



Université Mohamed Khider de Biskra

Faculté des sciences exactes et des sciences de la nature et de la vie

Département des sciences de la nature et de la vie

MÉMOIRE DE MASTER

Domaine : Sciences de la nature et de la vie

Filière : Sciences biologiques

Spécialité : Microbiologie Appliquée

Référence / 2024

Présenté et soutenu par :

Djihad CHERGUI/Selsabil CHENAFI

Le : 11/06/2024

Synthèse : Etude comparative des techniques récentes pour la détection des coliformes fécaux dans l'eau potable

Jury :

M. ZEROUAL Samir	MCA	Président
Mme. MOHAMMEDI Kenza	MCD	Rapporteur
Mme. GHITI Hassina	MCD	Examineur

Année universitaire : 2023-2024

Remerciements

Avant tous nous remercions *ALLAH* le tout puissant de m'avoir donné suffisamment de courage et surtout de patience pour réaliser ce modeste travail.

Nous adressons notre remerciement chaleureux à notre encadrante madame : **Mohammedi Kenza** pour sa patience, sa disponibilité, ses conseils, ses orientations, ses efforts et ses encouragements pendant la réalisation de ce mémoire

Nous remercions également les membres de jury pour avoir évalué notre travail, pour leurs questions et remarques lors de la soutenance.

Nos derniers remerciements vont à tous ceux qui ont contribué de près ou de loin pour réaliser ce travail.

Dédicace

Je dédie ce modeste travail :

A ceux qui me sont proches et chers

A la femme la plus forte et la plus courageuse ce qui était la mère et le père au même temps. Mon modèle et mon héroïne, ma chère maman **AKILA**, merci de m'avoir montré le chemin à suivre. Ce mémoire est la preuve que tes sacrifices n'ont pas été vains. Je t'aime plus que les mots ne peuvent le dire.

A la mémoire de mon cher père **DJAMEL** qui m'a quitté trop tôt. Ce mémoire est un
Hommage à son souvenir et à l'amour qu'il nous a porté.

A mes chères sœurs **SALSABIL** et **MERIEM** merci pour vos encouragements et soutiens.

A mon frère unique **MILOUD**.

A ma belle nièce **TANZIL** et à mon neveu **FATEH**.

A mes chères amies **ZHOUR**, **KHADIDJA**, **AHLEM**, **SOUHIR**, **KAMILIA** et **AICHA**.

Et à mes élèves héroïques.

DJIHAD

Dédicace

C'est avec l'aide et la grâce du *DIEU* que j'ai achevé ce modeste travail que je dédie :

A ma très chère mère Amina

Tu représentes pour moi le symbole de la bonté par excellence, la source de tendresse et l'exemple du dévouement qui n'a pas cessé de m'encourager et de prier pour moi. Aucune dédicace ne saurait être assez éloquente pour exprimer ce que tu mérites pour tous les sacrifices que tu n'as cessé de me donner depuis ma naissance jusqu'à aujourd'hui.

A mon très cher père Miloud

Aucune dédicace ne saurait exprimer l'amour, l'estime, et le respect que j'ai toujours eu pour toi. Je tiens à vous remercier pour les efforts que vous avez déployés à mon égard tout au long de mon éducation et pour vos précieux conseils. Tu es un père formidable pour moi.

A mes deux sœurs Nassima et Hadjer

Merci pour tous vos encouragements et votre soutien tout au long de cette période importante.

À mon fiancé Mohammed

Je ne trouve pas de mots de remerciement et de gratitude pour vos encouragements, vos sacrifices, vos paroles et votre soutien pendant cette période. Je vous souhaite tout le meilleur, la santé et les moyens de subsistance.

A ma meilleure amie Messouda

Vous êtes une bénédiction, une sœur et un symbole d'amitié et de fidélité. Je vous remercie et prie toujours pour vous pour votre soutien, vos précieux conseils et vos encouragements en cas d'échec. Que Dieu vous bénisse plusieurs fois pour ce que vous m'avez donné.

Selsabil

Table des matières

Remerciements	
Dédicace	
Liste des tableaux	I
Liste des figures	II
Liste des abréviations	III
Introduction	1

Partie 1 :synthèse bibliographique

Chapitre 1 :généralités sur l'eau potable

1.1	L'eau potable	3
1.2	Origine de l'eau potable	3
1.3	Les Critères de potabilité de l'eau	3
1.3.1	Les paramètres organoleptiques	3
1.3.1.1	La couleur	3
1.3.1.2	L'odeur.....	4
1.3.1.3	Le goût et la saveur	4
1.3.1.4	La turbidité.....	4
1.3.2	Les paramètres physicochimiques.....	4
1.3.2.1	La température	4
1.3.2.2	Le potentiel hydrogène pH.....	5
1.3.2.3	La conductivité électrique.....	5
1.4	Les normes de l'OMS et les normes algériennes sur l'eau potable.....	5

Chapitre 2 : les coliformes fécaux

2.1. Les coliformes	7
2.1.1. Les coliformes totaux	7
2.1.2. Les coliformes fécaux :	7
2.1.2.1. <i>Escherichia coli</i>	8
2.1.2.2. <i>Klebsiella</i>	9
2.1.2.3. <i>Citrobacter</i>	10
2.2. Qu'est-ce qu'un indicateur fécal et pourquoi en a-t-on besoin ?.....	11
2.3. Techniques pour la détection de contamination fécale dans l'eau	11
2.3.1. Techniques conventionnelles (classiques).....	11
2.3.1.1. La technique de fermentation en tube multiple.....	12
2.3.1.2. Technique de filtration membranaire	12
2.3.2. Limites des techniques conventionnelles de détection.....	12
2.3.3. Techniques récentes	13

Partie 2 :partie de synthèse sur les traveaux scientifiques choisis

Chapitre 3 : la méthodologie suivie dans les traveaux choisis

3.1. Problématique et objectif de l'étude	14
3.2. Les méthodes enzymatiques	14
3.2.1. Dip test	14
3.2.1.1. Définition	14
3.2.1.2. Principe	14
3.2.1.3. Matériel	16
3.2.1.4. Méthode	16
3.2.2. β -D-Glucuronidase	17
3.2.2.1. Définition	17
3.2.2.2. Principe	17

3.2.2.3.	Matériel	18
3.2.2.4.	Méthode	19
3.3.	Les méthodes moléculaires.....	19
3.3.1.	La PCR en temps réel ou la q-PCR (Quantitative Polymerase Chain Reaction)	19
3.3.1.1.	Définition	19
3.3.1.2.	Principe	19
3.3.1.3.	Matériel	20
3.3.1.4.	Méthode	20
3.3.2.	Amplification Isotherme à Boucles (LAMP).....	20
3.3.2.1.	Définition	20
3.3.2.2.	Principe	21
3.3.2.3.	Matériel	21
3.3.2.4.	Méthode	22
3.4.	Des technologies de suivi sur site.....	24
3.4.1.	ColiSence	24
3.4.1.1.	Définition	24
3.4.1.2.	Principe	25
3.4.1.3.	Matériel	25
3.4.1.4.	Méthode	26
3.4.2.	TECTA TM B16	26
3.4.2.1.	Définition	26
3.4.2.2.	Principe	27
3.4.2.3.	Méthode	27

Chapitre 4 : les résultats des travaux choisis

4.1.	Les avantages et les inconvénients	28
------	--	----

4.1.1.	Dip test	28
4.1.2.	β -D-Glucuronidase	29
4.1.3.	La technique de LAMP	30
4.1.4.	PCR en temps réel	31
4.1.5.	La nouvelle technologie de suivi sur site Colisence.....	31
4.1.6.	La nouvelle technologie de suivi sur site TECTA™ B16.....	32
4.2.	Discussion.....	32
4.2.1.	Critères de validation clés	32
	Conclusion.....	37
	Références bibliographiques	38
	Annexes	
	Résumé	

Liste des tableaux

Tableau 1. Normes d'eau potable selon l'Algérie et selon l'OMS	6
Tableau 2. Le matériel utilisé pour la réalisation de test Dip test	16
Tableau 3. Le matériel utilisé pour B-D-Glucuronidase	18
Tableau 4. Le matériel utilisé pour le PCR en temps réel.....	20
Tableau 5. Le matériel utilisé pour la réalisation de LAMP	21
Tableau 6. Le matériel utilisé pour la réalisation de la nouvelle technologie de suivi sur site Colisence	25
Tableau 7. Les avantages et les inconvénients du technique enzymatique Dip test	28
Tableau 8. Les avantages et les inconvénients de technique enzymatique B-D-Glucuronidase	29
Tableau 9. Les avantages et les inconvénients de technique moléculaire LAMP	30
Tableau 10. Les avantages et les inconvénients de technique moléculaire PCR en temps réel	31
Tableau 11. Les avantages et les inconvénients de la nouvelle technologie de suivi sur site Colisence	31
Tableau 12. Les avantages et les inconvénients de la nouvelle technologie de suivi sur site TECTA TM B16	32

Liste des figures

Figure 1. Coliformes totaux, coliformes thermotolérants et <i>E.Coli</i>	7
Figure 2. La cellule d' <i>E.Coli</i>	9
Figure 3. Coloration de Gram des crachats montrant la capsule proéminente de <i>k.pneumonies</i> et plaque de gélose au sang montrant des colonies mucouides typiques de <i>k.pneumonia</i>	10
Figure 4. Coloration de Gram présenté les <i>Citrobacter</i>	11
Figure 5. Schéma de dispositif	15
Figure 6. Représentation de l'utilisation de Dip test.....	17
Figure 7. Vue éclatée des composants de l'appareil	22
Figure 8. Les premières étapes de l'amplification LAMP	23
Figure 9. Principe de la technique Colisence.	25
Figure 10. TECTA™ B16	27

