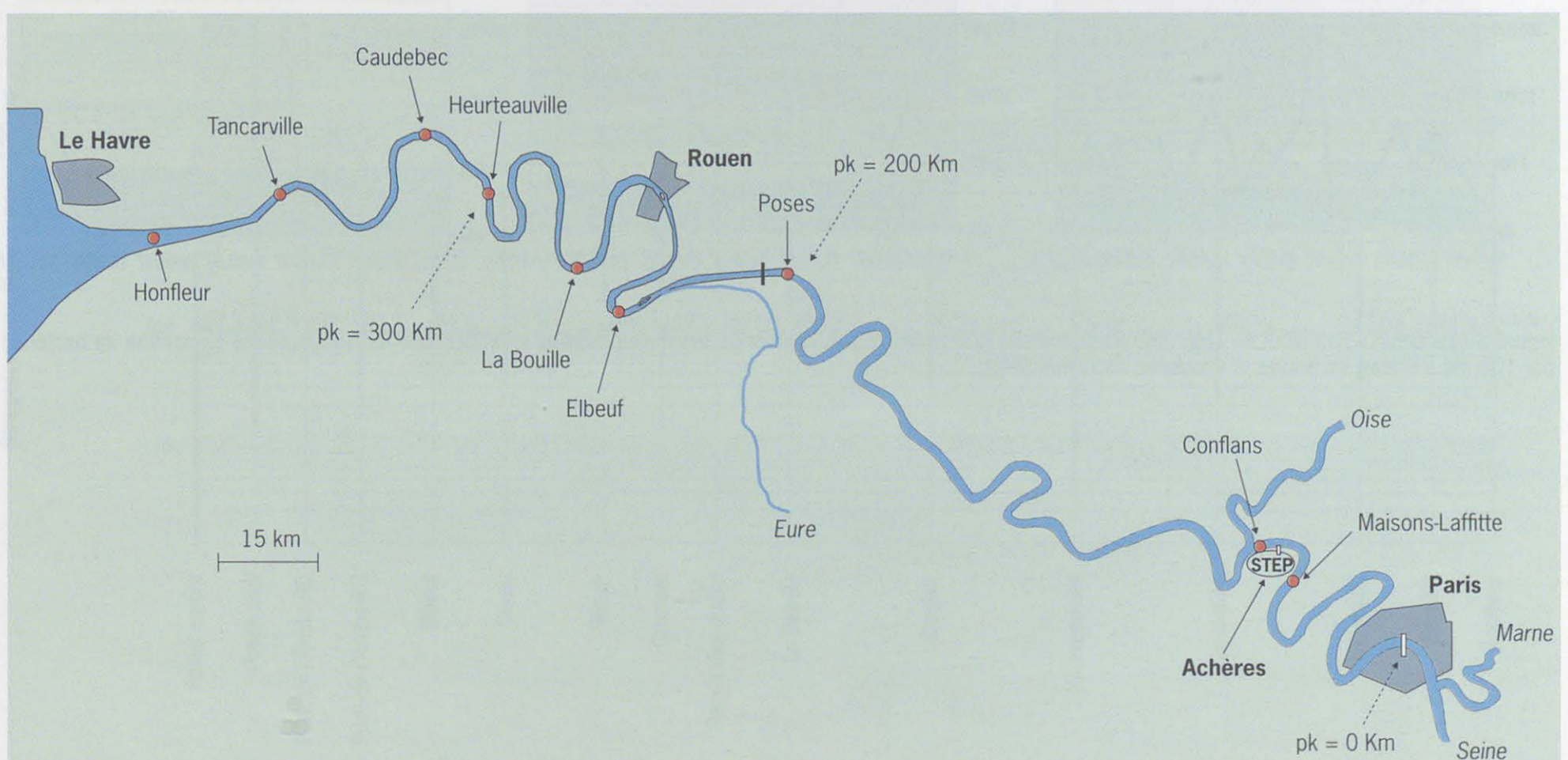
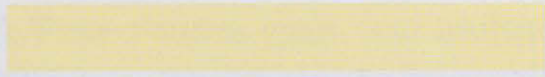


Figure 2 - Carte de la Seine depuis Paris jusqu'à l'embouchure avec l'emplacement de certaines stations de prélèvement.

Qualité bactériologique de l'eau Normes applicables aux eaux de baignade



Nombre guide



Nombre impératif

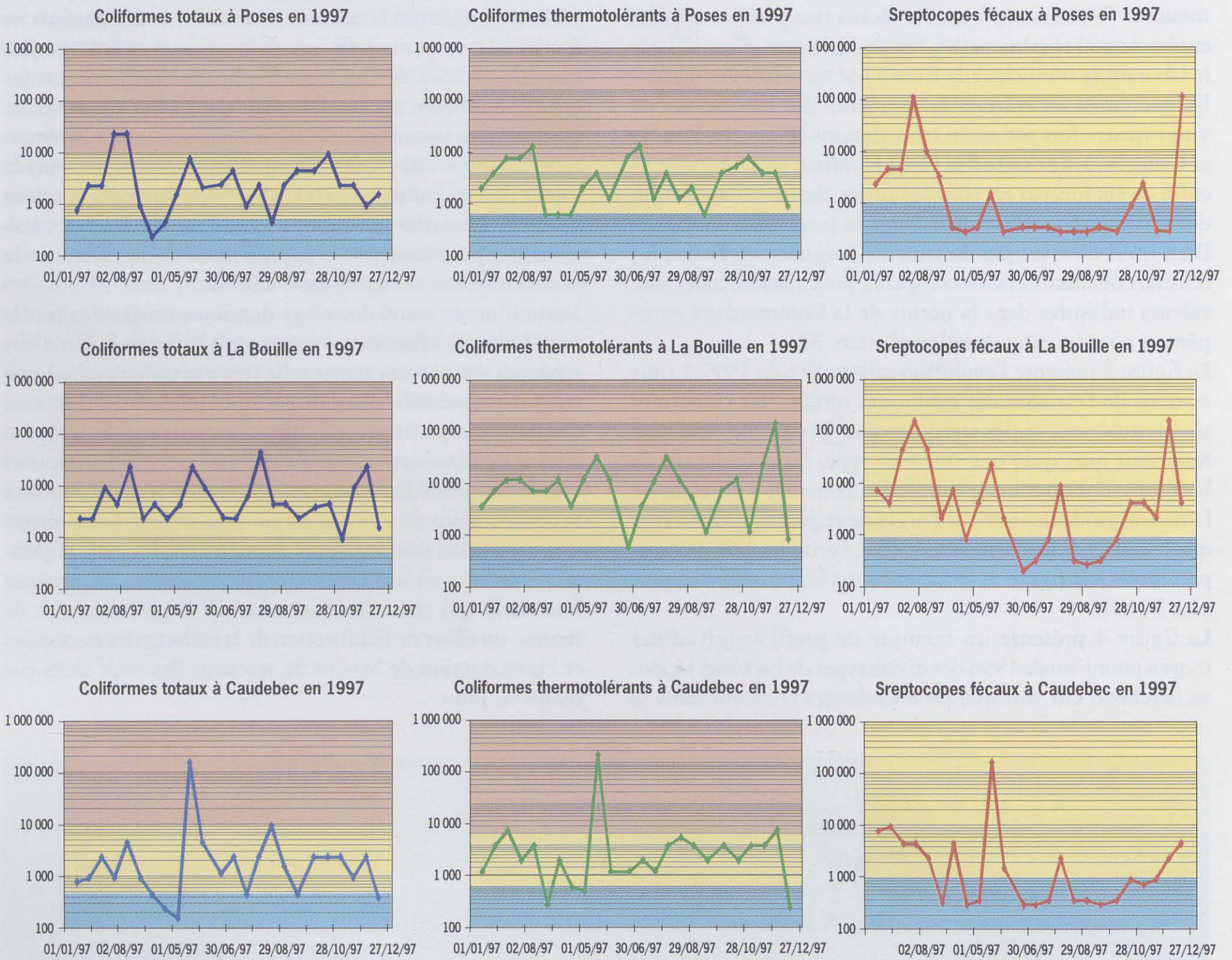


Figure 3 - Évolution saisonnière en 1997 de l'abondance en coliformes totaux, coliformes thermotolerants et streptocoques fécaux (exprimée en nombre de bactéries par 100 ml) à Poses, La Bouille et Caudebec (données SNS).

