

Une nouvelle perspective pour l'analyse de la qualité de l'eau potable

A la recherche d'une méthode alternative, plus rapide

Les analyses de routine permettant de juger de la qualité des eaux de consommation font appel à la méthode de culture sur substrat nutritif solide destinée à dénombrer des bactéries. Cette méthode est cependant très demandeuse en temps. Les résultats sont au plus tôt disponibles au bout de 24 heures. Pour pallier cet inconvénient, des chercheurs de l'EAWAG tâchent de mettre au point une méthode d'analyse plus rapide. Le recours à de nouvelles techniques de biologie moléculaire semble bien prometteur, mais la mise au point finale de la méthode est loin d'être évidente.

Il y a déjà plusieurs décennies que la mesure de paramètres bactériologiques fait partie des analyses de routine effectuées pour s'assurer de la qualité de l'eau de consommation. Les méthodes employées sont basées sur la mise en évidence d'organismes indicateurs comme p. ex. l'entérobactérie *Escherichia coli* [1]. On part du principe que ces bactéries inoffensives sont libérées en même temps que d'éventuels germes pathogènes et qu'elles peuvent tout comme eux se retrouver dans l'eau de consommation. Pour mettre en évidence *E. coli*, la méthode de culture sur milieu solide, à la fois simple et peu onéreuse, est employée depuis des décennies avec succès. Elle présente cependant l'inconvénient d'être très demandeuse en temps: Il faut au mieux compter 24 heures avant d'obtenir un

résultat. Dans certaines situations, il serait pourtant fort souhaitable de savoir plus rapidement si l'eau potable distribuée répond réellement aux normes d'hygiène. Ainsi par exemple, après plusieurs jours de fortes pluies, il se pourrait que certaines eaux servant à l'approvisionnement en eau potable se trouvent mal filtrées ou contaminées par des substances fécales et se retrouvent malencontreusement dans l'eau de consommation. Dans une telle situation, il serait impératif que le fournisseur d'eau potable prenne immédiatement les mesures qui s'imposent pour décontaminer le système de distribution des eaux (désinfection, nettoyage) et qu'il informe sans délai la population sur la nécessité de faire bouillir l'eau avant de la consommer. Si le résultat des analyses n'est connu qu'au bout de

24 heures, il peut être déjà trop tard. C'est pour répondre à ce besoin de détection précoce des contaminations que des chercheurs de l'EAWAG tentent actuellement de mettre au point une méthode d'analyse plus rapide basée sur des techniques de biologie moléculaire.

La méthode de référence à *E. coli*

L'eau potable fait partie des denrées alimentaires et doit donc répondre aux critères définis par l'Ordonnance suisse sur l'hygiène [2]. Celle-ci stipule que l'analyse de qualité doit reposer sur des méthodes de référence extraites du Manuel suisse des denrées alimentaires [3]. D'autres méthodes peuvent être employées «à condition que les résultats qu'elles fournissent, comparés à ceux des méthodes de référence, conduisent de manière probante à une appréciation identique» [2]. La méthode de référence utilisée pour la mise en évidence d'*E. coli* dans l'eau potable est la méthode de culture en boîte de gélose (Fig. 1). L'Ordonnance sur l'hygiène impose pour *E. coli* la valeur de tolérance «non détectable dans 100 ml d'eau analysée». Le protocole expérimental de la méthode de référence prévoit donc de filtrer 100 ml d'eau à analyser à l'aide d'une membrane retenant *E. coli* et d'autres bac-