Liste des abréviations

- ADN : Acide désoxyribonucléique
- ATP : Adénosine Triphosphate
- BIP : Backward Inner Primer
- *Bst* : *Bacillus Stearothermophilus*
- B-PER : Bactériale Protein Extraction
- CF : Coliformes fécaux
- 6-CMU : 6-Chloro-4-Méthyl- Umbelliférole
- 6-CMUG : 6-Chloro-4-Méthyl-Umbelliferyl- β -D-Glucuronide
- CT : Coliformes totaux
- CTT : Coliformes thermotolérants
- DMF : N, N-Diméthylformamide
- DMSO : Diméthylsulfoxyde.
- DTT : Dithiothréitol
- *E. Coli* : *Escherichia coli*
- *E.faecalis* : *Enterococcus faecalis*
- FIP : Forward Inner Primer
- GUS : β -D-Glucuronidase
- GLUC : β -D-glucuronidase
- IBDG : l'indoxyl-b-D-glucuronide
- IMViC : Indole, Methylred, Voges-Proskauer and Citrate
- ISO : International Organization for Standardization
- LAMP : Loop mediated isothermal amplification
- LPB : Loop Primer Backward
- LPF : Loop Primer Forward
- LTB : Un bouillon de lauryltryptose
- MF : Filtration membranaire
- MTF : fermentation en tube multiple
- MUGal : 4-méthylumbelliferyl-b-D-galactopyranoside
- MUGlu : 4 méthylumbelliferyl-b-D-glucuronide

- NPP : nombre le plus probable
- OMS : Organisation mondiale de la santé
- ONPG : O-nitrophényl-b-D-galactopyranoside
- PCR : Réaction en chaîne par polymérase
- PNPG : p-nitrophényl-b-D-galactopyranoside
- q-PCR : Quantitative Polymerase Chain Reaction
- Red-Gal : 6-chloro-3-indolyl- β -D-galactoside
- SFM : spectrofluorimètre
- *S.enterica* : *Salmonella enterica*
- TTC : Tergitol-Triphényl Tetrazolium Chloride Tergitol
- UFC : Unité formatrice de colonie
- VBNC : Bactéries viables mais non-cultivables

Introduction

Introduction

L'eau est un élément indispensable à la vie des êtres vivants, l'accès à une eau de boisson saine est une condition principale à la santé, un droit de l'homme essentiel et une composante clé des politiques efficaces de protection sanitaire (OMS, 2017).

La consommation d'une eau potable est un facteur déterminant dans la prévention des maladies liées à l'eau, doit bénéficier d'une attention particulière. Cette eau destinée à la consommation humaine ne doit contenir ni substances chimiques dangereuses, ni germes nocifs pour la santé (Ouahchia, 2015). L'OMS estime que plus de 1,4 milliards d'hommes n'ont pas accès à une eau potable de qualité et que les gastroentérites d'origine hydrique sont une cause importante de mortalité, étant responsables à elles seules d'environ 5 millions de décès par année (Ashbolt N. J, 2004). Et comme la surveillance systématique de tous les types de microorganismes pathogènes potentiellement retrouvés dans l'eau est difficile, laborieuse et très dispendieuse (Straub T. M et Chandler D.P, 2003). En outre, la contamination bactérienne en milieu hydrique est un phénomène naturel où l'homme joue le rôle de contaminateur primaire, mais aussi de récepteur secondaire des bactéries présentes dans le milieu, Louis Pasteur avait coutume de dire que « nous buvons 90% de nos maladies ». Alors les risques microbiens les plus importants sont liés à l'ingestion d'eau contaminée par des fèces humaines ou animales (Hounsou M.B et al., 2010). La surveillance routinière et le contrôle de la qualité microbiologique de l'eau potable orientée vers la détection spécifique des microorganismes ubiquitaires de la flore intestinale animale (les coliformes fécaux CF) Ces microorganismes sont connus sous le nom d'indicateurs de contamination fécale (Payment P et al., 1997).

Et comme les méthodes de détection conventionnelles présentent cependant de nombreuses faiblesses et limites (Payment P et al., 1997). Notamment la longue durée entre l'échantillonnage et l'obtention des résultats, durant lequel de nombreuses personnes courent le risque d'ingérer l'agent pathogène.

Les méthodes de détermination de la qualité microbiologique de l'eau potable peuvent encore être améliorées sur plusieurs points afin d'arriver à mieux garantir l'innocuité de celle-ci pour la consommation. En comparaison aux méthodes classiques, des méthodes récentes sont mises en place permettant une détection plus rapide des coliformes fécaux. (Rompré A et al., 2002) C'est dans ce contexte que s'inscrit cette étude qui a pour but de comparer ces méthodes entre

eux pour valider lesquels sont les plus efficaces et plus performants afin de guider les chercheurs de choisir la technique la plus appropriée.

Ce travail a comporté deux parties, la première partie bibliographique avec deux chapitres où le premier présente des généralités sur l'eau potable et sa contamination par les coliformes fécaux qui peut indiquer la présence possible de pathogènes responsables de maladies et le deuxième chapitre présente les différentes techniques conventionnelles, ses limites et le développement des techniques de détection des coliformes fécaux pendant le temps .

Dans la deuxième partie nous avons analysées différents études présentant des techniques récentes utilisées pour la détection des coliformes fécaux dans l'eau potable : des techniques enzymatiques, moléculaires et des nouvelles technologies de suivi sur site .La comparaison de ces techniques entre eux est indispensable pour le but de guider les chercheurs dans leurs travaux de prendre le bon choix selon leurs objectifs de recherche.

Partie 1 :

Synthèse bibliographique

Chapitre 1 :

Généralités sur l'eau potable

1.1 L'eau potable

Selon Rejseck (2002) on entend par eau potable, l'eau naturelle ou traitée liée directement à l'alimentation humaine soit à la consommation ou à la cuisson d'aliments et la préparation de mets et au nettoyage d'objets entrant en contact avec les denrées alimentaires (Rejseck , 2002).

Une eau naturelle est dite potable si elle présente les qualités suivantes :

- Fraîcheur et limpidité.
- Absence d'odeur et de couleur.
- Goût agréable.
- Suffisamment douce, aérée.
- Minéralisation raisonnable.
- Absence de matières organiques et des germes pathogènes (Degremont, 2005).

1.2 Origine de l'eau potable

L'eau peut être classée en deux types : les eaux souterraines et les eaux de surface, ces dernières peuvent se trouver en stocks naturels (lacs) ou artificiels (barrages). Les propriétés chimiques de ces eaux dépendent de la nature des terrains traversés par l'eau durant son parcours. 62 % de l'eau du robinet provient des eaux souterraines (nappes superficielles et profondes), les 38 % restants proviennent des eaux superficielles (torrents, rivières, lacs).

L'eau est prélevée par captage dans un forage ou un puits. Le sol servant de filtre naturel permet d'assurer une bonne qualité de l'eau. Mais un traitement s'impose pour offrir une eau potable, totalement débarrassée de ses impuretés. Elle transite dans une usine de la décontaminer après elle rejoint des réservoirs de stockage ou des châteaux d'eau, à l'aide de canalisations souterraines (Copin-Montégut, 1996).

1.3 Les Critères de potabilité de l'eau

1.3.1 Les paramètres organoleptiques

Ils concernent la couleur, le goût et l'odeur de l'eau. L'eau doit être agréable à boire, claire et sans odeur. Ces paramètres étant liés au confort de consommation, ils n'ont pas de valeur sanitaire directe.

1.3.1.1 La couleur

La coloration d'une eau est dite vraie ou réelle lorsqu'elle est due aux seules substances en solution. Elle est dite apparente quand les substances en suspension y ajoutent leur propre

coloration. Les couleurs réelles et apparentes sont approximativement identiques dans l'eau claire et les eaux de faible turbidité (Rodier, 2005). Elle représentera un indicateur de pollution si elle dépasse l'équivalent de 15 mg/l platine cobalt (Lefèvre, 1991). Une eau colorée n'est pas agréable pour les usages domestiques et en particulier pour la boisson, car elle provoque toujours un doute sur sa potabilité (Bouziani, 2000). Sa couleur se mesure en comparant l'échantillon à examiner avec des tubes témoin dont la coloration est obtenue à partir d'une solution composée de chlorure platicopotassique et cobalteux dissout dans l'acide chlorhydrique (Dupont, 1986).

1.3.1.2 L'odeur

C'est l'ensemble des sensations perçues par l'organe olfactif en flairant certaines substances volatiles (Rodier, 2005). En effet, toute odeur est un signe de pollution ou de la présence de matières organiques en décomposition telle que les esters, les alcools, les nitrites les dérivés aromatiques et des composés plus ou moins bien identifiés résultant de matières animales ou végétales (comme les algues) ou peuvent être inorganiques comme le chlore, le bioxyde de soufre SO_2 ou le sulfite d'hydrogène H_2S . (Chelli et Djouhri, 2013)

1.3.1.3 Le goût et la saveur

Le goût est l'ensemble des sensations gustatives (Rodier, 2005). L'eau potable ne devrait pas avoir un goût. Les principaux corps pouvant donner à l'eau une saveur désagréable sont : Le Fer et le manganèse, le chlore actif, le phénol et le chlorophénol (Dupont, 1986).

1.3.1.4 La turbidité

C'est la réduction de la transparence de l'eau due à la présence de matière non dissoute. La turbidité se mesure en unité néphélogrammétrique (Lanteigne, 2003). La mesure de la turbidité permet de préciser les informations visuelles sur l'eau (Gerard, 2004). La turbidité élevée de l'eau relève de la précipitation du Fer, de l'aluminium ou du manganèse due à une oxydation dans le réseau (Jean, 2002).