Analyses bactériologiques des eaux de la Seine Année 1996

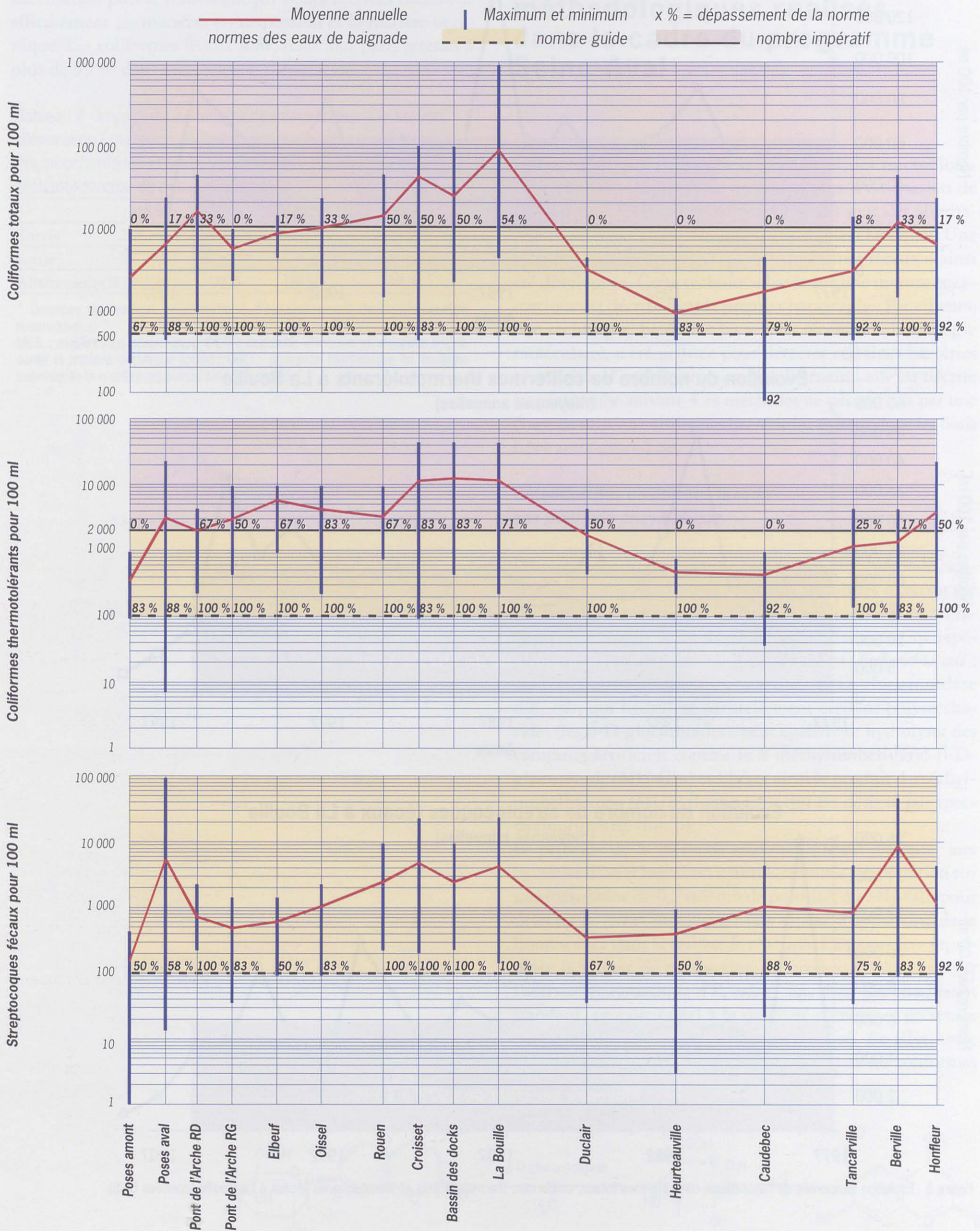
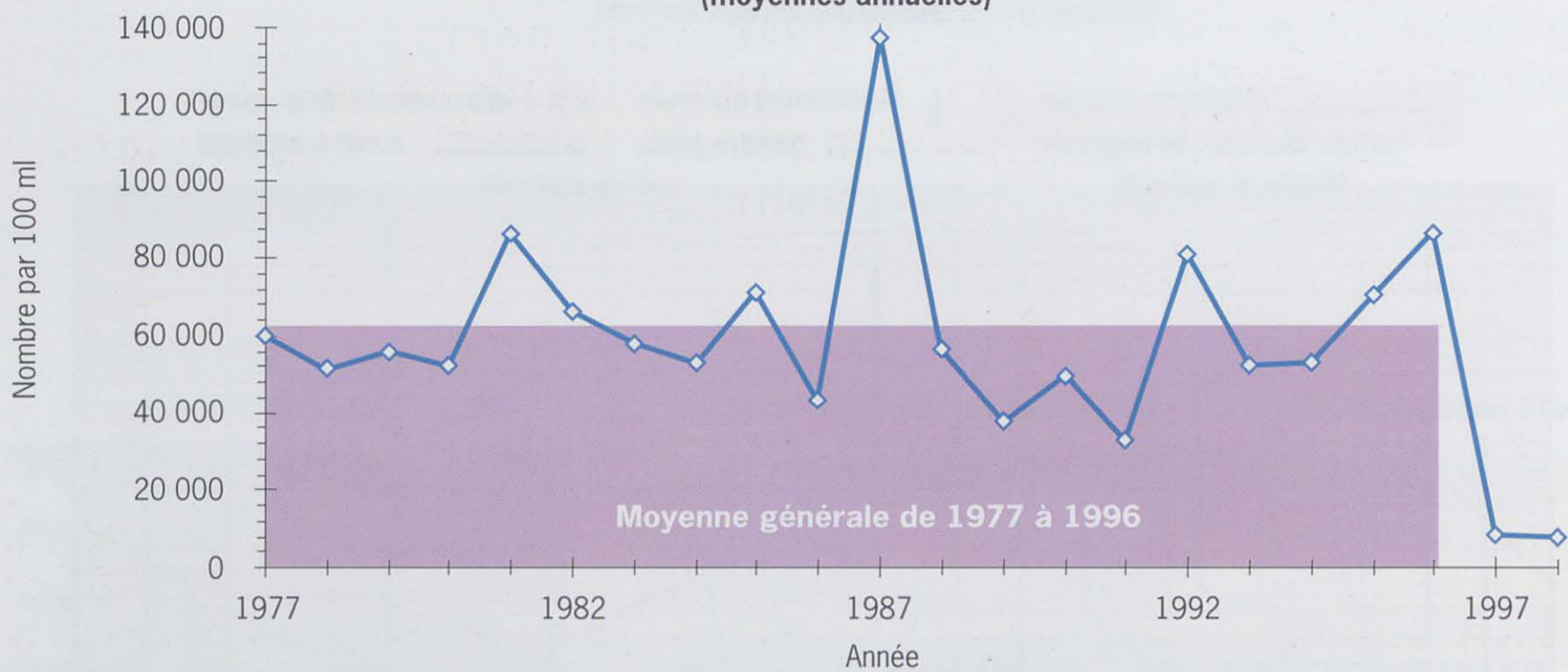
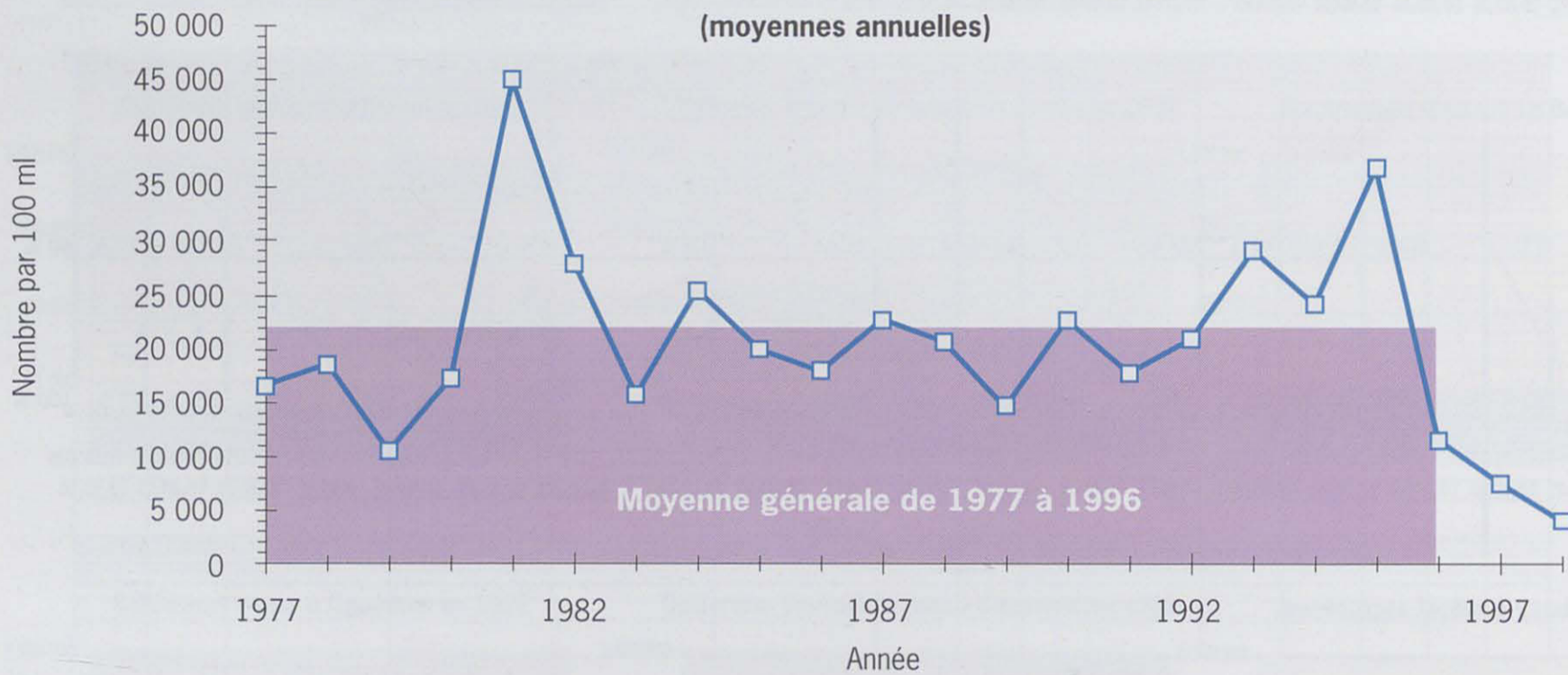


Figure 4 - Profils longitudinaux moyens (année 1996) de l'abondance en coliformes totaux, coliformes thermotolerants et streptocoques fécaux dans l'estuaire (données SNS).

Évolution du nombre de coliformes totaux à La Bouille
(moyennes annuelles)



Évolution du nombre de coliformes thermotolérants à La Bouille
(moyennes annuelles)



Évolution du nombre de streptocoques fécaux à La Bouille
(moyennes annuelles)

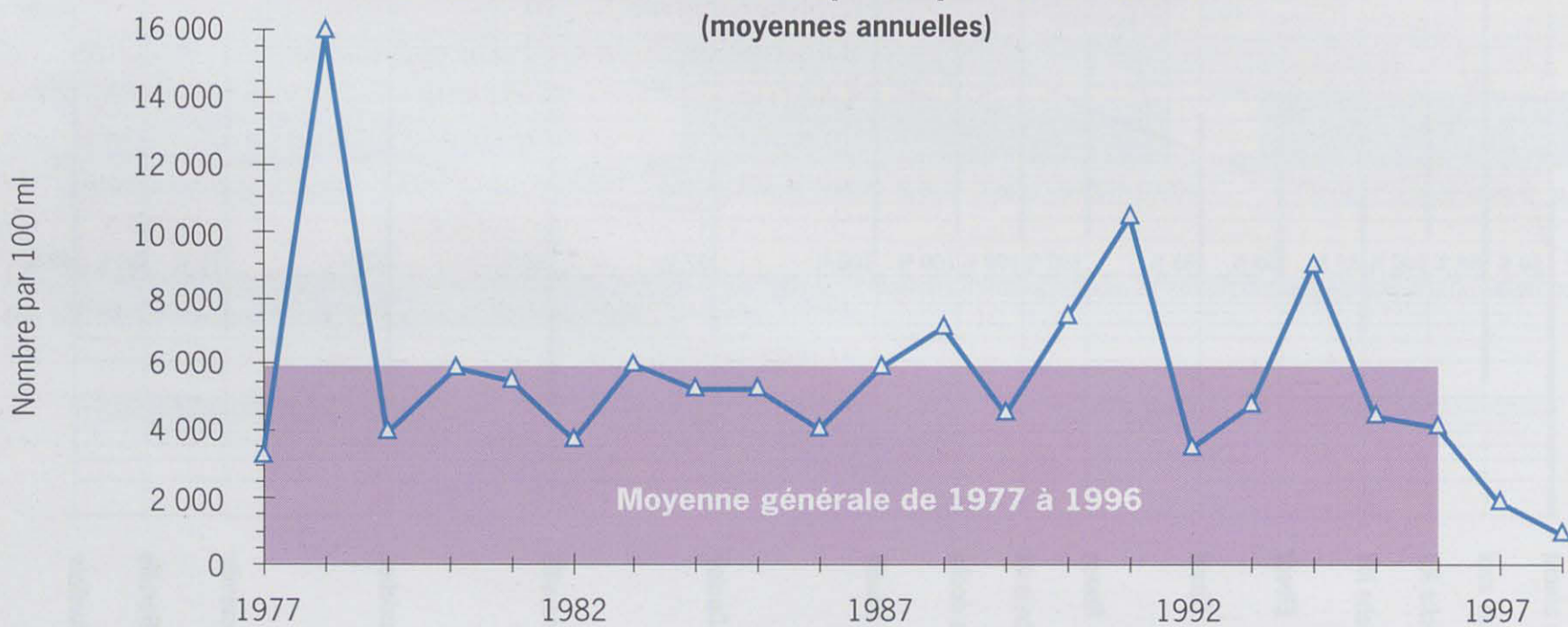


Figure 5 - Évolution temporelle de l'abondance en coliformes totaux, coliformes thermotolérants et streptocoques fécaux à La Bouille (données SNS).

Le tableau 4 présente l'efficacité de traitement de la nouvelle station d'épuration pour quelques paramètres physicochimiques et bactériologiques. Ces résultats montrent que la décantation puis le traitement par boues activées éliminent efficacement les matières en suspension et la matière organique. Les coliformes fécaux sont, pour leur part, retenus à plus de 99 % dans cette station d'épuration.

Tableau 4 - Impact du traitement des eaux usées à la station d'épuration Émeraude de Rouen sur quelques paramètres physicochimiques et sur les coliformes fécaux (échantillonnage de mars 1999).

	MES*	DCO*	DBO*	Coliformes fécaux
Entrée	264 mg/l	549 mg/l	352 mg/l	2,2 10 ⁷ /100 ml
Sortie	17 mg/l	35 mg/l	14 mg/l	6,8 10 ⁴ /100 ml
Abattement (%)	93,6	93,6	96,0	99,7

* Données du syndicat intercommunal d'assainissement de l'agglomération rouennaise.

MES : matières en suspension; DCO : demande chimique en oxygène (représente la matière organique totale); DBO : demande biochimique en oxygène (représente la matière organique biodégradable).

Chapitre III

Développements méthodologiques réalisés dans le cadre du programme Seine-Aval

Dans le cadre du programme Seine-Aval, les microbiologistes ont développé diverses techniques d'estimation de l'abondance des bactéries et des virus qui sont des alternatives, tout à fait intéressantes, aux méthodes classiques. Une méthode rapide de détection des coliformes fécaux a ainsi été développée. Cette technique basée sur une mesure enzymatique est décrite dans le premier paragraphe. Par ailleurs, une technique, basée sur les acquis récents de la biologie moléculaire, a été utilisée pour détecter certaines bactéries et des virus d'intérêt sanitaire dans l'estuaire; elle est décrite au paragraphe suivant. Ces méthodes ne passent pas par une étape de mise en culture des bactéries et évitent donc les biais liés à cette procédure.

Détection des coliformes fécaux par méthode enzymatique

Dans le cadre du programme Seine-Aval, une méthode rapide d'estimation de l'abondance des coliformes fécaux a été développée (George *et al.*, 1999). Cette méthode enzymatique est basée sur la mesure d'une activité enzymatique spécifique du coliforme fécal le plus abondant, *Escherichia coli* : l'activité β -D-glucuronidase. La β -D-glucuronidase d'*E. coli*, qui hydrolyse naturellement certains polysaccharides (les β -D-glucuronides), peut également hydrolyser des composés artificiels comme le 4-méthylumbelliféryl- β -D-glucuronide (MU-Glu) et libérer ainsi le produit 4-méthylumbelliférone (MUF) fluorescent, qui est détecté par spectrofluorimétrie (fig. 6).