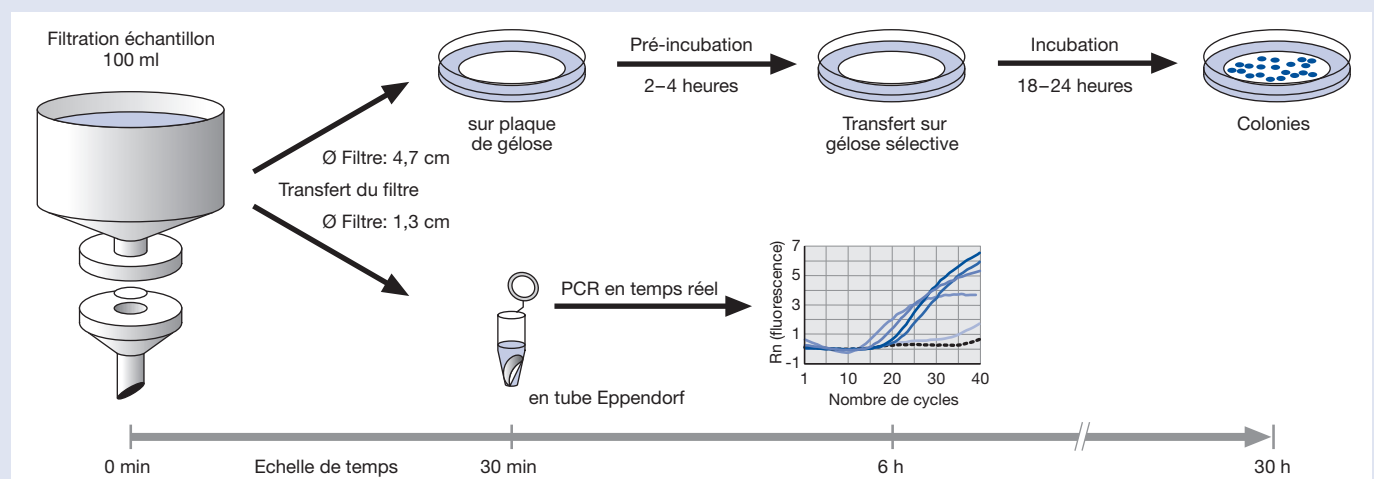


Fig. 1: Etapes et temps nécessaires pour l'analyse de la qualité microbiologique de l'eau par la méthode de culture en boîte de gélose (en haut) et la nouvelle méthode PCR alternative (en bas).

téries. Ce filtre est ensuite placé sur une boîte de Pétri emplies de milieu de culture gélatinisé sur lequel les cellules bactériennes se multiplient pour former des colonies pouvant être dénombrées. Les colonies d'*E. coli* sont identifiées à l'aide d'une réaction enzymatique qui produit une coloration bleue en leur présence (Fig. 1, en haut).

La méthode d'analyse alternative

Les techniques de biologie moléculaire offrent de nouvelles possibilités pour la mise au point de méthodes d'analyse plus rapides. Il nous a semblé prometteur de recourir à la réaction en chaîne de la polymérase (PCR, Polymerase Chain Reaction, Fig. 1 en bas). Dans cette technique, de petits fragments portant l'information génétique d'*E. coli* (ADN) sont multipliés en cycles d'amplification répétés. Les fragments synthétisés peuvent ensuite être détectés à l'aide d'un colorant fluorescent qui se fixe au sein de l'ADN bicaténaire. Dans la méthode que nous utilisons, la PCR en temps réel, la fluorescence est mesurée directement et entrée sur ordinateur. Le résultat correspond au nombre de cycles d'amplification nécessaires pour que la fluorescence atteigne le seuil de détection. En ce qui concerne l'eau à analyser, cela signifie: plus il y a de cellules d'*E. coli* (et donc d'ADN) dans l'échantillon, moins il faut de cycles d'amplification pour pouvoir détecter les fragments d'ADN synthétisés. Une étape

importante de notre protocole de PCR est le prétraitement enzymatique des échantillons avec une DNase pour éliminer tout résidu éventuel d'ADN libre provenant de cellules bactériennes mortes. Cette démarche permet d'éviter les résultats faussement positifs.

Une nette différence

Pour vérifier que les résultats de la méthode PCR développée correspondent bien à ceux obtenus avec la méthode classique de culture en boîte de gélose, de l'eau potable a été contaminée au laboratoire avec des cellules d'*E. coli* et conservée à 4 °C. Pendant un mois, des échantillons ont été régulièrement prélevés dans cette réserve et analysés par les deux méthodes. Au début de l'expérience (temps 0), les deux méthodes ont permis de mettre les bactéries en évidence (Fig. 2A + B). Avec le temps, cependant, le nombre de bactéries détectées avec la méthode classique a rapidement chuté. Nous nous attendions donc à ce que la fluorescence après PCR soit détectable au bout d'un nombre de cycles croissant avec la durée de l'expérience. Ce ne fut pas le cas. Même au bout d'un mois, la PCR permettait encore de mettre en évidence des cellules d'*E. coli* qui, apparemment, ne furent plus aptes à se développer sur milieu de culture. De telles cellules bactériennes, qui ne se développent plus en culture mais qui peuvent tout de même être détectées avec d'autres méthodes, sont qualifiées de viables mais non cultivables (VBNC, «viable but not culturable»). Dans le milieu de la microbiologie, la question est controversée de savoir s'il est important ou non de détecter les stades VBNC chez les indicateurs comme *E. coli* ou chez les bactéries pathogènes. Certains expériences indiquent que de telles bactéries peuvent «se réveiller» ou redevenir infectieuses [4], d'autres confirment le contraire [5, 6]. Concernant nos expériences, l'explication la plus plausible est que les cellules meurent peu à peu, et ce, avec une vitesse qui varie en fonction de leur «passé».