1.3.2 Les paramètres physicochimiques

1.3.2.1 La température

Il est très important de connaître la température de l'eau avec une bonne précision. En effet celle-ci joue un rôle dans la solubilité des sels et surtout des gaz, dans la dissociation des sels dissous donc sur la conductivité électrique et dans la détermination du pH d'une façon générale. La température des eaux superficielles est influencée par leur origine et par la température de l'air (Dupont, 1981).

1.3.2.2 Le potentiel hydrogène pH

Le potentiel hydrogène plus connu sous le nom du pH est la valeur qui détermine si une substance est acide, neutre ou base. Il est calculé à partir du nombre d'ions d'hydrogène présents. Le pH d'une solution aqueuse varie de 0 à 14, un pH de 7 signifie que la solution est neutre. Un pH inférieur à 7 indique que la solution est acide, un pH supérieur à 7 indique que la solution est basique. Une solution est neutre lorsqu'il y'a autant de H_3O^+ que de OH^- . (Dégrément, 1952).

1.3.2.3 La conductivité électrique

L'eau pure est peu conductrice du courant électrique car elle ne contient que très peu les particules chargées électriquement (ions), susceptible de se déplacer dans un champ électrique, l'unité de la conductivité est le micro-siemens par centimètre ($\mu S/cm$). La conductivité traduit la minéralisation globale de l'eau. Sa valeur varie en fonction de la température. La conductivité est liée à la présence d'ions en solution. Elle augmente avec la température et la concentration en sels dissous (Dupont, 1981).

1.4 Les normes de l'OMS et les normes algériennes sur l'eau potable

Généralement, dans chaque paramètre de potabilité, on cherche sa présence et l'on détermine sa quantité dans l'eau. La norme pour un paramètre dans l'eau est représentée par une valeur, qui fixe une limite supérieure à ne pas dépasser et une limite inférieure à respecter. Ce paramètre dépasse la concentration limite où il y a absence de conformité par rapport aux normes établie. Dans ce titre, l'OMS dans ses recommandations ne fixe pas des normes strictes, mais plutôt des valeurs guides qui sont susceptibles d'être utilisées avec une certaine agilité, dans le souci constant de protection de la santé de la population, tout en permet de porter un jugement comparatif sur la qualité de l'eau (Guerzou, 2008). Concernant les qualités sensibles de l'eau (la couleur, le goût, l'odeur, la transparence) ces critères n'ont pas de valeur sanitaire directe car une eau peut être trouble, colorée, sentir le chlore et être sûrement consommable d'un point de vue sanitaire.

Tableau 1. Normes d'eau potable selon l'Algérie et selon l'OMS. (OMS 2006 et JORA 2014)

Paramètre	Unité	Norme algérienne	Norme de l'OMS
pH	/	6.5-8.5	6.5-9.2
Température	C	25	/
Conductivité	µs/cm	2800	/
Résidus sec à 180c	mg/l	2000	1500
Turbidité	NTU	/	5
Dureté total (TH)	mg/l	2	500
Calcium	mg/l	500	/
Magnésium	mg/l	150	150
Sodium	mg/l	200	/

Chapitre 2 :

Les coliformes fécaux

2.1. Les coliformes

2.1.1. Les coliformes totaux

Selon Desjardins (1997) le groupe des coliformes totaux (CT) comprend toutes les bactéries aérobies et anaérobies facultatives gram négatives, non sporulées, cytochrome oxydase négative en forme de bâtonnets, possédant l'enzyme β galactosidase permettant l'hydrolyse du lactose en moins 48 h à 35 °C afin de produire des colonies rouges avec reflet métallique sur un milieu gélosé approprié et dégagement de gaz. Ce sont des indicateurs de la qualité microbienne de l'eau parce qu'ils peuvent être indirectement associés à une pollution d'origine fécale (INSPQ, 2003) mais La presque totalité des espèces sont non pathogènes et ne représentent pas de risque direct pour la santé (Edberg et al., 2000).

2.1.2. Les coliformes fécaux :

Appelée aussi les coliformes thermo tolérants (CTT), ce sont un sous-groupe des coliformes totaux (CT) capables de fermenter le lactose à une température de 44,5°C, l'espèce la plus fréquemment associée à ce groupe bactérien est *Escherichia coli* (*E.Coli*) et dans une moindre mesure, certaines espèces des genres *Citrobacter*, *Enterobacter* et *Klebsiella*. La bactérie *E. Coli* représente toutefois 80 à 90 % des coliformes thermo tolérants détectés (Edberg et al., 2000). L'intérêt de la détection de ces coliformes, à titre d'organismes indicateurs, réside dans le fait que leur survie dans l'environnement est généralement équivalente à celle des bactéries pathogènes et que leur densité est généralement proportionnelle au degré de pollution produite par les matières fécales (CEAEQ, 2000).

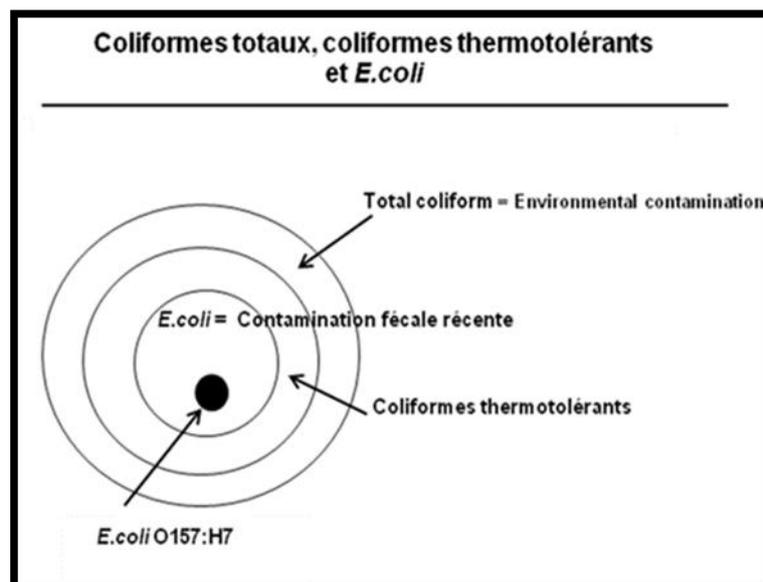


Figure1. Coliformes totaux, coliformes thermotolérants et *E.Coli*. (Site web1)

2.1.2.1. *Escherichia coli*

Communément appelée (*E.Coli*) est une bactérie membre de la famille des *Enterobacteriaceae* existant sous la forme d'un bâtonnet d'environ 2µm de long. Anaérobie facultative, Gram négative, qui loge généralement dans le gros intestin, chez l'homme et les animaux à sang chaud. , où elle permet notamment la production des vitamines K1 et K2, et empêche que des bactéries pathogènes ne s'y installent (Odonkoret Ampofo, 2013). Elle a été isolée la première fois en 1885 par Theodore *Escherichia* dans les selles de nouveaux nés, Il s'est alors aperçu qu'au bout de quelques semaines après la naissance, cette bactérie capable de faire coaguler le lait était la plus présente dans leur côlon (Cabral, 2010). Sa température de croissance optimale est de 37°C. Son temps de survie dans l'environnement est estimé entre 4 et 12 semaines, en présence d'une microflore modérée et à une température de 15 à 18°C (Edberg et al., 2000).

La concentration moyenne d'*E.Coli* dans les selles humaines oscille entre 10^{7,5} et 10^{7,7} UFC/g de selles (Cabral, 2010) les UFC étant les Unités Formant Colonies. La plupart des souches d'*E.Coli* sont inoffensives pour l'Homme, mais certaines, comme la souche O157:H7 découverte en 1982, sont pathogènes pour les humains. Plusieurs symptômes y sont associés, allant du porteur sain jusqu'au syndrome hémolytique ou la mort (Mead et Griffin, 1998).

E.Coli est encore aujourd'hui considérée comme le meilleur indicateur de contamination fécale par de nombreux chercheurs et organismes. Ainsi, les critères de classification des eaux récréatives aux États-Unis sont basés sur des concentrations en *E.Coli*, et ce depuis 1986, car il a été prouvé qu'elle permettait une meilleure prédiction du risque de maladies gastro-intestinales d'origine hydrique que les coliformes fécaux (Francy et Metzker, 1993 ; Wade et al., 2006).

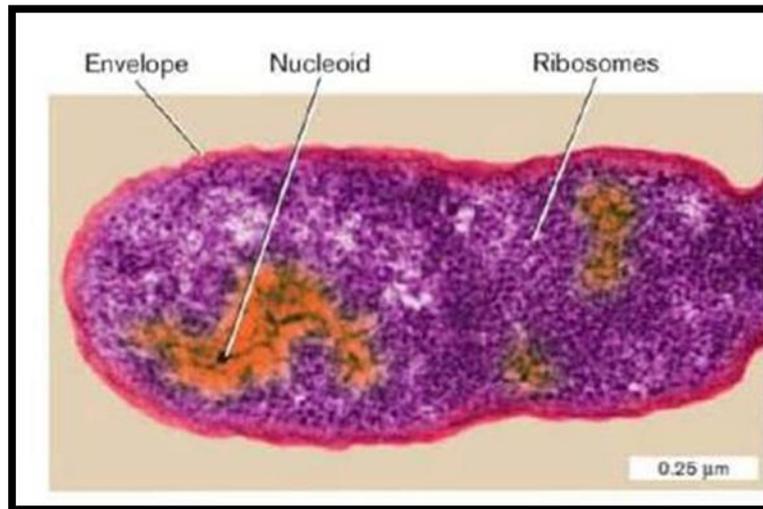


Figure 2. La cellule d'*E.Coli*. (Rosni et al., 2018)

2.1.2.2. Klebsiella

Est une bactérie membre de la famille des *Enterobacteriaceae*. Il doit son nom au microbiologiste allemand de la fin du XIXe siècle, Edwin Klebs, mais le bacille de *Klebsiella* a été pendant de nombreuses années appelé bacille de Friedlander après avoir été décrit par Carl Friedlander (Brenner et al., 1977) sont des bacilles non mobiles, à Gram négatif, mesurant généralement 0,3 à 1,5 μm de large sur 0,5 à 5,0 μm de long. Les extrémités des tiges sont arrondies ou légèrement pointues, avec des côtés parallèles ou bombés, et peuvent être trouvées seules, par paires ou en chaînes courtes, jointes bout à bout. In *vivo*, des formes diplobacillaires, très proches des pneumocoques, sont fréquemment observées (Wilson et Miles, 1975).