Le principe de la méthode enzymatique est d'ajouter aux bactéries d'un échantillon naturel, retenues par filtration sur une membrane de 0,2 micron de porosité, du MU-Glu pour détecter *E. coli* et de mesurer une vitesse d'apparition de la fluorescence dans le milieu de réaction. Ce paramètre représente la vitesse de production du produit fluorescent par l'activité enzymatique d'*E. coli* et est, dans des conditions standard, proportionnel à la quantité d'enzymes présentes dans l'échantillon, donc au nombre d'*E. coli*. En effet, cette enzyme inductible semble être induite chez les coliformes

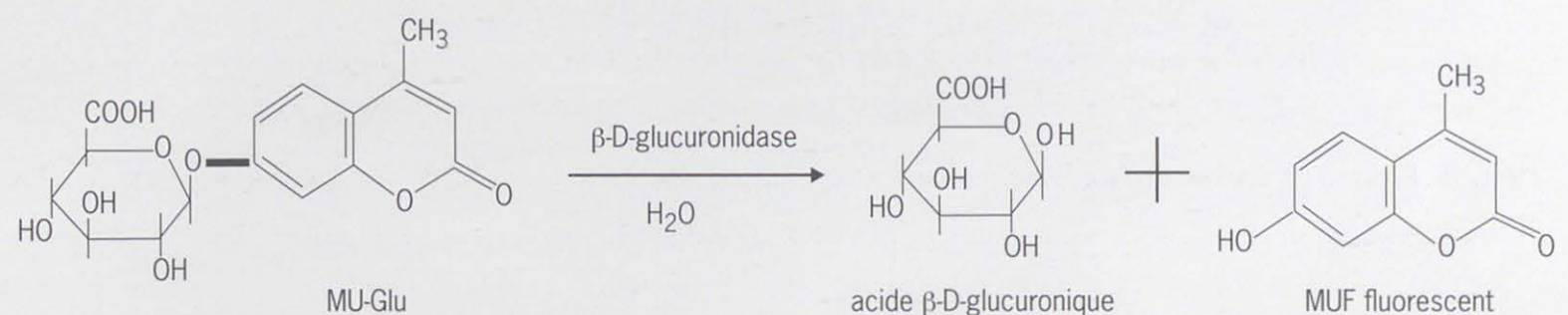


Figure 6 - Hydrolyse du MU-Glu par la β -D-glucuronidase. La liaison hydrolysée par l'enzyme est figurée en gras.

présents dans les milieux aquatiques naturels (George *et al.*, 1999). Cette méthode offre l'avantage de ne comporter aucune étape de mise en culture et permet ainsi un gain de temps considérable par rapport aux méthodes classiques d'incubation sur milieu gélosé (temps de réponse compris entre 24 et 48 h), puisqu'elle donne une réponse en vingt à trente minutes.

Des mesures d'activité glucuronidasique ont été comparées, sur un large éventail d'eaux douces diversement contaminées en coliformes fécaux, à des énumérations de ces bactéries par

la méthode de référence de dénombrement sur milieu gélosé spécifique. Les eaux testées vont de petits ruisseaux forestiers bactériologiquement peu ou pas contaminés à des rivières en aval de rejets urbains. La relation présentée à la figure 7 est en échelle logarithmique, en raison de la très large gamme d'abondance en coliformes rencontrés ; elle montre qu'il existe une bonne corrélation en échelle logarithmique entre l'activité glucuronidasique mesurée comme décrit ci-dessus et le nombre de coliformes fécaux comptés sur gélose.

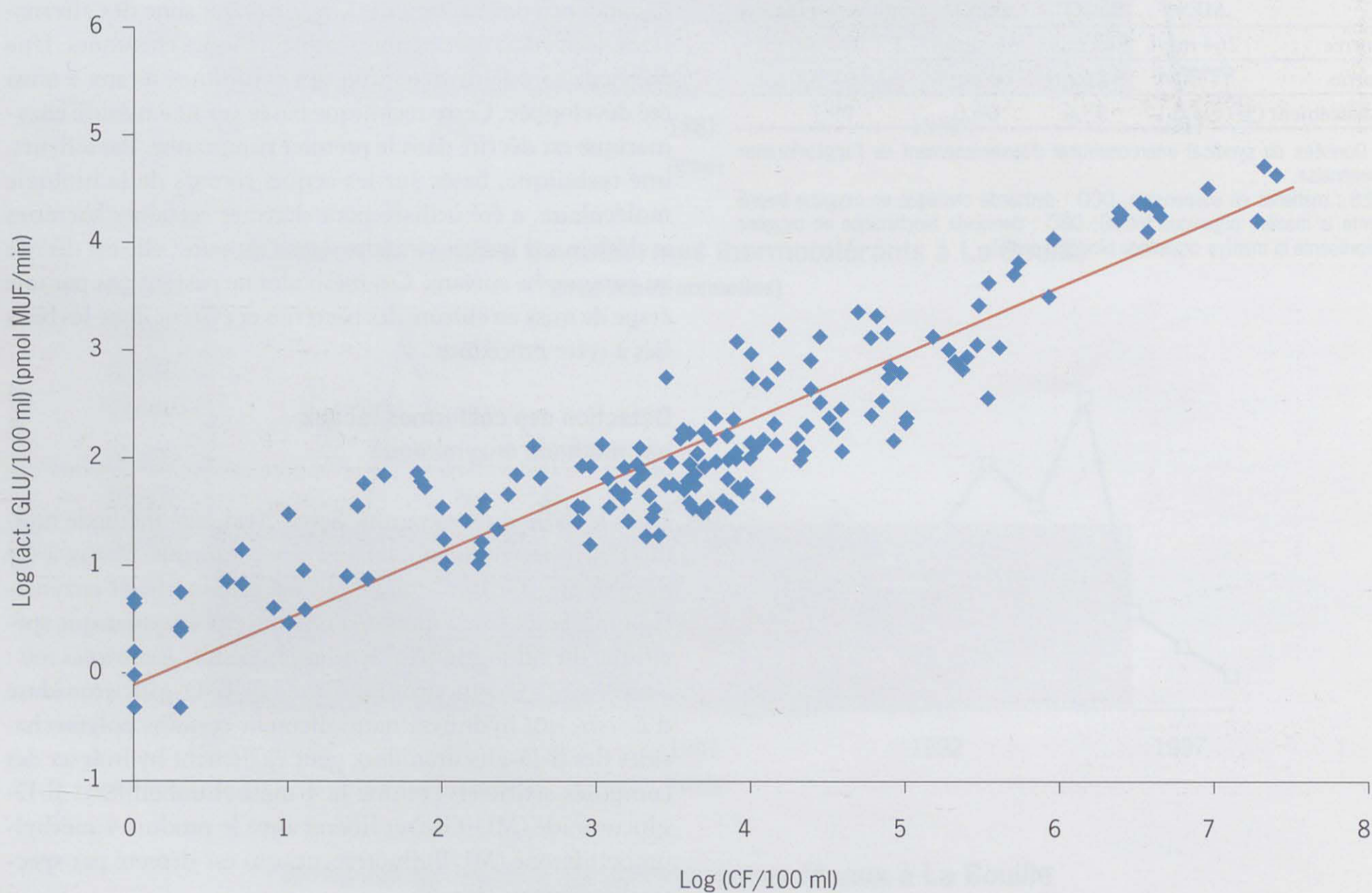
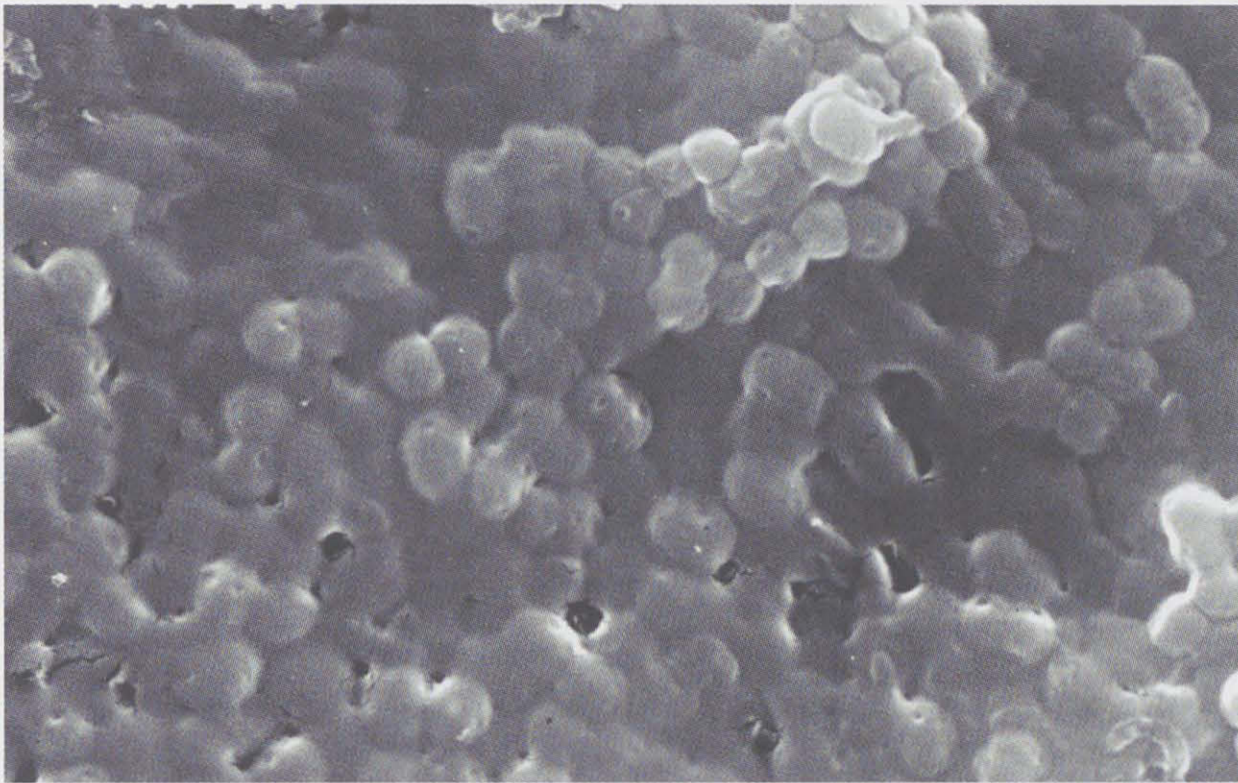
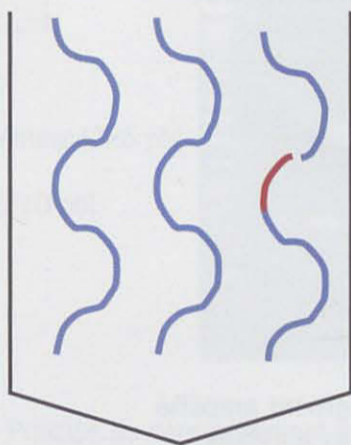


Figure 7 - Relation en coordonnées logarithmiques entre les mesures d'activité β -D-glucuronidasique et les dénombrements sur gélose de coliformes fécaux, effectués sur une large gamme d'eaux de surface. Droite de régression : $\text{Log (act glucuronidasique)} = 0,61 \cdot \text{Log (CF/100 ml)} - 0,07$; $r^2 = 0,83$, $n = 163$, $p < 0,001$ (George *et al.*, 1999).



Les bactéries de l'estuaire de la Seine sont le plus souvent organisées en biofilms au sein desquels elles peuvent se maintenir dans un état viable et non cultivable.

ADN totaux extraits



Extraction de l'ADN

En moyenne, 250 à 500 µg d'ADN nettoyé sont extraits dans 500 ml d'eau de la Seine, soit 10^{11} à $5 \cdot 10^{12}$ génomes bactériens. Le génome d'une bactérie comme *Escherichia coli* a une taille de $4 \cdot 10^6$ paires de bases (pb), une masse de l'ordre de 5 fg et correspond à 2 000 gènes.

Amplification génique (PCR, RT PCR)

Amplification d'un gène d'intérêt



Gènes recherchés dans le cadre du programme Seine-Aval

- Gènes spécifiques des bactéries, ADNr16S.
- Gènes spécifiques de genres ou d'espèces bactériens : *Salmonella*, *Nitrobacter*.
- Gènes spécifiques de métabolisme : le gène *cadA*.
- Gènes spécifiques de virus.

Figure 8 - Principe de la recherche de microorganismes dans les eaux de la Seine par une approche de biologie moléculaire.

Détection moléculaire des microorganismes

Dans l'approche mise en œuvre, les microorganismes bactériens et viraux ne sont pas recherchés par les méthodes classiques de culture (sur gélose pour les bactéries, sur cellules pour les virus). Les méthodes développées détectent des séquences spécifiques d'acides nucléiques (l'acide désoxyribonucléique - ADN - pour les bactéries, l'acide ribonucléique - ARN - ou l'ADN pour les virus) des microorganismes recherchés. Dans le chromosome de chaque cellule bactérienne, il existe en effet des séquences d'ADN hautement spécifiques du genre, de l'espèce voire d'activités enzymatiques propres à chaque microorganisme. De même, il existe des séquences d'ARN ou d'ADN spécifiques de chaque famille ou de chaque genre viral. La technique de détection moléculaire décrite ci-dessous et sur la figure 8 offre l'avantage de dénombrer les bactéries qui sont dans un état viable et non cultivable. Cette méthode permet aussi de rechercher des virus non détectables par les techniques classiques.