Les méthodes établies sont difficiles à remplacer

Cette expérience simple montre bien que les deux méthodes ne livrent pas les mêmes conclusions et donc que la méthode PCR ne constitue pas une alternative acceptable pour la méthode de culture sur milieu solide. Les principes sur lesquels les deux méthodes sont basées, la capacité de multiplication d'une part et la mise en évidence de fragments d'ADN spécifiques d'autre part, sont probablement trop différents pour livrer

des résultats similaires. On voit combien la définition des valeurs de tolérance bactériologiques dépend de la méthode d'analyse employée.

Dans la littérature, certains auteurs proposent de faire précéder la PCR d'une courte période de culture de quelques heures. Ceci permet d'obtenir une meilleure concordance avec les résultats de la méthode de référence [7]. On se trouve actuellement dans un climat de discussion accompagné d'efforts de normalisation visant l'établissement de standards pour la validation de méthodes d'analyse alternatives [8]. Considérée isolément, la méthode de PCR décrite ici pourrait s'établir comme une méthode «nouvelle». Mais il faudrait pour cela définir exactement dans quel stade physiologique les cellules d'*E. coli* doivent être détectées. Il nous semble tout de même que le champ d'application de notre méthode se trouve plutôt au niveau de la recherche qu'à celui des analyses de routine de la qualité de l'eau de consommation.

Remerciements

Nous tenons à remercier l'Institut Bachema de Schlieren pour avoir initié et financé ce projet de recherche!



Annette Rust a mis au point la méthode présentée dans le cadre d'une thèse de doctorat effectuée à la division «Microbiologie de l'environnement et ecotoxicologie moléculaire» de l'EAWAG.

Coauteur: Wolfgang Köster

- [1] Köster W., Egli T., Rust A. (2002) Des agents pathogènes dans l'eau (potable)? EAWAG news 53, 26-28.
- [2] Ordonnance du DFI du 26 juin 1995 sur les exigences d'ordre hygiénique et microbiologique concernant les denrées alimentaires, les objets usuels, les locaux, les installations et le personnel (Ordonnance sur l'hygiène, OHyg), numéro RS 817.051, p. 1-16.
- [3] Ettl W. (ed.) (2000): Chapitre 54, Microbiologie. Dans: Le Manuel suisse des denrées alimentaires, L'Office fédéral de la santé publique, Berne.
- [4] Colwell R.R. (2000): Viable but nonculturable bacteria: a survival strategy. *Journal of Infection and Chemotherapy* 6, 121-125.
- [5] Smith R.J., Newton A.T., Harwood C.R., Barer M.R. (2002): Active but nonculturable cells of *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium* do not infect or colonize mice. *Microbiology* 148, 2727-2726.
- [6] Bogosian G., Bourneuf E.V. (2001): A matter of bacterial life and death. *EMBO reports* 21, 770-774.
- [7] Frahm E., Obst U. (2003): Application of the fluorogenic probe technique (TaqMan PCR) to the detection of *Enterococcus* spp. and *Escherichia coli* in water samples. *Journal of Microbiological Methods* 52, 123-131.
- [8] Hübner P., Gautsch S., Jemmi T. (2002): In house-Validierung mikrobiologischer Prüfverfahren. *Mitteilungen aus Lebensmitteluntersuchung und Hygiene* 93, 118-139.

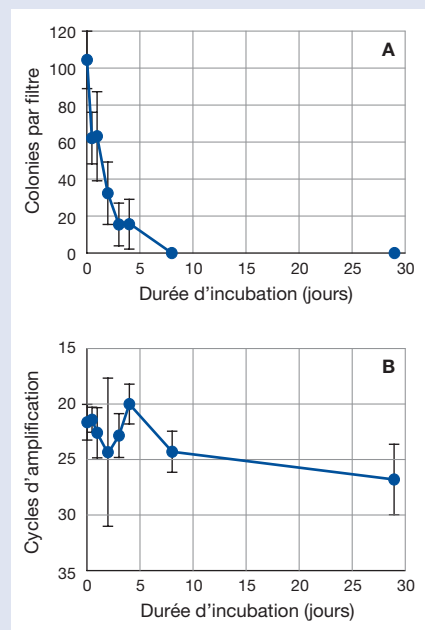


Fig. 2: Résultats de la mise en évidence d'*E. coli* par la méthode de culture en boîte de gélose (A) et par la méthode PCR (B) dans une eau sciemment contaminée. Contrôles effectués sur des échantillons témoins d'eau non contaminée; Méthode de culture: = 0 colonies, méthode PCR: seuil de détection non atteint au bout de 40 cycles d'amplification.