Klebsiella, comme les autres membres des *Enterobacteriaceae*, n'a pas d'exigences de croissance particulières et se développe donc bien sur un milieu de laboratoire ordinaire. Les espèces sont aérobies mais facultativement anaérobies. La température optimale pour la croissance est de 35° à 37° C et le pH optimal d'environ 7,2. Sur la gélose au sang et d'autres milieux de culture de routine, *Klebsiella* produit de grandes colonies mucoïdes luisantes, convexes, lisses et entières blanc grisâtre (Figure 3). Cet aspect est dû à la présence importante d'une capsule de polysaccharide qui, lorsqu'elle est très prononcée, peut être mise en évidence même sur des colorations de Gram de matériel clinique. Les cultures en bouillon sont uniformément troubles, avec un anneau ou un film épais. (Buchanan et Gibbons, 1974).

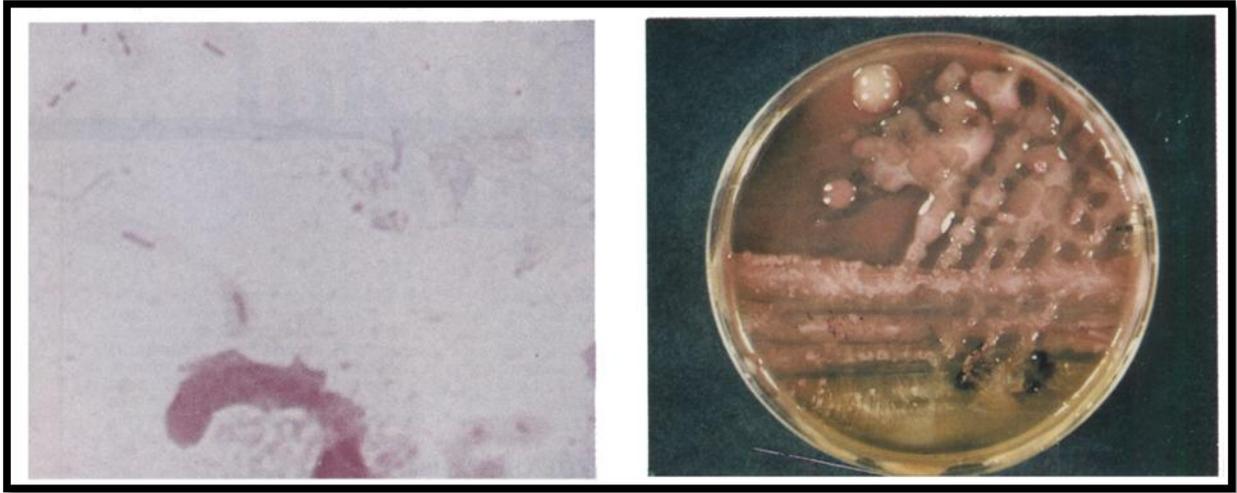


Figure 3. Coloration de Gram des crachats montrant la capsule proéminente de *k.pneumonies* et plaque de gélose au sang montrant des colonies mucouides typiques de *k.pneumonia* (Buchanan et Gibbons, 1974).

2.1.2.3. Citrobacter

Est une bactérie membre de la famille des *Enterobacteriaceae* sous la forme d'une tige droite. Se produit seul et en paires. Gram négatif. Anaérobie facultative, ayant un métabolisme à la fois respiratoire et fermentaire. Généralement non encapsulé, cultivez facilement sur des supports ordinaires. Les colonies sur gélose nutritive mesurent généralement 2 à 4 mm de diamètre, sont lisses, peu convexes, humides, translucides ou opaques et grises avec une surface brillante et un bord entier. Des formes mucoïdes ou rugueuses peuvent survenir occasionnellement. Oxydase négative. Catalase positive. Chimioorganotrophique. Le citrate peut être utilisé comme seule source de carbone par la plupart des variétés. La lysine n'est pas décarboxylée. L'alginate et le pectate ne sont pas décomposés. Le D-glucose est fermenté avec production d'acide et de gaz. Le test au rouge de méthyle est positif ; le test Voges-Proskauer est négatif. Se trouvent dans les excréments des humains et de certains animaux ; habitants intestinaux probablement normaux. Parfois pathogène et souvent isolé d'échantillons cliniques comme pathogènes opportunistes. Peut également être trouvé dans le sol, l'eau, les eaux usées et les aliments. (Werkman et Gillen, 1932).

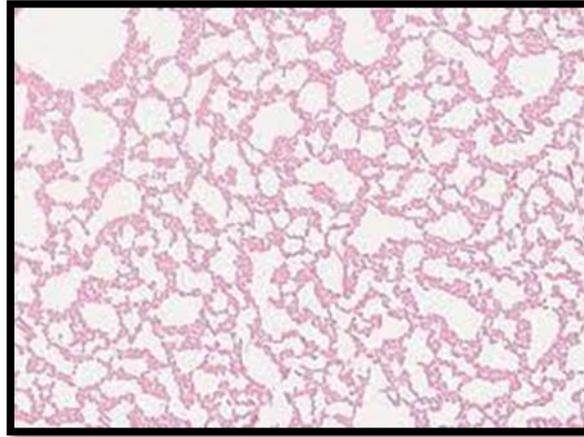


Figure 4. Coloration de Gram présenté les *Citrobacter* (site web2)

2.2. Qu'est-ce qu'un indicateur fécal et pourquoi en a-t-on besoin ?

La contamination d'eau potable par des matières fécales est l'origine principale des maladies hydriques. Le principal risque sanitaire est alors l'ingestion d'eau contaminée par des fèces et contenant des microorganismes pathogènes (Bain et al., 2014). Les méthodes pour déterminer la qualité microbiologique de l'eau sont donc principalement orientées vers la détection de ce type de pollution biologique. Il est impossible de chercher tous les microorganismes pathogènes aquatiques dans chaque échantillon d'eau, cela représenterait un investissement trop grand d'efforts, de temps et d'argent (Elliot et Colwell, 1985). Pour remédier à cela, des organismes indicateurs ont été définis, notamment pour détecter la présence de contamination fécale (Wu et al., 2011).

2.3. Techniques pour la détection de contamination fécale dans l'eau

2.3.1. Techniques conventionnelles (classiques)

Les analyses microbiologiques d'eaux ont depuis longtemps été basées sur des méthodes de culture, dans un bouillon (liquide) ou sur une gélose (solide), dans des conditions d'incubation optimales. Pour ce faire, le même schéma est en général suivi : (1) concentration de l'échantillon (filtration sur membrane, centrifugation, enrichissement), (2) isolation de la bactérie cible des autres microorganismes (culture sur milieu sélectif, méthodes immunologiques de détection), et parfois (3) confirmation (tests biochimiques, observations au microscope). Il faut au moins 18h pour obtenir les résultats des méthodes de culture, le temps pour les bactéries de croître et former des colonies. Les résultats obtenus sont en nombre de bactéries par volume d'échantillon analysé en général Unités Formant Colonies (UFC/100mL). Cette unité permet d'estimer le nombre de microorganismes présents dans un échantillon grâce au décompte des colonies présentes sur un milieu de culture solide après

incubation. Les méthodes diffèrent selon le niveau de contamination de l'échantillon afin de maintenir de bonnes sensibilités et sélectivité. Ces approches bien établies comprennent la technique de fermentation en tubes multiples (MTF), la filtration sur membrane (MF) et les méthodes de placage, telles que les techniques de plaque d'étalement et de plaque de coulée (Maheux et al., 2014).

2.3.1.1. La technique de fermentation en tube multiple

La technique MTF aussi reconnue comme méthode du nombre le plus probable (NPP) c'est une méthode de dénombrement semi-quantitatif des coliformes dans l'eau potable utilisant une approche statistique pour estimer le nombre de coliformes les plus probables, basant sur la capacité des bactéries coliformes à fermenter le lactose et à produire de l'acide et des gaz dans des délais spécifiés, cette technique est applicable à un large spectre d'échantillons, rapide, facile et rentable. (Rompré et al., 2002).

2.3.1.2. Technique de filtration membranaire

La méthode MF représente une méthode standard largement utilisée et acceptée pour détecter et quantifier les bactéries coliformes dans l'eau et d'autres échantillons environnementaux. Le principe fondamental de cette méthode est la filtration, dans laquelle l'échantillon est filtré à travers une membrane stérile, éliminant les particules plus grosses tout en capturant les bactéries à la surface de la membrane. Les bactéries retenues sur le filtre sont ensuite récupérées en plaçant la membrane sur un milieu sélectif et différentiel après une étape de dilution en raison de la concentration variable de coliformes dans les échantillons d'eau. Généralement les milieux utilisés sont Tergitol-Triphényl Tetrazolium Chloride Tergitol (TTC), la gélose MacConkey. (Grabow et Du Preez, 1979).