Une méthode originale d'extraction des acides nucléiques (ADN, ARN) bactériens et viraux à partir de prélèvements d'eau de la Seine a donc été développée (Petit *et al.*, 1999). Cette méthode d'extraction permet de traiter des volumes de 300 à 500 ml d'eau et d'éliminer au cours des différentes étapes les principaux polluants et les acides humiques qu'ils contiennent et qui inhibent la réaction de PCR. Ainsi, après extraction de l'ADN bactérien présent dans un échantillon d'eau de la Seine, on peut rechercher la séquence d'ADN spécifique par la technique d'amplification génique. Cette technique appelée PCR (Polymerase Chain Reaction), dont le principe est expliqué à la figure 9, permettra de recopier en plusieurs centaines de millions d'exemplaires le fragment d'ADN (voir ci-dessous); il sera alors possible de visualiser sa présence après migration électrophorétique sur gel d'agarose (voir p. 17 et 21).

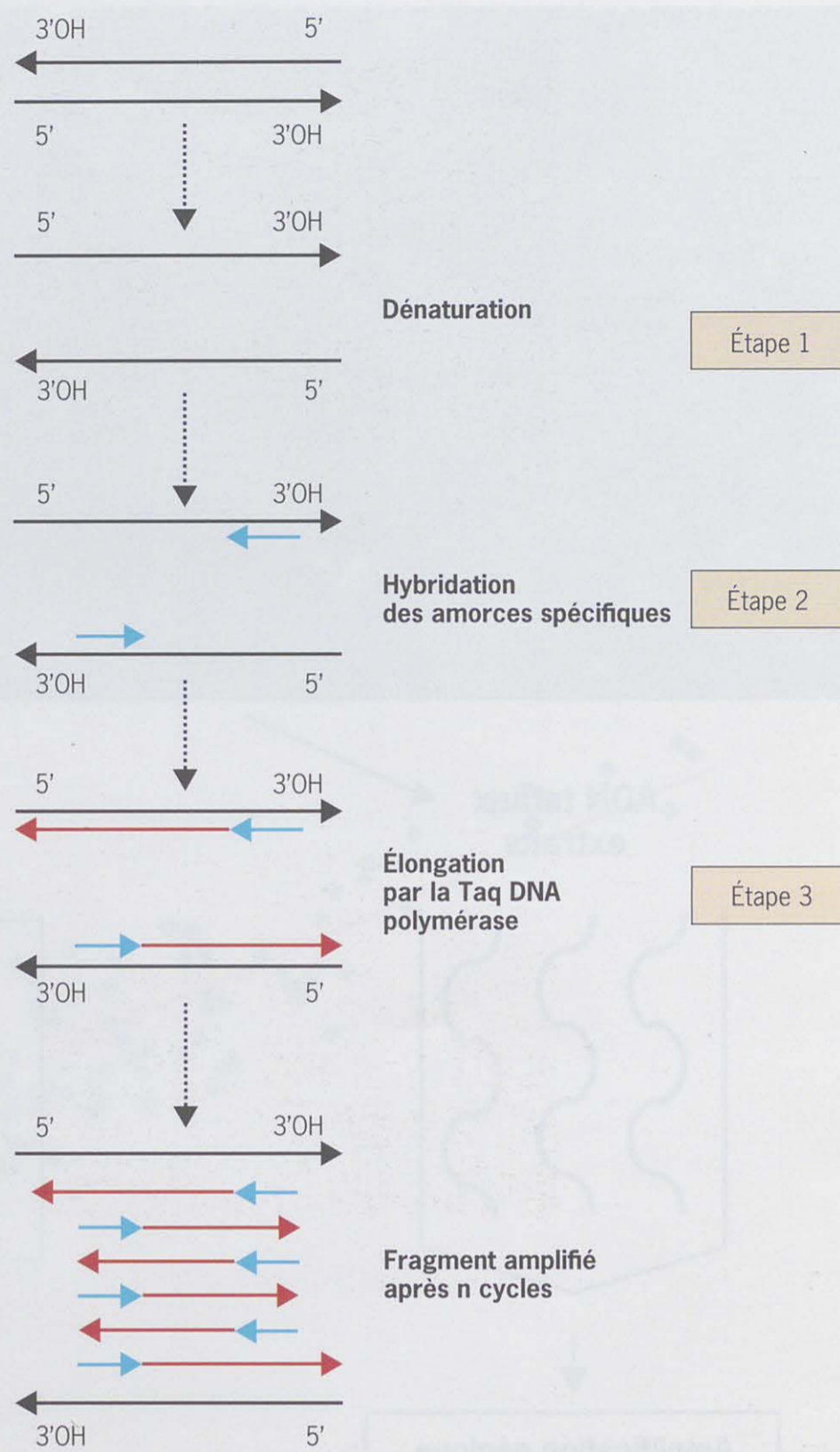


Figure 9 - Schéma du principe de l'amplification génique (PCR).

La technique d'amplification génique (PCR)

La technique d'amplification génique, plus souvent appelée technique de PCR (de l'anglais Polymerase Chain Reaction), a été découverte en 1988 par l'équipe de K. Mullis et lui a valu le prix Nobel de chimie 1993. La meilleure connaissance des propriétés physicochimiques de l'ADN, de sa réplication et l'analyse de ses séquences ont permis de concevoir la technique d'amplification de gènes reconstituant les réactions cellulaires dans un tube de 50 microlitres. L'ADN est structuré en une double hélice constituée de deux chaînes, composées de quatre bases nucléotidiques (A, T, C, G). Ces deux brins sont complémentaires l'un à l'autre : l'adénine (A) s'associe à la thymine (T) et la cytosine (C) à la guanine (G). À température élevée, les deux brins de la double hélice se séparent (fig. 9, étape 1). Puis la température diminue jusqu'à atteindre une valeur qui favorise l'association spécifique (on parle alors d'hybridation) à de courtes séquences d'ADN. Ces séquences, appelées amorces,

ont été choisies de façon à hybrider les extrémités de la séquence d'ADN recherchée (fig. 9, étape 2). À l'issue de cette étape d'hybridation, une enzyme (TAQ polymérase) s'accroche aux extrémités de ces amorces et synthétise une séquence d'ADN strictement complémentaire au brin. Ainsi, la séquence recherchée est recopiée deux fois. L'ensemble de ces étapes est appelé un cycle d'amplification. Une réaction d'amplification génique nécessite 25 à 35 cycles. À la fin de la réaction, si la séquence recherchée est présente dans l'échantillon à analyser, elle est recopiée de façon exponentielle : à partir d'une seule séquence, on obtient plusieurs millions, voire milliards, de copies en quelques heures. Pour l'amplification des génomes à acide ribonucléique (ARN), une étape de copie de l'ARN en ADN est nécessaire avant l'amplification. Cette étape préalable est assurée par une autre enzyme (la reverse transcriptase). On parle alors de RT-PCR.

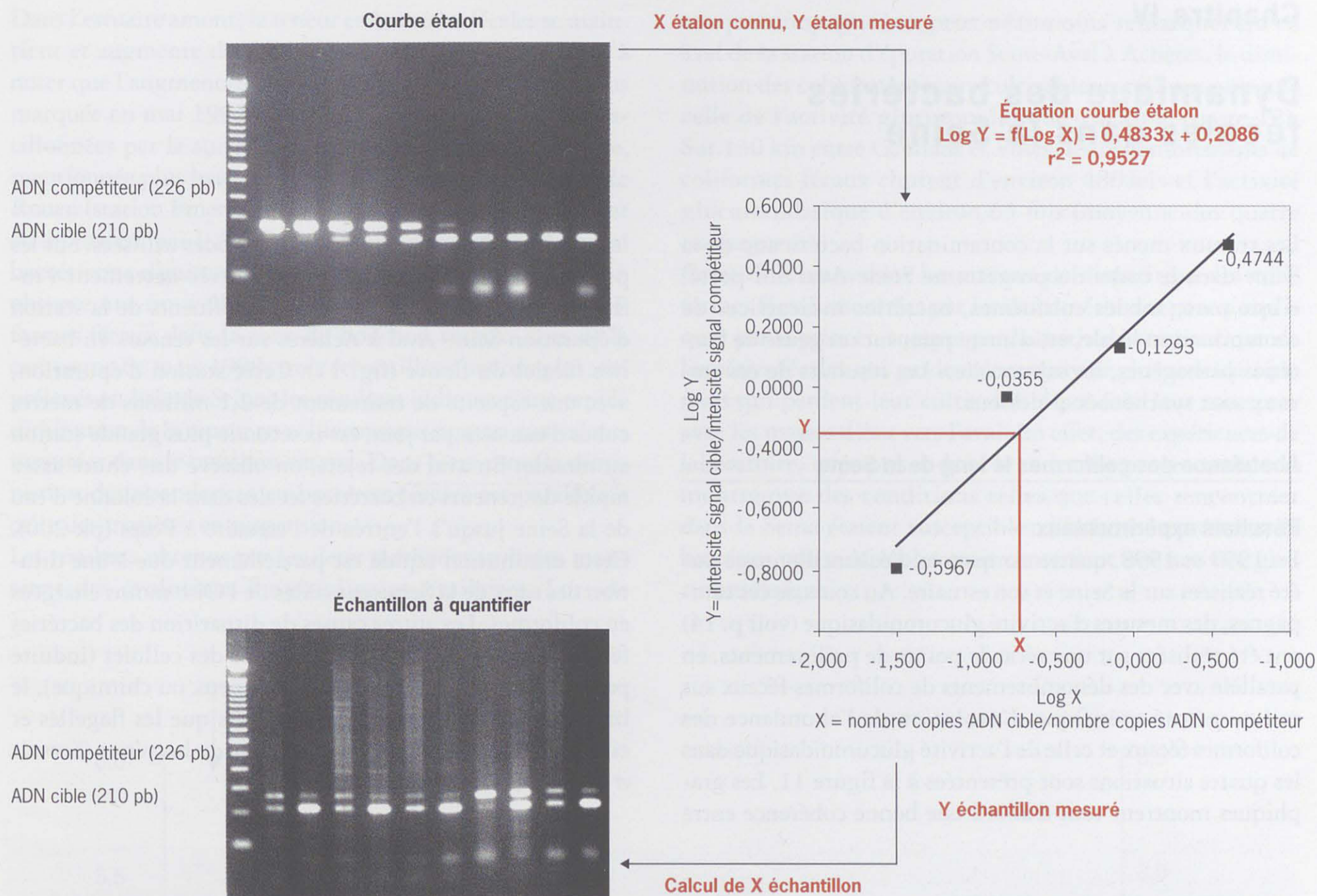


Figure 10 - Principe du dénombrement de bactéries coliformes par PCR compétitive.

Dans certaines conditions, la technique de PCR peut être utilisée pour dénombrer certains microorganismes, on parle alors de dénombrement par PCR compétitive (voir ci-dessous). Un exemple de numération des bactéries coliformes par cette technique est présenté à la figure 10. Dans cet exemple, nous nous sommes intéressés au gène codant pour une enzyme spécifique de ces bactéries. D'autres bactéries ont été dénombrées dans l'estuaire par la technique de PCR compétitive, par exemple, les bactéries nitrifiantes (Berthe *et al.*, 1999).

La PCR compétitive

Pour quantifier une séquence d'ADN spécifique des bactéries appartenant au groupe des coliformes, on ajoute dans chaque échantillon analysé par la technique de PCR une quantité connue d'une séquence quasi identique à celle recherchée. Cette séquence appelée ADN compétiteur s'hybridera avec les mêmes amorces mais permettra une amplification d'une séquence de taille inférieure. Ainsi, plus il y a de bactéries coliformes dans l'échantillon à analyser, moins

on amplifiera cette séquence ajoutée ; il y a une compétition entre les deux séquences. Cette technique de PCR compétitive est particulièrement appropriée à l'étude de l'eau de la Seine car elle permet de comparer différents échantillons dont la composition en contaminants métalliques et en acides humiques, connus pour modifier l'efficacité de la réaction de polymérisation de l'ADN, peut varier selon les sites étudiés.

Chapitre IV

Dynamique des bactéries fécales dans la Seine

Les travaux menés sur la contamination bactérienne de la Seine dans le cadre du programme Seine-Aval ont porté, d'une part, sur les coliformes, bactéries indicatrices de contamination fécale, et, d'autre part, sur un genre de bactéries pathogènes, les salmonelles. Les résultats de ces travaux sont synthétisés ci-dessous.

Abondance des coliformes le long de la Seine

Résultats expérimentaux

En 1997 et 1998, quatre campagnes d'échantillonnage ont été réalisées sur la Seine et son estuaire. Au cours de ces campagnes, des mesures d'activité glucuronidase (voir p. 14) ont été réalisées sur une série de points de prélèvements, en parallèle avec des dénombrements de coliformes fécaux sur milieu gélosé spécifique. L'évolution de l'abondance des coliformes fécaux et celle de l'activité glucuronidase dans les quatre situations sont présentées à la figure 11. Les graphiques montrent tout d'abord une bonne cohérence entre

les résultats obtenus par les deux méthodes utilisées. Sur les profils longitudinaux, on remarque très nettement l'influence des rejets, dans la Seine, des effluents de la station d'épuration Seine-Aval à Achères sur les teneurs en bactéries fécales du fleuve (fig. 11). Cette station d'épuration, avec une capacité de traitement de 2,1 millions de mètres cubes d'eau usée par jour, est la seconde plus grande station au monde. En aval des rejets, on observe une chute assez rapide des teneurs en bactéries fécales dans la colonne d'eau de la Seine jusqu'à l'entrée de l'estuaire à Poses (pk 200). Cette diminution rapide est partiellement due à une dilution des eaux de la Seine par celles de l'Oise moins chargées en coliformes. Les autres causes de disparition des bactéries fécales sont : la sédimentation, la lyse des cellules (induite par des virus ou liée à un stress lumineux ou chimique), le broutage par des microorganismes tels que les flagellés et ciliés qui sont connus pour se nourrir de bactéries (Servais *et al.*, 1992 ; Menon *et al.*, 1996).

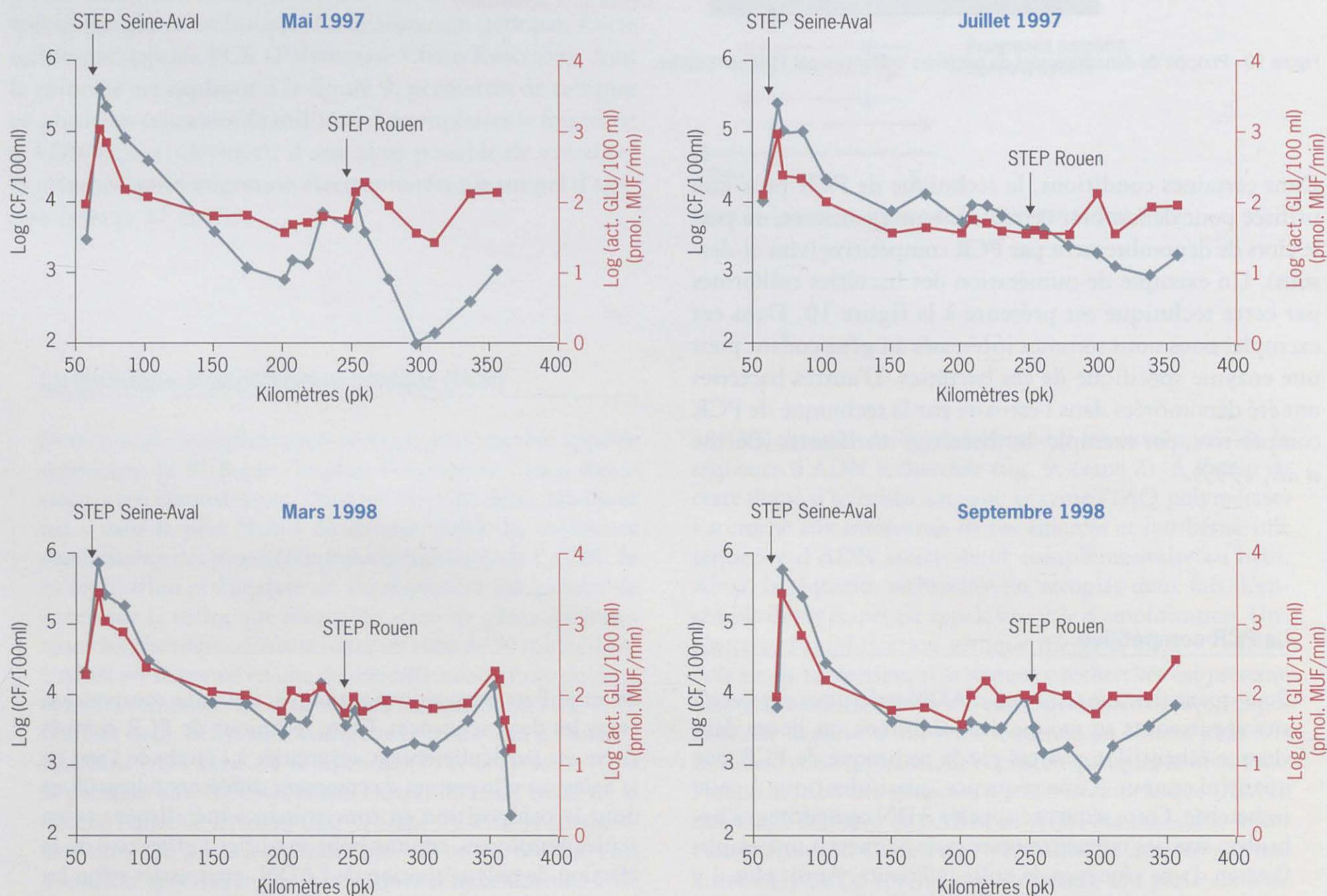


Figure 11 - Abondance des coliformes fécaux dénombrés sur milieu gélosé spécifique (CF) (◆) et activité glucuronidase (act. GLU) (■) par 100 ml d'échantillon à différentes stations du bassin hydrographique de la Seine en 1997 et 1998. (STEP = station d'épuration).

Dans l'estuaire amont, la teneur en bactéries fécales se maintient et augmente dans l'agglomération de Rouen. Il est à noter que l'augmentation dans la région rouennaise est plus marquée en mai 1997 que lors des trois situations échantillonnées par la suite. Ceci confirme l'influence positive, mentionnée plus haut, de la nouvelle station d'épuration de Rouen (station Émeraude) qui n'était pas encore totalement en service en mai 1997. En aval de Rouen, la contamination bactérienne diminue. Lors de chacune des campagnes, on observe une nouvelle augmentation de la teneur en coliformes fécaux dans la zone du bouchon vaseux. Lors de la campagne de mars 1998, trois échantillons ont, de plus, été prélevés en baie de Seine; les résultats indiquent une rapide diminution de la teneur en coliformes par rapport aux valeurs mesurées dans le bouchon vaseux. Dans cette zone, la diminution des abondances en bactéries fécales est parallèle à celle des matières en suspension.

Les résultats obtenus par les deux méthodes utilisées montrent des évolutions longitudinales similaires. Lors de

chaque campagne, on peut néanmoins remarquer qu'en aval de la station d'épuration Seine-Aval à Achères, la diminution des coliformes fécaux cultivables est plus rapide que celle de l'activité glucuronidasique (exemple figure 12). Sur 130 km entre Conflans et Poses, les dénombrements de coliformes fécaux chutent d'environ 480 fois et l'activité glucuronidasique d'environ 65 fois (moyenne des quatre campagnes).

Cette différence dans les vitesses de disparition des coliformes fécaux mesurés par les deux méthodes peut s'expliquer par la prise en compte par la méthode enzymatique de bactéries fécales qui gardent leur activité glucuronidasique mais qui perdent leur cultivabilité pendant leur transport avec les masses d'eau vers l'aval. En effet, des expériences de laboratoire, entreprises dans le cadre du programme, ont montré que des conditions telles que celles rencontrées dans la Seine étaient susceptibles d'induire la présence de bactéries non cultivables mais conservant une activité glucuronidasique.

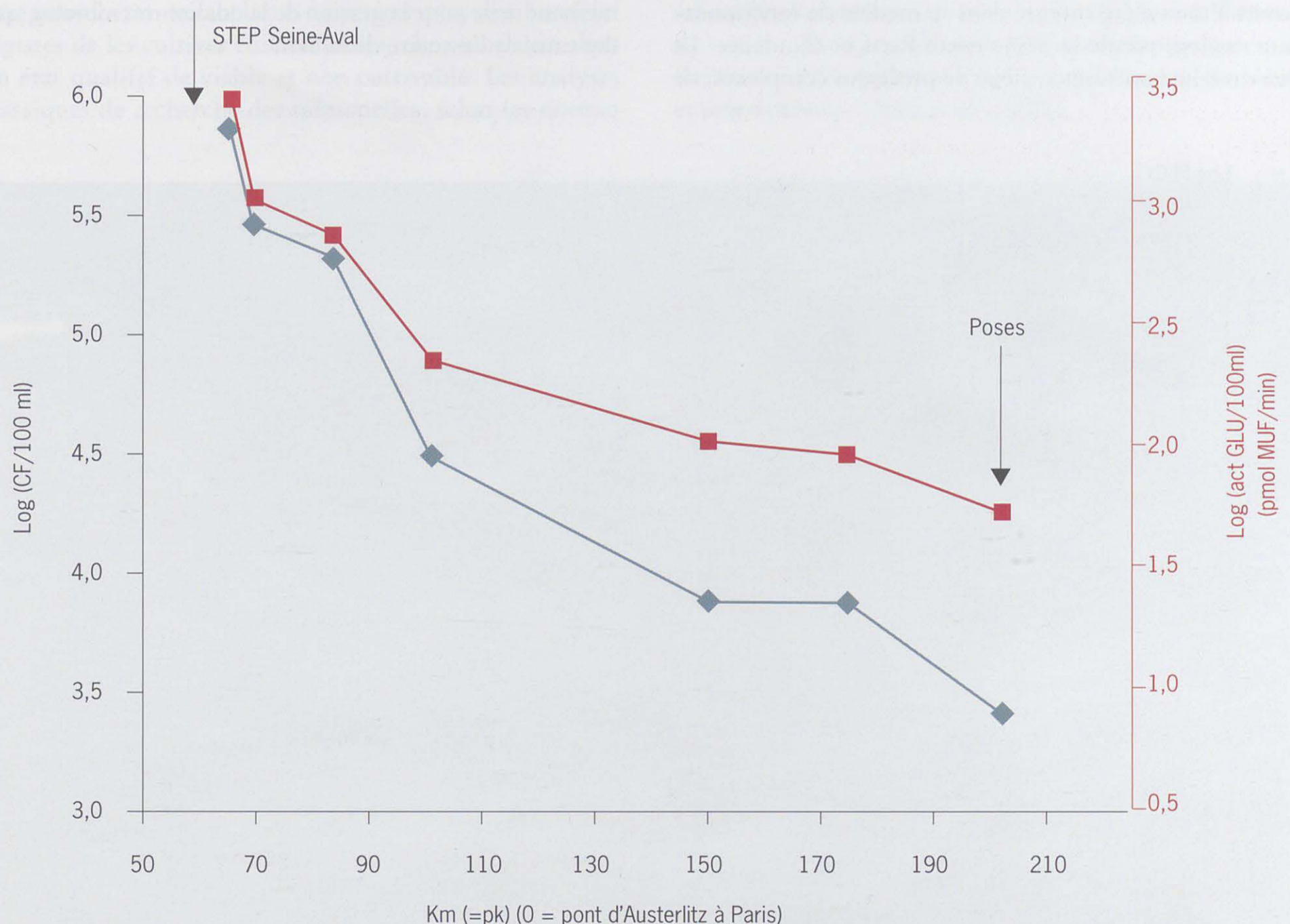


Figure 12 - Teneurs en bactéries fécales (◆) et activités glucuronidasiques (■) mesurées dans la Seine en aval de la station d'épuration Seine-Aval à Achères au mois de mars 1998.

Première ébauche de modélisation de la dynamique des coliformes dans la Seine

Dans le cadre de ce travail, une première ébauche de modélisation des coliformes fécaux dans la Seine a été entreprise. Ce modèle prend en compte les processus suivants :

- les apports de coliformes par les effluents urbains. On considère une charge en coliformes proportionnelle à la charge en matière organique biodégradable dans les rejets ;
- la croissance des coliformes dans la Seine est considérée comme négligeable car ce fleuve ne constitue pas un environnement favorable pour ce type de bactéries ;
- la mortalité des coliformes est caractérisée par une cinétique du premier ordre. Le modèle prend de plus en compte un terme du premier ordre représentant la perte de cultivabilité puisque, jusqu'à présent, les résultats du modèle cherchent à simuler les profils d'abondance en coliformes tels qu'estimés par les comptages sur milieu gélosé ;
- un terme de sédimentation des bactéries fécales est considéré mais la remise en suspension de coliformes cultivables n'est pas prise en compte.

Ce module prenant en considération la dynamique des coliformes fécaux a été intégré dans le modèle de fonctionnement écologique de la Seine entre Paris et Caudebec. La zone du bouchon vaseux, siège de processus complexes, de

sédimentation-resuspension, n'a pas été modélisée pour l'instant. La figure 13 présente la comparaison des résultats expérimentaux et des simulations calculées par le modèle pour une situation échantillonnée en mai 1997.

On voit qu'il existe une bonne cohérence entre les résultats expérimentaux et les valeurs d'abondance en coliformes fécaux calculées par le modèle. Ainsi, la très nette augmentation en coliformes due aux rejets de la station d'épuration Seine-Aval, une soixantaine de kilomètres en aval de Paris, est bien simulée par le modèle ainsi que la diminution de l'abondance après ce gros apport. Plus en aval, chaque augmentation résulte d'un apport par les rejets de diverses stations d'épuration. Après chacun de ces apports, on observe une diminution liée aux processus de sédimentation, lyse et broutage de ces bactéries évoqués plus haut. Bien qu'il s'agisse d'un modèle assez simple dans sa version actuelle, la bonne cohérence entre les résultats du modèle et les observations expérimentales atteste la capacité du modèle à décrire correctement à la fois les apports de coliformes et les facteurs qui contrôlent la disparition de ces bactéries. Dans sa version définitive, ce modèle sera un outil extrêmement utile pour la gestion de la qualité microbiologique des eaux de l'estuaire de la Seine.