2.3.2. Limites des techniques conventionnelles de détection

Les techniques de culture sont certes les plus recommandées pour détecter et dénombrer les bactéries dans l'eau, mais elles présentent de nombreuses limites. Un premier frein réside dans la durée des analyses, généralement entre 24 et 48 heures. Durant ce laps de temps, les consommateurs peuvent être exposés à des agents pathogènes, et une confirmation des résultats s'avère parfois nécessaire. La présence de bactéries non-coliformes en grand nombre ou de substances inhibitrices dans l'eau peut réduire la sensibilité de la détection (Means et Oison, 1981 ; Palmer et al., 1997). De plus Ces techniques ne permettent pas de détecter les micro-organismes pathogènes non bactériens, tels que les virus et les parasites (Clesceri et

al., 1998). On leur reproche donc un spectre de détection limité. De plus, un seul échantillon d'eau (100 ml) ne peut être analysé pour plus d'une cible, ce qui entrave la recherche simultanée d'indicateurs fécaux et de pathogènes bactériens. Ces méthodes ne sont pas non plus capables de détecter tous les représentants d'un organisme ou d'un groupe d'organismes ciblés. Dans l'environnement, certaines bactéries survivent dans un état de faible activité métabolique, appelées "viabiles mais non cultivables" (VBNC). Ces bactéries, indétectables par les méthodes de culture sur milieu, incluent plusieurs espèces pathogènes, dont certains sérotypes *d'E.Coli* (McDougald Rice W et Kjelleberg, 1998 ; Oliver, 1995). Ce phénomène peut conduire à des faux négatifs en culture.

2.3.3. Techniques récentes

Actuellement plusieurs techniques récentes sont développés pour la détection des CF dans l'eau potable , il semblerait donc que le futur de la microbiologie soit au développement de nouvelles méthodes récentes et parfois automatiques, comme le prédisaient Watkins et Jian en 1997“Future microbiologists may not use culture but dépend on the use of specific probes and sophisticated detection systems.” (Watkins et Jian, 1997).

Parmi ces techniques on va voir dans le chapitre suivant des techniques enzymatiques, moléculaires et des technologies de suivi sur site.

Partie 2 :

**Partie de synthèse sur les
travaux scientifiques
choisis**

Chapitre 3 :

La méthodologie suivie dans les travaux choisis

3.1. Problématique et objectif de l'étude

Etant donné les limites associées aux méthodes conventionnelles pour détecter les coliformes fécaux dans l'eau potable qui sont déjà présentés dans la partie précédente. Mais le besoin d'une surveillance plus rapide a amené les chercheurs à explorer des nouvelles méthodes de détection. Des tests enzymatiques, des méthodes moléculaires sont mise en place et avec l'avancement scientifiques la biotechnologie a ouvert ses portes aux nouvelles technologies de suivi sur site qui sont apparues pour améliorer et accélérer encore la détection. Ces dernières années une augmentation remarquable des technique disponible pour analyser l'eau potable avec une réduction de coût, cette diversification des outils offre aux professionnels un éventail plus large de solutions pour détecter et mesurer divers contaminants. (Mendes Silva et Domingues, 2015). Cette évolution ouvre la voie à un meilleur contrôle de la qualité de l'eau potable et alors une protection de la santé publique vis-à-vis aux maladies d'origine hydrique. Dans cette partie différentes méthodes récentes sont analysés : des méthodes enzymatiques, moléculaires et des nouvelles technologies de suivi sur site, dans chaque méthode deux techniques sont analysées à partir de plusieurs documents scientifiques pour atteindre l'objectif de cette étude.

3.2. Les méthodes enzymatiques

Les méthodes enzymatiques sont des méthodes récentes prometteuses développées pour remplacer les méthodes conventionnelles, en raison que les bactéries peuvent perdre leur aptitude pour former des colonies observables dans les milieux de cultures. Les méthodes enzymatiques ne détectent pas les microorganismes directement mais elles détectent une enzyme spécifique à ce microorganisme. (George et al., 2000).

3.2.1. Dip test

3.2.1.1. Définition

Le Dip test est un nouveau test développé par Gunda et al. (2017) pour la détection des coliformes fécaux spécifiquement *E. coli* dans l'échantillon d'eau, c'est une méthode rapide et facile pour vérifier la qualité microbiologique d'eau potable.

3.2.1.2. Principe

Le test est basé sur des réactions enzymatiques entre une enzyme spécifique d'*E. Coli* et le substrat correspondant à cette enzyme, le substrat est fixé sur un papier de tournesol poreux et la bande de papier se compose d'un long morceau étroit de papier buvard cellulosique composé de deux bords. Le bord supérieur est limitée par une barrière hydrophobe de cire

pour stopper la migration de solution et un bord inferieur enduit d'un chimioattractant qui attire les bactéries *E.Coli*, entre ces deux bords une zone de réaction contient des réactifs chimiques formulées sur mesure qui joue le rôle d'un substrat et réagit avec l'enzyme Lorsque la bande est submergée dans l'échantillon d'eau qui contient l'*E.Coli*. Cette dernière est attirée vers la bande et migrée jusqu'a la zone de réaction sous l'action des mécanismes chimiotaxique et capillarité respectivement. La migration est arrêtée au bord supérieur de papier par la barrière hydrophobe, dans la zone de réaction, l'*E.Coli* concentré réagira avec les réactifs chimiques pour produire une couleur rouge rosé qui indique la présence d'une contamination fécale par *E.Coli* dans l'eau potable. (Gunda et al., 2017).

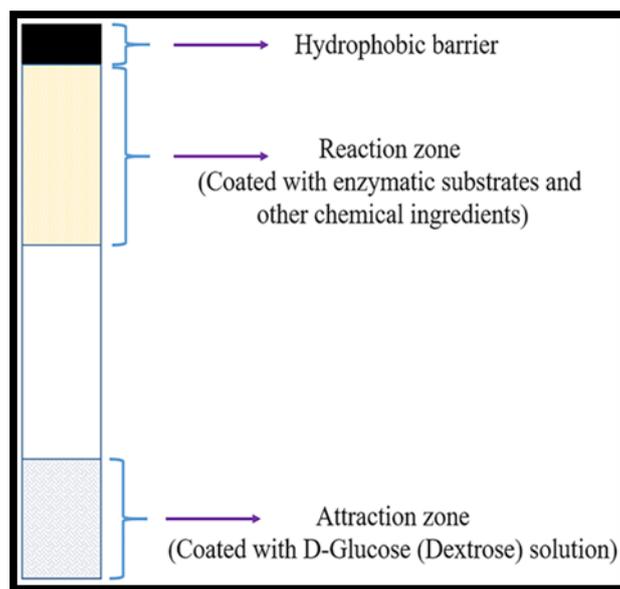


Figure 5. Schéma de dispositif. (Gunda et al., 2017)

3.2.1.3. Matériel

Tableau 2. Le matériel utilisé pour la réalisation de Dip test. (Gunda et al., 2017)

Les souches bactériennes	Les réactifs
<ul style="list-style-type: none"> • Les souches bactériennes (<i>E.coli</i> K-12, <i>E.coli</i> Castellani, <i>E.Coli</i> Chalmers). • <i>Salmonella enterica</i> (<i>S.enterica</i>) (ATCC 14028). • <i>Enterococcus faecalis</i> (<i>E.faecalis</i>) (ATCC 19433). • <i>Bacillus subtilis</i> (<i>B.substilis</i>) (ATCC 33712, souche MI112). 	<ul style="list-style-type: none"> • Papier buvard. • Un substrat enzymatique Red-Gal (6-chloro-3-indolyl-β-D-galactoside) • N, N-Diméthylformamide (DMF) • Un réactif d'extraction de protéines bactériennes l'extrait de levure. • Un bouillon d'infusion cerveau-cœur • Un bouillon nutritif • Un bouillon d'infusion de veau • Un bouillon de lauryltryptose (LTB)

3.2.1.4. Méthode

- Dans la zone de réaction et à l'aide d'une pipette déposer 100 µl de la composition chimique formulée sur mesure (Red-Gal, B-PER et LTB), suivie d'un séchage à température autour de 23°C pendant une heure.
- Distribuer 100 µl de D-glucose 0,1 M dans le bord opposé de la bande de papier ensuite séché à température ambiante (23 °C) pendant une heure.
- Prolonger la zone d'attraction du papier dans l'eau contaminé par *E.Coli*.
- La dispersion de D-glucose provoque la migration d'*E.Coli* vers la bande jusqu'à le bord hydrophobe.
- Les bactéries fixées dans la zone réactive réagiront avec le substrat et produiront un couleur rouge rosé qui indique la présence d'*E.Coli*. (Dasgupta et al. ,2016 ; Gunda et al., 2017).