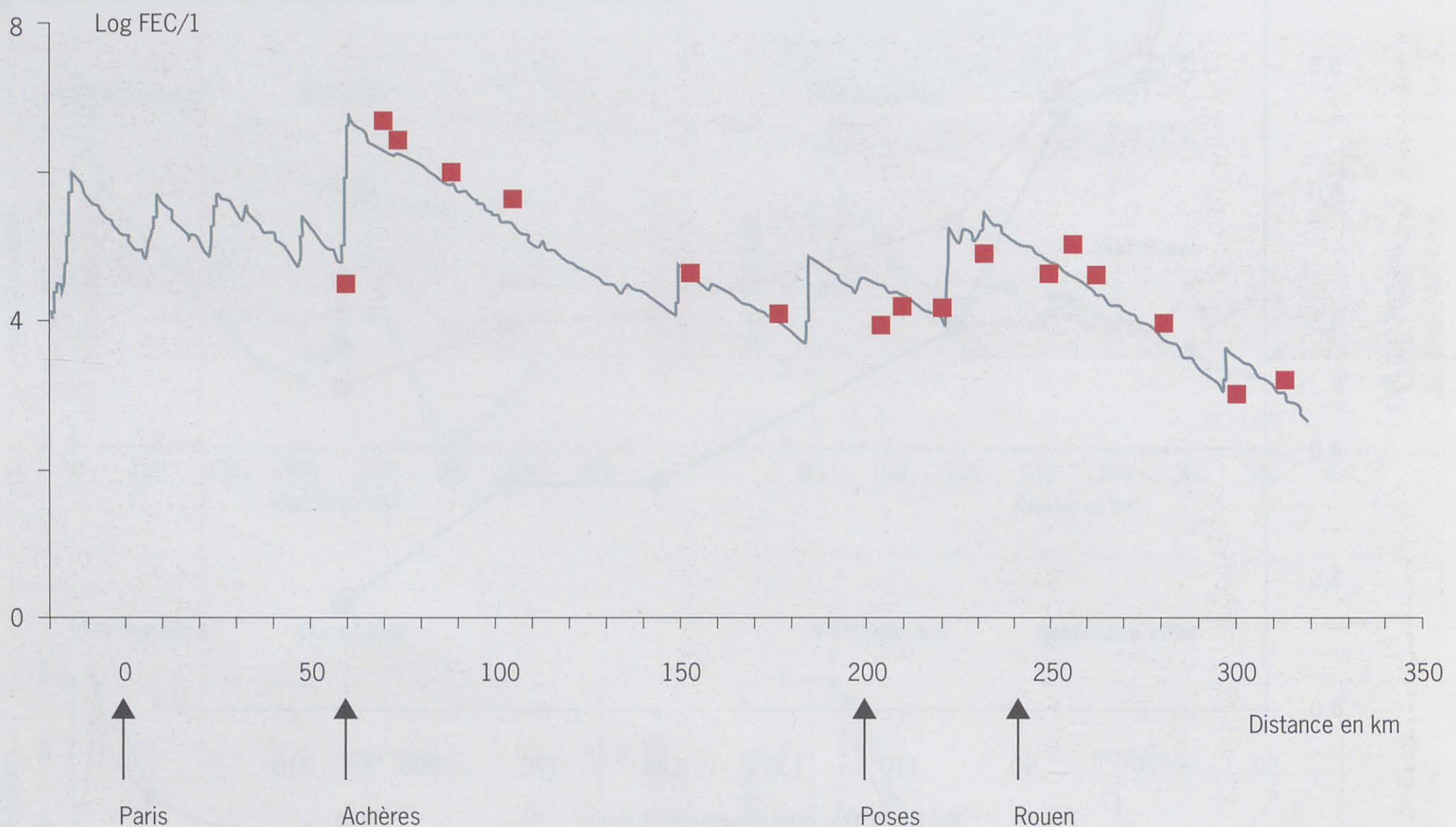
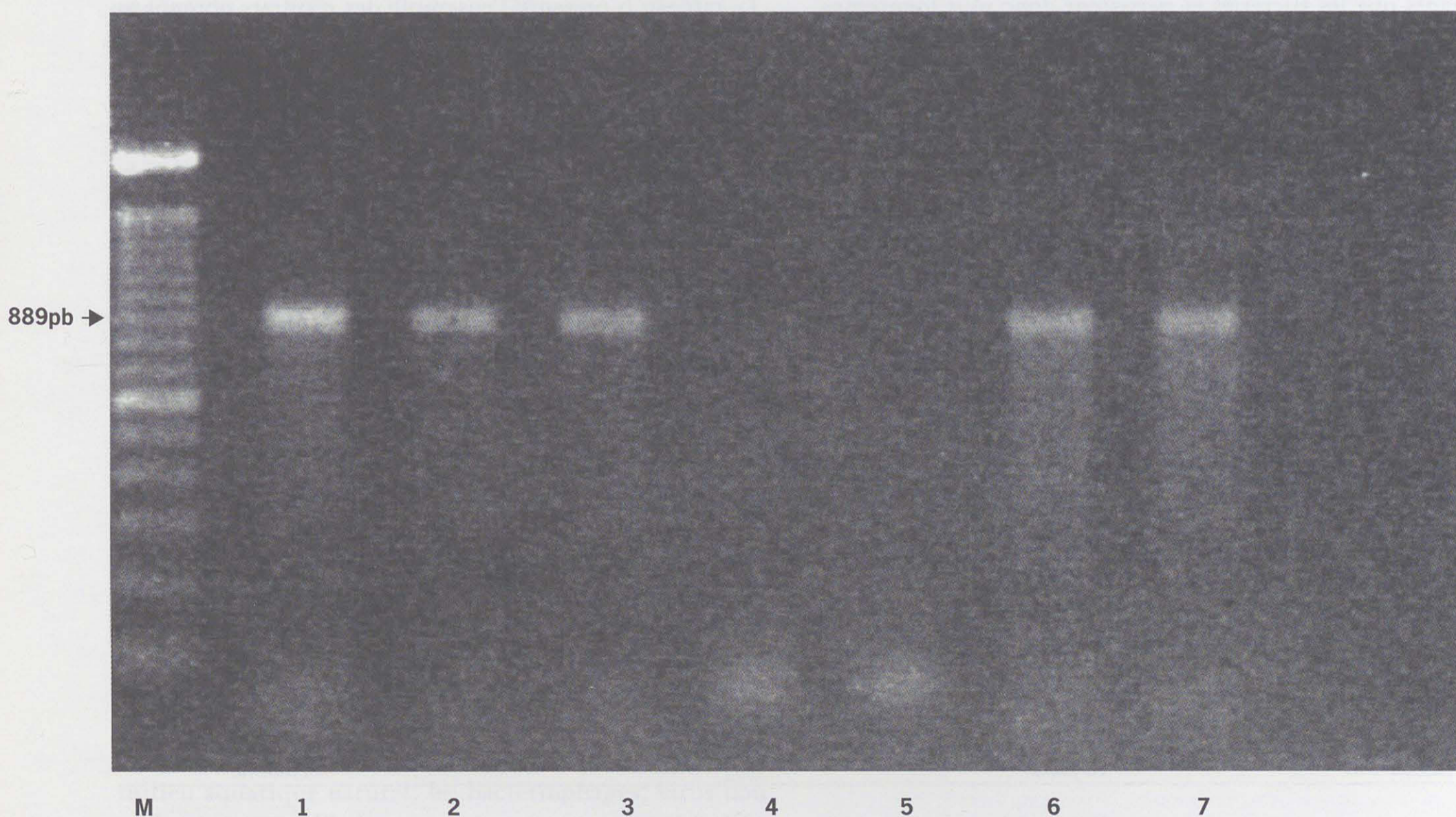


Figure 13 - Simulation du profil de l'abondance des coliformes fécaux et résultats expérimentaux (■) dans la Seine entre l'aval de Paris et de Caudebec (situation de mai 1997), valeurs exprimées en Log du nombre de coliformes par litre.

Détection de *Salmonella* non cultivables dans les eaux de l'estuaire de la Seine

À côté des travaux menés sur les coliformes décrits ci-dessus, des chercheurs du programme Seine-Aval se sont attachés à détecter la présence de bactéries pathogènes, les salmonelles, dans l'estuaire par des techniques originales. Les bactéries du genre *Salmonella*, communément appelées salmonelles, sont responsables de gastroentérites sévères. Le plus souvent, elles sont évacuées dans les eaux de l'estuaire par l'intermédiaire des effluents provenant de stations d'épuration ou de centres d'élevage intensif; elles peuvent alors se concentrer dans certains organismes filtreurs comme les moules et occasionner des maladies chez l'homme. Le milieu estuarien ne constitue pas un environnement favorable à la croissance des salmonelles; les basses températures, la raréfaction de la nourriture, voire la présence de polluants les contraignent à modifier leur métabolisme pour survivre. Le plus souvent, l'adaptation de ces bactéries dans ce nouvel écosystème est favorisée par leur attachement aux particules, ce qui améliore leur survie dans les eaux de l'estuaire; mais leur nouvel état métabolique ne permet plus aux bactériologistes de les cultiver en laboratoire, elles sont alors dans un état qualifié de viable et non cultivable. Les analyses classiques de recherche des salmonelles, selon les normes

préconisées pour le contrôle de la qualité des eaux, sont basées sur des techniques de mise en culture qui se révéleront donc mal adaptées à l'étude des salmonelles présentes dans les eaux de l'estuaire. Dans le cadre du programme Seine-Aval, la recherche des bactéries du genre *Salmonella* par les techniques de biologie moléculaire développées au chapitre précédent a été entreprise. Chaque salmonelle possède dans son génome un gène qui code pour son flagelle, structure filiforme qui lui confère sa mobilité. La technique de PCR utilisée permet l'amplification génique d'une séquence d'ADN, de taille correspondant à 889 paires de bases (pb), spécifique de ce gène. Cette séquence d'ADN ne pourra donc être amplifiée à partir d'échantillons d'eau de la Seine que si des salmonelles sont présentes. Lors d'une campagne d'analyse longitudinale de l'estuaire (juillet 1995), nous avons ainsi observé que, dans des échantillons pour lesquels il n'avait pas été isolé de salmonelles cultivables, il était possible de détecter la présence de ces bactéries par amplification génique. Ce résultat démontre très clairement l'existence dans l'estuaire de ce genre de bactéries dans un état viable mais non cultivable. Une analyse plus précise de ces échantillons a montré (fig. 14) que, dans les eaux de l'estuaire de la Seine, les salmonelles peuvent s'associer aux particules facilement décantables et s'y maintenir dans un état viable et non cultivable (Petit *et al.*, 1999).



L'échantillon d'eau de la Seine a été fractionné de façon à analyser l'ADN provenant de trois groupes de bactéries : les bactéries associées aux particules (puits n° 2 et 3), les bactéries non associées aux particules (puits 4 et 5), une troisième fraction où les bactéries peuvent être indifféremment libres ou associées aux particules (puits 6 et 7). Le puits n° 1 (témoin positif) montre qu'une séquence de 889 paires de bases (pb) est spécifiquement amplifiée par cette technique de PCR lorsque l'ADN du génome de salmonelle est présent dans l'échantillon. Les puits 2, 3, 6 et 7 montrent qu'il est possible d'amplifier une séquence identique à celle du puits n° 1, ce qui démontre la présence de salmonelles non cultivables dans les fractions où les bactéries sont majoritairement associées aux particules.

Figure 14 - Visualisation des produits d'amplification génique (après électrophorèse sur gel d'agarose) obtenus par analyse PCR d'un échantillon d'eau de la Seine, où aucune bactérie du genre *Salmonella* n'a été isolée par la technique de mise en culture.

Chapitre V

Contamination virale de l'estuaire de la Seine

Les virus n'ont pas d'autonomie de multiplication, ce sont des parasites intracellulaires qui se développent dans les organismes vivants. Éliminés dans les selles à des concentrations importantes, les virus sont présents dans les eaux usées (tab. 5). Lorsque celles-ci sont traitées en station d'épuration, 90 à 98 % des virus sont retenus mais les eaux épurées véhiculent encore des quantités notables de virus qui sont rejetées dans les eaux de surface.

Dispersés dans les eaux de la Seine par les effluents urbains, les virus peuvent disparaître (par capture par des microorganismes ou des êtres vivants environnants), s'inactiver ou persister dans le milieu extérieur sous forme agrégée ou adsorbée à des particules. Ils ont alors un comportement similaire aux matières en suspension ; ils peuvent être transportés et subir les phénomènes hydrosédimentaires caractéristiques de l'estuaire (cycles de sédimentation et de remise en suspension).

En raison de l'absence de métabolisme limitant leurs échanges avec le milieu extérieur, les virus sont plus résistants que les bactéries et persistent donc plus longtemps. Leur survie dépend de leurs propriétés physicochimiques et des caractéristiques du milieu. Parmi les facteurs environnementaux susceptibles d'influencer la persistance des virus, la température est le facteur inactivant le plus important. L'aptitude des virus entériques à persister dans le milieu extérieur s'explique par leurs caractéristiques structurales. Les protéines des capsides, qui constituent la majeure partie de la surface des virus, ont des propriétés physicochimiques qui leur permettent non seulement de s'adsorber aux particules solides en suspension dans l'eau mais aussi de résister à l'action dénaturante de nombreuses substances chimiques.

Le pH et la concentration en matières organiques dissoutes du milieu modifient les propriétés d'adsorption des virus et influencent ainsi la durée de leur survie. Recouvert et protégé par la capside, l'acide nucléique peut toutefois être atteint par certains agents inactivants (rayons UV). Dans les eaux douces et estuariennes, la demi-vie du poliovirus varie de 3 à 40-45 jours selon la température et le degré d'ensoleillement.

Dans le cadre du programme Seine-Aval, la méthode moléculaire présentée à la page 16 a été appliquée à la détection de différents virus au cours de plusieurs campagnes de prélèvements effectuées entre 1995 et 1998 en douze sites entre Poses et Honfleur. Des gènes spécifiques des principaux virus entériques (entérovirus, adénovirus, astrovirus, calicivirus apparentés au virus de Norwalk) ont été recherchés. Pour chaque virus cherché, une réaction de RT-PCR ou de PCR à l'aide d'amorces spécifiques du gène étudié a été mise au point après analyse des séquences publiées dans la bibliographie scientifique (Castignolles *et al.*, 1998).

Le tableau 6 présente l'ensemble des résultats obtenus au cours de trois campagnes de recherche des virus effectuées dans l'estuaire de la Seine. Les stations échantillonnées sont indiquées sur la carte de la figure 2. Pris dans leur ensemble, les résultats obtenus au cours des trois campagnes montrent une grande variabilité de la répartition spatiale et temporelle de la contamination virale. Les sites analysés semblent pouvoir être regroupés en deux catégories : les sites systématiquement contaminés quelque soit la campagne et les sites contaminés de façon plus aléatoire comme Heurteville et Tancarville (tab. 6a). Des virus différents peuvent être à l'origine de la contamination d'un même site.

Tableau 5 - Excrétion virale et réservoir des virus entériques (d'après Nicand *et al.*, 1998).

Virus	Durée moyenne d'excrétion	Concentration virale par gramme de selles	Réservoir
Entérovirus	1 mois	10^3-10^6	Homme
Hépatite A	3 semaines	10^9	Homme, Primates
Rotavirus	10 jours	10^{10}	Homme, Mammifères, Oiseaux
Virus Norwalk, Calicivirus	3 jours	$> 10^6$	Homme
Hépatite E	2 semaines	$> 10^9$	Homme, Porc, Oiseaux, Rats
Astrovirus	12 jours	$> 10^6$	Homme, Mammifères
Coronavirus	?	?	Homme
Adénovirus	10 jours	$> 10^6$	Homme

Tableau 6 - Répartition spatio-temporelle de la contamination virale des eaux dans l'estuaire de la Seine au cours de trois campagnes d'échantillonnage (mai 1997, mars 1998 et septembre 1998).

Sites étudiés	Mai 97	Mars 98	Sept. 98	Trois campagnes cumulées
Poses amont	2/3	2/4	2/4	6/11
Elbeuf	3/3	2/4	2/4	7/11
Aval de Rouen	2/3	2/4	/	4/7
La Bouille	2/3	4/4	/	6/7
Heurteauville	0/3	2/4	1/4	3/11
Caudebec	1/3	3/4	/	4/7
Tancarville	0/3	2/4	1/4	3/11

a) Nombre de virus détectés/nombre de virus recherchés par PCR pour chaque campagne et pour les trois campagnes cumulées. Lors des trois campagnes, les entérovirus, les adénovirus et les astrovirus ont été recherchés, les calicivirus ont de plus été recherchés en mars et septembre 1998.

Virus recherchés	Mai 97	Mars 98	Sept. 98	Trois campagnes cumulées
Adénovirus	6/11	10/12	7/7	23/30
Entérovirus	5/11	9/12	1/7	15/30
Astrovirus	1/11	2/12	0/7	3/30
Calicivirus	NT	5/12	2/7	7/19

b) Nombre de stations où le virus a été détecté/nombre de stations où le virus a été recherché.

Parmi les quatre types de virus étudiés dans le cadre du programme, il apparaît une prédominance des adénovirus qui sont détectés au plus grand nombre de stations lors des trois campagnes (tab. 6b). Des résultats similaires montrant cette prédominance des adénovirus ont aussi été obtenus dans des eaux de rivière de la banlieue de Barcelone par un autre laboratoire (Pina *et al.*, 1998). Ainsi, l'abondance des adénovirus et leur stabilité dans l'environnement en feraient un indicateur de choix de contamination virale des milieux aquatiques.

La détection simultanée de plusieurs génomes à partir d'un prélèvement d'eau de la Seine offre donc une méthodologie intéressante pour l'appréciation de la contamination virale. Il faut toutefois noter que les résultats obtenus permettent de conclure à la présence de certains virus à un moment donné dans l'estuaire de la Seine sans pouvoir préjuger de leur caractère infectieux. Pour apprécier la survie des virus en milieu aquatique naturel, les bactériophages, virus non pathogènes pour l'homme, peuvent être aussi recherchés.

Plus abondants et plus résistants que les virus pathogènes pour l'homme, certains bactériophages sont actuellement évalués comme indicateurs de contamination et de persistance virales dans les milieux hydriques (Vilagines *et al.*, 1996). Par ailleurs, il est nécessaire à terme d'accompagner la recherche des virus dans la Seine par une étude épidémiologique permettant d'évaluer les risques pour la santé humaine de la présence de virus dans les eaux de l'estuaire.

Conclusion

Les résultats des suivis réguliers de la qualité microbiologique des eaux effectués depuis une vingtaine d'années dans l'estuaire de la Seine permettent d'avoir une vision assez claire des niveaux de contamination, d'une part, et des grandes tendances évolutives, d'autre part. Pour ce qui est des niveaux de contamination, on peut dire qu'ils sont relativement élevés puisque les abondances en bactéries d'origine fécale sont quasiment toujours supérieures à celles fixées par les normes européennes comme valeurs guides pour les eaux de baignade. Les maxima dans l'estuaire sont observés entre Rouen et La Bouille; la zone du bouchon vaseux semble, par ailleurs, être une zone d'accumulation de bactéries fécales. Pendant longtemps (de 1977 à 1996), aucune évolution temporelle marquée n'a pu être mise en évidence. Par contre, une diminution significative de l'abondance des bactéries fécales en aval de Rouen a été constatée en 1997 et 1998. Elle s'explique par l'amélioration générale de l'assainissement en région rouennaise ces dernières années avec notamment la mise en service d'une nouvelle station d'épuration.

L'ensemble de ces contrôles de routine, comme ceux effectués ailleurs sur les eaux de surface, sont réalisés au moyen de méthodes qui nécessitent la mise en culture des bactéries avant leur énumération. On sait aujourd'hui que ces méthodes, outre leur temps de réponse souvent très long (plusieurs jours), sont incapables de prendre en compte la totalité des bactéries présentes dans le milieu aquatique car certaines de ces bactéries, bien que présentant certaines caractéristiques de viabilité comme des activités métaboliques, refusent de croître dans les conditions de culture proposées par les méthodes d'énumération. On parle alors de bactéries viables mais non cultivables. Les résultats obtenus sur les salmonelles, lors du programme Seine-Aval, et présentés dans ce fascicule ont permis de démontrer que cette bactérie pouvait survivre dans l'estuaire sous une forme viable mais non cultivable et donc que les méthodes culturales sous-estimaient son abondance.

Dans ces conditions, il est clair qu'un effort important devait être accompli pour trouver de nouvelles manières de détecter les bactéries et les virus dans le milieu aquatique. Dans le programme Seine-Aval, un pas important a été fait dans ce sens, puisque de nouvelles méthodes ont été développées puis appliquées à la recherche et l'énumération de bactéries et virus dans l'estuaire de la Seine. Une méthode enzymatique permettant l'énumération rapide d'*Escherichia coli*, le coliforme d'origine fécale le plus abondant, a été développée puis utilisée afin d'appréhender la dynamique de ce type de bactéries. Un modèle de la dynamique des bactéries fécales dans la Seine a ainsi pu être développé. Il devrait constituer, dans l'avenir, un outil précieux en matière de gestion de la qualité microbiologique dans eaux du bassin.

Par ailleurs, des techniques basées sur les progrès récents de la biologie moléculaire ont été développées pour rechercher divers types de bactéries et virus. Nécessitant actuellement un temps de travail au laboratoire important, ces techniques n'ont jusqu'à présent pu être appliquées qu'à un nombre restreint d'échantillons. Elles apportent dès à présent des éléments intéressants quant à la contamination virale de l'estuaire de la Seine et elles ouvrent très certainement la voie à un large champ d'investigation.

Références bibliographiques

- Abad F. X., Pinto R. M., Villena C., Gajardo R., Bosch A., 1997. Astrovirus survival in drinking water. *Appl. Environ. Microbiol.*, 63, 3119-3122.
- Amann R.I., Ludwig W., Schleifer K., 1995. Phylogenetic identification and *in situ* detection of individual cells without cultivation. *Microbiol. Rev.*, 59, 143-169.
- Barcina I., Gonzales J.-M., Iriberry J., Egea L., 1989. Effect of visible light on progressive dormancy of *Escherichia coli* cells during the survival process in natural fresh water. *Appl. Environ. Microbiol.*, 55, 246-251.
- Berthe T., Garnier J., Petit F., 1999. Quantification de bactéries nitrifiantes du genre *Nitrobacter* en milieux aquatiques (estuaire de la Seine, France). *C. R. Acad. Sci.*, 322, 517-526.
- Beytout D., Laveran H., 1994. *Biologie des eaux : méthodes et techniques*. Champiat D. & Larpent J.-P. (éd.), Masson (éd.). Chap I, 1-9.
- Castignolles N., Petit F., Mendel I., Simon L., Cattolico L., Buffet-Janvresse C., 1998. Detection of Adenovirus in the waters of the Seine-River estuary by nested PCR. *Mol. Cell Probes*, 12, 175-180.
- Colwell R.R., Brayton P.R., Grimes D.J., Roszak D.B., Huq S.A., Palmer L.M., 1985. Viable but non-culturable *Vibrio cholerae* and related pathogens in the environment: implications for release of genetically engineered microorganisms. *Biotechnol.*, 3, 817-820.
- Davies C.M., Apte S.C., Peterson S.M., 1995. β -Galactosidase activity of viable, non-culturable coliform bacteria in marine waters. *Lett. Appl. Microbiol.*, 21, 99-102.
- Gantzer C.F., Lucena L., Schwartzbrod L., Jofre J., 1998. Indicateurs de contamination virale du milieu hydrique : mythe ou réalité? *Virologie*, 2, 117-125.
- George I., Petit M., Servais P., 1999. Use of enzymatic methods for rapid enumeration of coliforms in freshwaters. *J. Appl. Bacteriol.* (à paraître).
- Grimes D.J., Colwell R.R., 1986. Viability and virulence of *Escherichia coli* suspended by membrane chamber in semitropical ocean water. *FEMS Microbiol. Lett.*, 34, 161-165.
- Laveran H., Traore O., 1997. Virus et environnement. *In: Virologie moléculaire médicale*. Lavoisier (éd.), 433-442.
- Menon P., Becquevort S., Billen G., Servais P., 1996. Kinetics of flagellates grazing in the presence of two types of bacterial prey. *Microbiol. Ecol.*, 31, 89-101.
- Metcalf T.G., Melnick J.L., Estes M.K., 1995. Environmental virology: from detection of virus in sewage and water by isolation to identification by molecular biology: a trip of over 50 years. *Annu. Rev. Microbiol.*, 49, 461-487.
- Nicand E., Teyssou R., Buisson Y., 1998. Le risque fécal viral en 1998. *Virologie*, 2, 103-116.
- OMS, 1994. Directives de qualité de l'eau de boisson. 2^e éd., vol 1, Recommandations.
- Payment P., Franco E., Fout G. S., 1994. Incidence of Norwalk virus infections during prospective epidemiological study of drinking water related gastrointestinal illness. *Can. J. Microbiol.*, 40, 805-809.
- Petit F., Craquelin S., Guespin-Michel J., Buffet-Janvresse C., 1999. Nucleic acid extraction from polluted estuarine water for detection of viruses and bacteria by PCR and RT-PCR analysis. *Res. Microbiol.*, 150, 143-151.
- Pina S., Puig M., Lucena F., Jofre J., Giones R., 1998. Viral pollution in the environment and in shellfish: human adenovirus detection by PCR as an index of human viruses. *Appl. Environ. Microbiol.*, 64, 3376-3382.
- Pinto R.M., Abad F.X., Gajardo R., Bosch A., 1996. Detection of infectious astroviruses in water. *Appl. Environ. Microbiol.*, 62, 1811-1813.
- Pommepuy M.-L., Fiksdal L., Gourmelon M., Melikechi H., Caprais M.-P., Cormier M., Colwell R.R., 1996. Effect of seawater on *Escherichia coli* β -galactosidase activity. *J. Appl. Bacteriol.*, 81, 174-180.
- Roszak D.B., Colwell R.R., 1987. Survival strategies of bacteria in the natural environment. *Microbiol. Rev.*, 51, 365-379.
- Schwartzbrod L., 1991. *Virologie des milieux hydriques*. Lavoisier (éd.), L. Schwartzbrod (coord.), 303 p.
- Servais P., Billen G., 1990. Le contrôle bactériologique des eaux de baignade. *Trib. Eau*, 43, 24-30.
- Servais P., Vives-Rego J., Billen G., 1992. Survival and mortality of bacteria in natural environments. *In: Release of genetically engineered and other microorganisms*. J.C. Fry & M.J. Day (ed.), Cambridge University Press, 100-119.
- Vilagines P., Sarette B., Pezzana A., Le Guyader M., Cun C., Vilagines R., 1996. Waterborne parasites and viruses still waiting for reliable indicators. *In: Biotechnology for water use and conservation*. OECD Documents (ed.).