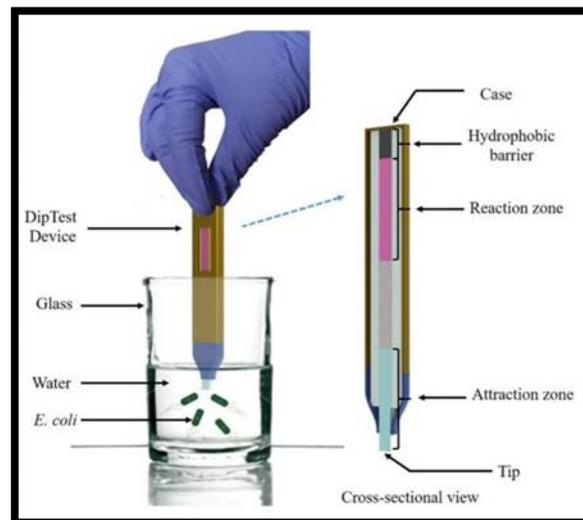


Figure 6. Représentation de l'utilisation de Dip test. (Gunda et al.,2017)

3.2.2. β -D-Glucuronidase

3.2.2.1. Définition

L'enzyme β -D-Glucuronidase (GLUC) est une hydrolase qui catalyse les liaisons osidiques des β -D-Glucuronides (Rompré et al., 2002). Structuellement elle comporte 603 acides aminés, similaire à 50% avec celle des humains (Arul et al., 2008). Cette enzyme ait été découverte pour la première fois chez *E.Coli* mais sa spécificité pour la détection de ce micro-organisme était apparente lorsque Kilian et Bulow (1976) étudient les *Enterobacteriaceae* et montrent que l'activité de la glucuronidase était principalement liée à *E.Coli*. Il a été montré aussi qu'entre 87 et 97% de ces bactéries possèdent l'enzyme GLUC, donc elles sont détectables par la méthode enzymatique (Rice et al., 1990), à l'exception de la souche pathogène *E.Coli* O157:H7 qui ne produit pas cette enzyme et n'est donc pas détectable par de tels tests. (Tryland et Fiksdal, 1998). La β -D-Glucuronidase est une enzyme inductible (Pardee et Prestidge, 1961). Sa production nécessite une stimulation par la présence d'un inducteur qui est généralement le substrat de l'enzyme, l'absence de l'indicateur rendre l'enzyme indétectable dans le milieu (Farlex, 2019). C'est devenu clair que la β -D-Glucuronidase a été utilisée comme un marqueur dans les tests enzymatiques pour la détection des entérocoques et *E.Coli* lors des contrôles de qualité microbiologique de l'eau.

3.2.2.2. Principe

Le principe des méthodes enzymatiques repose sur la détection d'enzyme spécifique d'un microorganisme particulier. Les réactions enzymatiques, selon l'enzyme visée, sont spécifiques, sensibles et rapides. Dans ce cas l'enzyme β -D-Glucuronidase est détectée par l'injection d'un substrat modifiée généralement fluorogènes ou chromogènes qui est détecté

par mesure optique. Le substrat le plus usité est le 4- méthylumbelliferyl- β -D-Glucuronide (MUGlu). Le clivage de celui-ci par le GLUC libre une fluorescence détectable surtout en milieu alcalin (Rompré et al., 2002).

3.2.2.3. Matériel

Tableau 3. Le matériel utilisé pour B-D-Glucuronidase. (Watkins et al., 1988)

les substrats chromogènes	Les appareils	Les solutions
*l'indoxyl-b-D-Glucuronide (IBDG) le complexe phénolphthaléine-mono-b-D-Glucuronide *5-bromo-4-chloro-3-indolyl-b-Dglucuronide (X-Glu) * 4 méthylumbelliferyl-b-D-glucuronide (MUGlu) * Chromogène 36 A. *O-nitrophényl-b-D-Galactopyranoside (ONPG) * p-nitrophényl-b-D-Galactopyranoside (PNPG) * 6-bromo-2-naphtyl-b-D-Galactopyranoside *5-bromo-4-chloro-3-indolyl-b-D-Galactopyranoside (X-Gal) 4-méthylumbelliferyl-b-D-Galactopyranoside (MUGal).	* Des filtres en polycarbonate de 0Æ2 lm de taille de pores et de 47 mm de diamètre * flacons Erlenmeyer de 200 * un bain-marie * spectrofluorimètre SFM 25	* Tampon phosphate (Annexe 1) * Solution MUGLU

3.2.2.4. Méthode

- Filtrer 100 ml d'échantillon d'eau à travers des filtres en polycarbonate de 0,2 µm de taille de pores et de 47 mm de diamètre.
- Placer le filtre dans des flacons Erlenmeyer stériles de 200 ml contenant 17 ml de tampon phosphate stérile (pH 6,9) et 3 ml de solution MUGLU (55 mg de MUGLU).
- Ajouter à chaque flacon 20 µl de Triton X-100 dans 50 ml. Ml d'eau stérile.
- Incuber le filtre dans un bain-marie à tampon à pH optimal (6,9) et à température optimale (44 °C) en présence du substrat fluorogène (4-méthylumbelliferyl-β-D-glucuronide (MUGlu) en concentration saturante et à mesurer l'apparition de la fluorescence au cours du temps (George et al., 2000).
- Mesuré l'intensité de fluorescence avec un spectrofluorimètre SFM 25 à une longueur d'onde d'excitation de 362 nm et longueur d'onde d'émission de 445 nm.

3.3. Les méthodes moléculaires

Les nombreuses avancées en biologie moléculaire au cours des 30 dernières années ont permis la mise au point de plusieurs nouvelles méthodes de détection qui ont été conçues pour raccourcir les temps d'analyse avec la conservation de la même sensibilité et spécificité ainsi avec une réduction d'étape de confirmation. (Tambi et al., 2023).

3.3.1. La PCR en temps réel ou la q-PCR (Quantitative Polymerase Chain Reaction)

3.3.1.1. Définition

C'est une technologie basée sur la détection de l'amplification d'un produit basée sur la Fluorescence durant une réaction de PCR Mesure la quantité initial d'un acide nucléique en déterminant le nombre de cycle requis pour atteindre un niveau déterminé de produit (Bustin, 2000).

3.3.1.2. Principe

Permet la détection et la quantification de l'ADN en cours de l'amplification. Cette réaction peut être réalisée en utilisant un marqueur fluorescent (SYBR® green) ou une sonde de détection fluorogénique (Taq- man®) qui s'hybride de manière spécifique sur le fragment d'ADN. La fluorescence est mesurée à chaque cycle. (Bustin, 2000)

3.3.1.3. Matériel

Tableau 4. Le matériel utilisé pour le PCR en temps réel. (Perrelle et al., 2004).

Les produits	Les appareille
<ul style="list-style-type: none"> • ADN double brin • Les amorces • ADN polymérase • un marqueur fluorescent • solution PREPMAN • Echantillon d'eau 	<ul style="list-style-type: none"> • Microtube • Centrifugeuse • Micro-pipette • Thermocycleur

3.3.1.4. Méthode

- L'extraction d'ADN a été réalisée selon les recommandations du kit Prepman commercialisé par la société Applied Biosystems : 1 ml du bouillon d'enrichissement a été prélevé dans un Microtube vissé puis une centrifugation de 2 min à 13 000 rpm (centrifugeuse 5415 D, eppendorf) a été effectuée. (Perrelle et al., 2004).
- Après cette étape, le surnageant a été éliminé et le culot mélangé avec 200µL de solution PREPMAN par aspiration-refoulement grâce à une micro-pipette
- Disposer les réactions dans une plaque de qPCR
- La dénaturation se fait à 95°C pendant 2-3 minutes pour dénaturer complètement l'ADN double brin.
- L'hybridation des amorces utilisées pendant 30-60 secondes à 60°C
- La fluorescence est mesurée à chaque cycle pour quantifier l'ADN amplifié.

3.3.2. Amplification Isotherme à Boucles (LAMP)

3.3.2.1. Définition

Loop mediated isothermal amplification (LAMP) ou Amplification isotherme induite par boucle. C'est une nouvelle technologie de biologie moléculaire basée sur l'amplification des acides nucléiques, l'amplification se déroule dans un thermocycleur ou un bain marie à température constante (65°C). Elle a été mise au point par Notomi en 2000 et développée par la compagnie japonaise Eiken Chemical Company (Tokyo). (Notomi et al., 2000). Est une méthode efficace qui permet la synthèse d'une grande quantité d'ADN en peu de temps avec une grande spécificité. (Ehtisham-Ul -haque et al., 2018).

3.3.2.2. Principe

LAMP est une méthode d'amplification d'ADN en seule étape, en utilisant de l'ADN polymérase avec une activité de déplacement de brin Notomi et al. (2000), qui permet une amplification dans des conditions isothermes (65°C). En utilisant quatre amorces spécifiques de six régions de l'ADN cible. Les régions (désignées F1, F2 et F3) se situent en amont du gène cible par contre les trois autres (B1, B2 et B3) sont en aval. (Yokoyama et al., 2010), l'hybridation de l'ADN cible avec les trois amorces sens permet l'élongation de ces dernières tandis que le brin néosynthétisé s'hybride avec les trois amorces anti sens pour assurer leur élongation.