Glossaire

Allochtone : par opposition à autochtone, qui n'est pas issu du milieu où il se trouve.

Asymptomatique : se dit d'une infection sans signe clinique mais pour laquelle le malade multiplie et excrète des virus.

Autochtone : qui est issu du milieu même où il se trouve, où il vit.

Effet cytopathogène : traduit, lors de la multiplication virale, les modifications morphologiques de la cellule infectée.

Kyste : forme de résistance que peuvent prendre certains microorganismes.

Pathogénicité : capacité à causer une maladie.

Thermotolérant : se dit d'un microorganisme qui résiste à des températures élevées.

Laboratoires participants au programme Saisie-Audit

Province	Nom du laboratoire	Adresse	Téléphone	Fax	Site Web
Alberta	Laboratoire de microbiologie médicale	2501 20th St. N.W.	(403) 243-3333	(403) 243-3333	www.albertahealthservices.ca
	Laboratoire de microbiologie médicale	2501 20th St. N.W.	(403) 243-3333	(403) 243-3333	www.albertahealthservices.ca
	Laboratoire de microbiologie médicale	2501 20th St. N.W.	(403) 243-3333	(403) 243-3333	www.albertahealthservices.ca
British Columbia	Laboratoire de microbiologie médicale	2501 20th St. N.W.	(604) 275-3333	(604) 275-3333	www.healthlinkbc.ca
	Laboratoire de microbiologie médicale	2501 20th St. N.W.	(604) 275-3333	(604) 275-3333	www.healthlinkbc.ca
	Laboratoire de microbiologie médicale	2501 20th St. N.W.	(604) 275-3333	(604) 275-3333	www.healthlinkbc.ca
Manitoba	Laboratoire de microbiologie médicale	2501 20th St. N.W.	(204) 782-3333	(204) 782-3333	www.healthlinkmb.ca
	Laboratoire de microbiologie médicale	2501 20th St. N.W.	(204) 782-3333	(204) 782-3333	www.healthlinkmb.ca
	Laboratoire de microbiologie médicale	2501 20th St. N.W.	(204) 782-3333	(204) 782-3333	www.healthlinkmb.ca
Ontario	Laboratoire de microbiologie médicale	2501 20th St. N.W.	(416) 322-3333	(416) 322-3333	www.healthlinkontario.ca
	Laboratoire de microbiologie médicale	2501 20th St. N.W.	(416) 322-3333	(416) 322-3333	www.healthlinkontario.ca
	Laboratoire de microbiologie médicale	2501 20th St. N.W.	(416) 322-3333	(416) 322-3333	www.healthlinkontario.ca
Quebec	Laboratoire de microbiologie médicale	2501 20th St. N.W.	(514) 392-3333	(514) 392-3333	www.healthlinkqc.ca
	Laboratoire de microbiologie médicale	2501 20th St. N.W.	(514) 392-3333	(514) 392-3333	www.healthlinkqc.ca
	Laboratoire de microbiologie médicale	2501 20th St. N.W.	(514) 392-3333	(514) 392-3333	www.healthlinkqc.ca

Réalisation, mise en page : XLC (02 98 30 50 07)

Achevé d'imprimer sur les presses de Cloître Imprimeurs

ISBN 2-84433-028-2 Programme Seine-Aval.
ISBN 2-84433-025-8 / Dépôt légal 4^e trimestre 1999

© 1999, Ifremer. Tous droits de reproduction, même partielle,
par quelque procédé que ce soit, sont réservés pour tous pays.

Crédits photos : A. Ficht, couverture - E. Bernard, CHU de Rouen, laboratoire de virologie, p. 6



Laboratoires participants au programme Seine-Aval

Cellule antipollution

- **Service de la navigation de la Seine**

Île Lacroix
71, avenue Chastellain
76100 Rouen

Cellule de suivi du littoral haut normand

16, quai Casimir Delavigne
76600 Le Havre Cedex

Cemagref

- **Division qualité des eaux**

14, avenue de Saint-Mandé
75012 Paris

Cergrene

- **École nationale
des ponts et chaussées**

6-8, avenue Blaise Pascal
Cité Descartes Champs/Marne
77455 Marne-la-Vallée Cedex 2

CHU Rouen

- **Laboratoire de virologie**

1, rue de Germont
76031 Rouen Cedex

CIG - École des Mines de Paris

- **Centre d'informatique géologique**

35, rue Saint-Honoré
77305 Fontainebleau

Ifremer

Direction de l'environnement
et de l'aménagement littoral

- **Département Del/EC**

BP 70
29280 Plouzané

- **Département Del/PC**

BP 21105
44311 Nantes Cedex 3

- **Département Del/PC**

BP 330
83507 La Seyne/Mer Cedex

IPSN

- **Laboratoire d'études
radio-écologiques**

de la façade atlantique
Rue Max-Pol Fouchet - BP 10
50130 Octeville

Muséum national d'histoire naturelle

- **Laboratoire de biologie
des invertébrés marins
et malacologie**

57, rue Cuvier
75231 Paris Cedex 05

Parc naturel régional de Brotonne

- **Mission patrimoine naturel**

Maison du Parc
76940 Notre-Dame-de-Bliquetuit

Université de Caen

- **Laboratoire de morphodynamique
continentale et côtière -
UPRES - A 6143 CNRS**

- **Groupe ornithologique normand
(GONm)**

- **Laboratoire de biologie
et biotechnologies marines**

Esplanade de la Paix
14032 Caen Cedex

Université du Havre

- **Laboratoire d'écotoxicologie**

25 rue Philippe Lebon,
BP 540
76600 Le Havre Cedex

- **Laboratoire de mécanique**

Centre havrais d'études
et de recherche
Quai Frissard - BP 265
76055 Le Havre Cedex

- **Cirtai**

BP 1123
76063 Le Havre Cedex

Université de La Rochelle

- **Laboratoire de biologie
et biochimie**

Pôle sciences et technologie
Avenue Marillac
17042 La Rochelle Cedex 1

Université libre de Bruxelles

- **Groupe de microbiologie
des milieux aquatiques**

Campus de la Plaine
CP 221
B 1050 Bruxelles

Université de Lille

- **Laboratoire de chimie
analytique et marine**

UPRES - A 8013 ELICO
Bâtiment C 8
59655 Villeneuve d'Ascq Cedex

- **Station marine de Wimereux
UPRES - A 8013 ELICO**

28, avenue Foch
BP 80
62930 Wimereux

Université Pierre et Marie Curie

- **Laboratoire d'hydrobiologie**

12, rue Cuvier
75005 Paris

- **Laboratoire CNRS -
UMR Sisyphe 7619**

4, place Jussieu, tour 26, 5^e étage
75005 Paris

- **Institut d'hydrologie
et de climatologie**

Laboratoire de chimie analytique
4, place Jussieu, boîte courrier 122
75252 Paris Cedex 5

Université de Rennes 1

- **Laboratoire de zoologie
et d'écophysiologie**

UA INRA et UMR 1853 du CNRS
Campus Beaulieu
Avenue du Général Leclerc
35042 Rennes Cedex

Université de Rouen

- **Laboratoire de morphodynamique
continentale et côtière -**

UPRES - A 6143 CNRS

- **Laboratoire de microbiologie
du froid**

- **Laboratoire de biologie végétale
et écologie**

76821 Mont-Saint-Aignan Cedex



6 ► Contaminations bactérienne et virale

Dans l'estuaire de la Seine, la qualité microbiologique des eaux est régulièrement mesurée principalement via des énumérations de bactéries indicatrices de contamination fécale, tels que les coliformes. Ces mesures montrent une qualité bactériologique médiocre. Dans le cadre du programme Seine-Aval, un effort méthodologique considérable a été accompli afin de développer des techniques de détection et d'énumération de bactéries et de virus d'intérêt sanitaire ne présentant pas certains biais des techniques de routine basées sur la mise en culture. Une méthode enzymatique, permettant l'énumération rapide des coliformes fécaux, a été développée afin d'appréhender la dynamique de ce type de bactéries. Un modèle de la dynamique des bactéries fécales dans la Seine a ainsi pu être développé. Par ailleurs, des techniques basées sur les progrès récents de la biologie moléculaire ont été développées pour rechercher divers types de bactéries et virus en Seine.

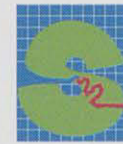
In the Seine estuary, the microbiological quality of waters is regularly measured mainly through enumeration of bacteria indicating a fecal contamination, as coliforms. These measurements indicate a low bacteriological quality. In the scope of the Seine-Aval program, a large methodological effort has been made to develop detection and enumeration techniques of bacteria and viruses of sanitary interest which do not present the biases of the classical techniques based on culturability. An enzymatic method allowing the rapid enumeration of fecal coliforms was developed to study the dynamics of this kind of bacteria in the Seine. A model of fecal bacteria dynamics in the Seine river and estuary was thus developed. Techniques based on the recent progresses of molecular biology were also developed and applied to detect and enumerate various types of fecal bacteria and viruses.

Cette collection présente l'ensemble des résultats du programme Seine-Aval. Chaque fascicule de cette collection a été élaboré de manière à pouvoir être lu indépendamment des autres.

Chaque année, l'essentiel de l'information scientifique produite est consigné dans des rapports thématiques et de synthèse pouvant être consultés auprès de la cellule de coordination du programme :

Programme Seine-Aval

Université de Rouen (Régis Hocdé)
Laboratoire de morphodynamique continentale et côtière
76821 Mont-Saint-Aignan Cedex
e-mail : regis.hocde@univ-rouen.fr
tél. 33 (0)2 35 14 65 27 - fax 33 (0)2 35 14 70 22



programme scientifique
Seine-Aval

- 1 - Seine-Aval : un estuaire et ses problèmes
- 2 - Courants, vagues et marées : les mouvements de l'eau
- 3 - Sables, chenaux, vasières : dynamique des sédiments et évolution morphologique
- 4 - Matériaux fins : le cheminement des particules en suspension
- 5 - L'oxygène : un témoin du fonctionnement microbiologique
- 6 - Contaminations bactérienne et virale**
- 7 - Patrimoine biologique et chaînes alimentaires
- 8 - La contamination métallique
- 9 - Fer et manganèse : réactivités et recyclages
- 10 - Le cadmium : comportement d'un contaminant métallique en estuaire
- 11 - La dynamique du mercure
- 12 - Les contaminants organiques qui laissent des traces : sources, transport et devenir
- 13 - Les contaminants organiques : quels risques pour le monde vivant?
- 14 - Des organismes sous stress
- 15 - Zones humides de la basse vallée de la Seine
- 16 - Les modèles : outils de connaissance et de gestion
- 17 - La résistible dégradation d'un estuaire

Région Haute-Normandie
25, boulevard Gambetta, BP 1129,
76174 Rouen Cedex, France
tél. 02 35 52 23 31 - fax 02 35 52 22 38

Agence de l'Eau Seine-Normandie
51, rue Salvador-Allende
92027 Nanterre Cedex
tél. 01 41 20 16 00 - fax 01 41 20 16 89

Éditions Ifremer
BP 70, 29280 Plouzané, France
tél. 02 98 22 40 13 - fax 02 98 22 45 86
e-mail : editions@ifremer.fr

**Diffusion : ALT Brest
Service Logistique
3, rue Édouard Belin
BP 23 29801 Brest Cedex 9
tél. 02 98 02 42 34 - fax 02 98 02 05 84**

ISBN 2-84433-028-2 Programme Seine-Aval
ISBN 2-84433-025-8
35 F - 5,34 €