3.3.2.3. Matériel

Tableau 5. Le matériel utilisé pour la réalisation de LAMP. (Wangs et al., 2008 ; Watts, 2014)

Les appareils	Les produits	Les amorces
Un thermocycleur ou un bloc chauffant ou un bain marie à température (65°C).	<ul style="list-style-type: none"> • L'ADN matrice • ADN polymerase Bst (8 unités) • Le tampon Thermopol (Bst) (Annexe2) • Le Tampon d'amplification isotherme 10 X (Annexe3) • Des dNTP (1.6mM) • Le MgSO4 (4mM) • La betaine (0.8M) • L'eau ultra pure 	<ul style="list-style-type: none"> • Une amorce sens interne (FIP : Forward Inner Primer) (0.8mM). • Une amorce sens externe (F3) (0.2mM). • Une amorce anti sens interne (BIP : Backward Inner Primer) (0.8mM) • Une amorce anti sens externe (B3) (0.2mM). • Une amorce boucle interne (LPF : Loop Primer Forward) (4Mm). • Une amorce boucle externe (LPB : Loop Primer Backward) (4Mm)

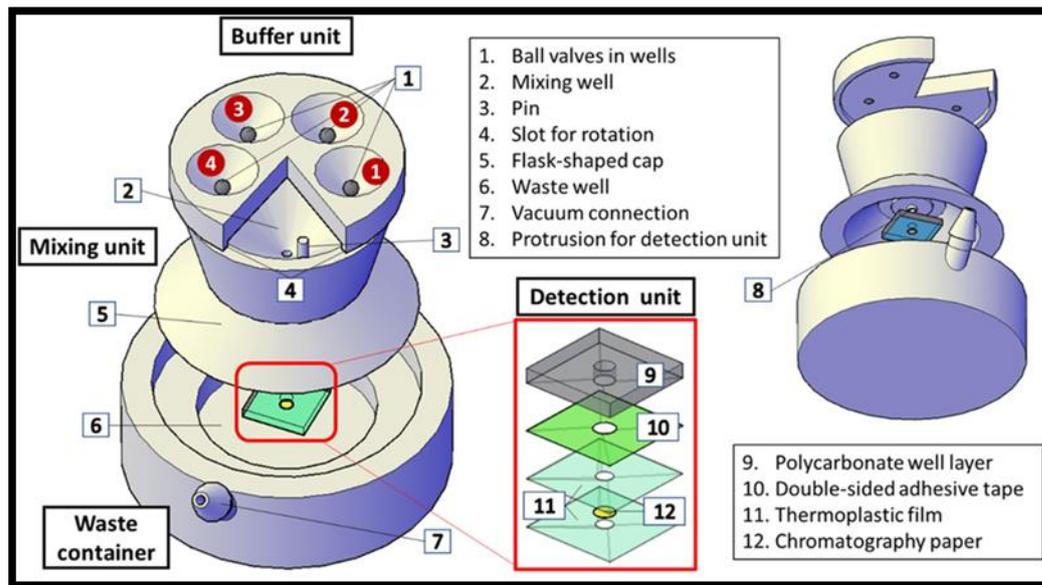


Figure 7. Vue éclatée des composants de l'appareil. (Manzanas et al., 2023)

3.3.2.4. Méthode

La méthode se déroule en 3 étapes principales et ne contient pas d'étape de purification ou de dénaturation de l'ADN bicaténaire ce qui explique la rapidité de cette méthode par rapport au PCR classique. Les étapes sont : (Notomi et al., 2000).

A. Hybridation avec les trois amorces sens

- L'hybridation de l'amorce FIP avec sa région complémentaire sur l'ADN double brin (pas besoin de dénaturation des 2 brins d'ADN)
- L'ADN polymérase Bst commence à synthétiser le brin d'ADN complémentaire à partir de l'extrémité 3' de la région F2 de l'amorce FIP.
- L'hybridation de l'amorce F3 à sa région complémentaire de l'ADN et à l'extérieur de l'amorce FIP et initie la synthèse du brin d'ADN par déplacement.
- A partir de l'amorce F3 et le brin d'ADN matrice, un fragment d'ADN double brin se forme.
- La libération d'un brin d'ADN qui est lié à l'amorce FIP suite à la synthèse du brin d'ADN complémentaire par déplacement à partir de l'amorce F3.
- une structure sous forme de boucle se forme à l'extrémité 5' grâce la complémentarité entre les régions F1 et F1c. (Notomi et al., 2000).

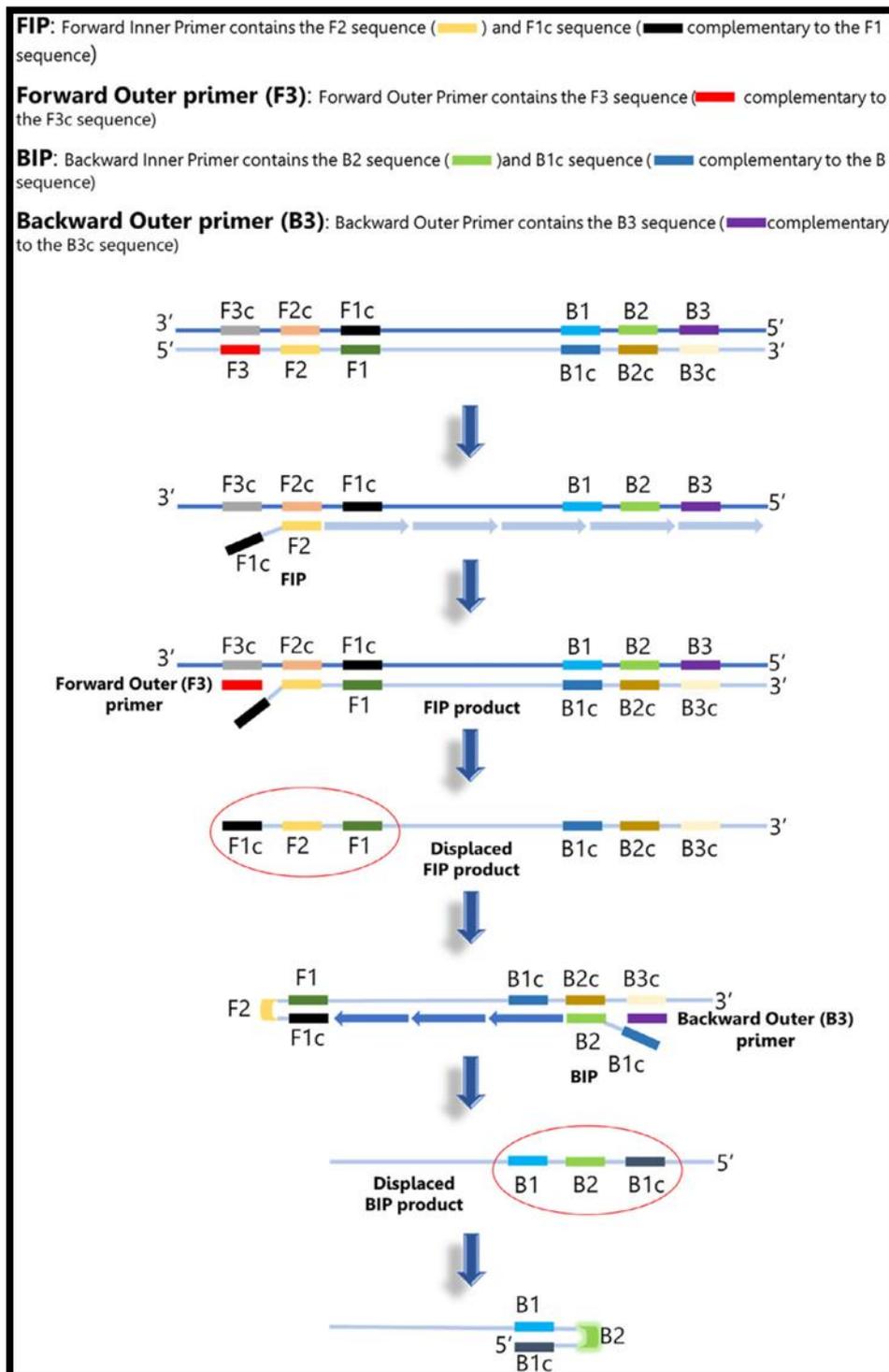


Figure 8. Les premières étapes de l'amplification LAMP. (Roy et al ., 2020)

B. Hybridation du nouveau brin avec trois amorces anti-sens

- L'hybridation de l'amorce BIP au brin d'ADN produit lors de l'étape précédente, et après le retour de la structure de l'ADN à la forme linéaire, elle initie la synthèse de l'ADN complémentaire à partir de l'extrémité 3'.

- L'hybridation de l'amorce F3 à l'extérieur de l'amorce BIP, toujours dans l'extrémité 3' et commence la synthèse du brin d'ADN complémentaire grâce à l'activité de l'ADN polymérase Bst (par déplacement de brin d'ADN). Ainsi le brin d'ADN formé à partir de l'amorce BIP est déplacé et libérée comme un fragment d'ADN simple brin, et ceci avant la synthèse à partir de F3.
- Une molécule d'ADN double brin linéaire est formée grâce à la méthode de déplacement de brin.
- La formation d'une queue en forme de boucle (stem-loop) entre chaque extrémité du même brin et entre les séquences complémentaires (exemple : F1 et F1c).
- En fin la formation d'un précipité blanc détectable par des méthodes électrochimiques ou colorimétriques. . (Notomi et al., 2000).

3.4. Des technologies de suivi sur site

Plusieurs technologies de suivi sur site pour la détection des coliformes fécaux dans l'eau potable sont mise en place, ces technologies permettant une estimation rapide de la qualité microbiologique de l'eau, même dans les conditions climatiques extrêmes tels que la forte humidité et température, de grands écarts de pH ou de turbidité d'eau et même les changements journaliers de température. L'ensemble des instruments et produits utilisés ne sont pas dangereux ou toxiques .Parmi les autres points importants la simplicité d'application et la plus parts de ces technologies sont connectées à internet et ainsi fournir les résultats en temps réel aux utilisateurs et envoyer des alertes en cas de contamination avérée. (Cazal, 2019).

3.4.1. ColiSense

3.4.1.1. Définition

Le système ColiSense se distingue comme un outil innovant pour la détection directe sur site de l'activité enzymatique d'*E.Coli*, révolutionnant ainsi les tests d'eau environnementale. Optimisé pour les dosages continus basés sur le substrat 6-CMUG, le système comporte des chambres à échantillons en triple afin d'améliorer la robustesse statistique des résultats. Chaque chambre est équipée d'une source d'excitation à 362 nm et d'un détecteur d'émission à 445 nm. De plus, un système d'incubation intégré régule la température à $44^{\circ}\text{C} \pm 0,5^{\circ}\text{C}$, offrant des conditions optimales pour la réaction chimique. (Heery et al., 2015)

3.4.1.2. Principe

La technologie ColiSense est basée sur la combinaison entre une réaction chimique et un analyseur de laboratoire automatisé et sensible. Le système a été optimisé pour la détection rapide (75 min) sur site d'*E. coli* à l'aide d'un test enzymatique fluorescent. La réaction chimique entre l'enzyme cible la β -D-Glucuronidase (GUS) produit par *E. coli* et le substrat synthétique 6-Chloro-4-Méthyl-Umbelliferyl- β -D-Glucuronide (6-CMUG), l'hydrolyse de cet substrat par l'enzyme libre une molécule fluorescente 6-Chloro-4-Méthyl- Umbelliférole (6-CMU). Le système a été calibré avec les standards 6-CMU. Une LOD de 5 nM et une résolution inférieure à 1 nM ont été déterminées. (Heery et al., 2015).

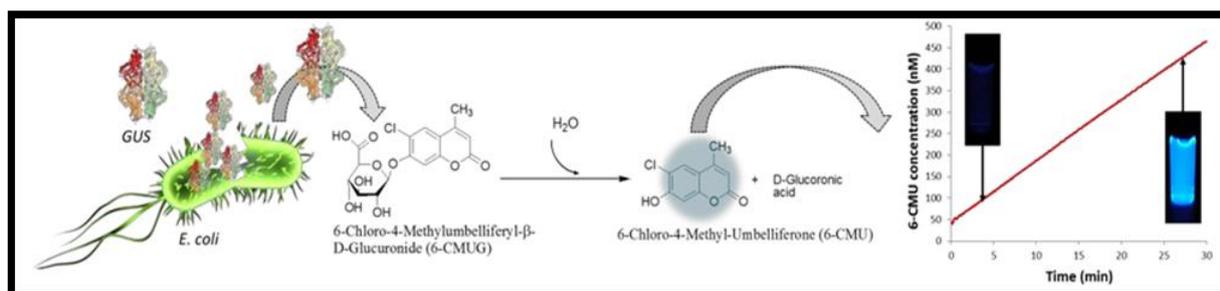


Figure 9. Principe de la technique ColiSense. (Heery et al., 2015)

3.4.1.3. Matériel

Tableau 6. Le matériel utilisé pour la réalisation de la nouvelle technologie de suivi sur site ColiSense. (Heery et al., 2015)

Produits chimiques et réactifs	Composants d'ingénierie
<ul style="list-style-type: none"> Le substrat fluorogène, le 6-chloro-4-méthylumbelliferyl-β-D-Glucuronide (97 %) (6-CMUG) L'enzyme β-D-Glucuronidase de type VII-A (27 %) Le 1,4-dithiothréitol (DTT) Le tampon bactérien PELB Le lysozyme PELB Des solutions mères de fluorophore et de substrat (100 mM) Des échantillons d'eau potable 	<ul style="list-style-type: none"> Des filtres seringueur Des LED ultraviolettes Des amplificateurs opérationnels (MCP601) Un radiateur en silicone mat Un capteur de température numérique (DS18B20) Des régulateurs de tension (LM317) Un réseau de transistors Darlington (ULN2803) Des photodiodes Des flacons d'échantillons en verre (TVL-050-040) Le boîtier de l'instrument (Diatec S White) Le bloc chauffant a été usiné en

	interne en aluminium. <ul style="list-style-type: none">• Une carte microcontrôleur Wixel• Les filtres optiques (GG-420, Long Pass, diamètre 12,5 mm.
--	--

3.4.1.4. Méthode

- Filtrer l'échantillon à travers un filtre seringue de 0,45 μm pour capturer et concentrer les bactéries.
- Pour une lyse cellulaire ajouter 100 μL d'un agent de lyse.
- ajouter 1.9 ml de tampon (pH 6,8).
- Récupérer les échantillons dans des flacons en verre de 2 ml.
- Placer les flacons dans le Colisence pour avoir un préchauffage à 44 °C.
- Ajouter une aliquote de 10 μL de 100 mM de 6-MUG dans du DMSO aux flacons et les replacés dans le Colisence.
- laisser s'équilibrer, surveiller et enregistrer l'activité GUS pendant 30 min. (Herry et al., 2015).

3.4.2. TECTA™ B16

3.4.2.1. Définition

Tecta EC/TC est une méthode microbiologique pour la détection simultanée des coliformes totaux et d'*E.Coli* dans l'eau potable. Elle repose sur la détection de deux enzymes, la β -Glucuronidase et la β -Galactosidase. Cette méthode est simple, sensible et flexible, et permet de tester à tout moment. (Burnet et al., 2019)



Figure 10. TECTA™ B16. (Burnet et al., 2019)

3.4.2.2. Principe

Pour le contrôle sanitaire de l'eau, le système automatisé de test microbiologique TECTA™ B16 capable de détecter en un temps record la présence de bactéries *E. coli*, Coliformes totaux et entérocoques en utilisant la méthode standard et approuvée à base d'enzymes. (Burnet et al., 2019). Le TECTA™ B16 alerte immédiatement et sans attendre un période d'incubation dès qu'une contamination est détectée dans un échantillon.

3.4.2.3. Méthode

- Verser 100 ml d'échantillon non dilué dans la cartouche de test.
- Placer la cartouche dans l'instrument dans une des chambres de mesure De l'appareil et utiliser le panneau de commande pour lancer le test.
- après multiplication des bactéries, les enzymes β -D-Glucuronidase et β -Galactosidase sont exprimées, et les fluorochromes contenus dans les substrats sont libérés après clivage des échantillons par l'action de ces enzymes.
- Une mesure optique de la fluorescence émise, puis le logiciel de l'appareil convertit ces données en UFC/100ml. (Burnet et al., 2019).
- le résultat est obtenu après 2 à 18h, selon le niveau de contamination de l'échantillon.
- Les résultats peuvent être envoyés directement sur un téléphone, une tablette ou un ordinateur.

Chapitre 4 :
Les résultats des travaux
choisis

4.1. Les avantages et les inconvénients

Dans le cadre d'une étude comparative des techniques récentes pour la détection des coliformes fécaux dans l'eau potable, il est nécessaire de discuter les avantages et les inconvénients ainsi que les limites de détection de chaque technique afin de valider laquelle est la plus appropriée.

4.1.1. Dip test

Tableau 7. Les avantages et les inconvénients du technique enzymatique Dip test. (Gunda et al ., 2017 ;Tambi et al.,2023)

Les avantages	Les inconvénients
<ul style="list-style-type: none"> • Facile à appliquer. • Facile à transporter. • Facile à éliminer une fois le test est terminé. • Optimisation en termes de Concentrations des ingrédients chimiques individuelles. • Moins d'équipements • Détecte des concentrations aussi faibles que 200 CFU/ml. • Détecte des concentrations élevées 2×10^5 CFU/ml. • Grande variétés des échantillons. 	<ul style="list-style-type: none"> • Spécificité limitée. • Sensibilité variable. • Ne détecte pas les très faibles concentrations. • Résultats qualitatifs (nombre <i>d'E. Coli</i> inconnu). • Interférences potentielles. • Instabilité des enzymes. • Une variabilité dans le rendement des papiers commercialisés. • Ne détecte pas les VBNC.

4.1.2. β -D-Glucuronidase

Tableau 8. Les avantages et les inconvénients de technique enzymatique B-D-Glucuronidase.
(Farlex, 2019)

Les avantages	Les inconvénients
<ul style="list-style-type: none">• Polyvalence• Stabilité et sensibilité• Transférabilité• Applicabilité	<ul style="list-style-type: none">• Coût élevé• La grande taille de l'enzyme

4.1.3. La technique de LAMP

Tableau 9. Les avantages et les inconvénients de technique moléculaire LAMP. (AikawaT et al., 2015;Craw et Balachandran, 2012 ;Njiru Z.K et al ., 2011 ;Reuter et al ., 2019 ;SahooP.Ret al., 2016)

Les avantages	Les inconvénients
<ul style="list-style-type: none"> • Haute sensibilité • Application facile Les amorces sont hautement spécifiques aux séquences cibles. • Rapidité de l'analyse (gain de temps), nécessite un temps de réaction inférieur à 1 h. • Ne nécessite pas un changement thermique. • Pas besoin de matériel sophistiqué (donc moins couteuse). • Tolérance aux substances inhibitrices de la PCR. • Simple détection colorimétrique car l'acide nucléique est détecté à l'œil nu. • Surveillance en temps réel. • Implique à la fois une amplification et une détection du gène en une seule étape. • Pas besoin d'une étape de dénaturation. • Méthode moins chère. 	<ul style="list-style-type: none"> • Risque de contamination par d'autres acides nucléiques. • Ne peut pas être utilisé pour l'amplification de séquences de tailles supérieure à 300 pb. • La conception des amorces est assez compliquée. • Le grand nombre d'amorces par cible dans LAMP augmente les interactions entre les amorces. • Le produit de LAMP est une série de concatémères de la région cible. • Les approches de multiplexage est moins développées.

4.1.4. PCR en temps réel

Tableau 10. Les avantages et les inconvénients de technique moléculaire PCR en temps réel. (Bustin, 2000).

Les avantages	Les inconvénients
<ul style="list-style-type: none"> • Quantification sans manipulation post-amplification. • Processus automatisé rapide. • Risque de contamination réduit. • Analyse rapide et précise de la stabilité génétique. • Large gamme d'applications. • Technologies de détection innovantes. • Quantification basée sur les rapporteurs fluorescents. 	<ul style="list-style-type: none"> • Coût élevé • Optimisation • Faux résultats • Défis de quantification

4.1.5. La nouvelle technologie de suivi sur site Colisence

Tableau 11. Les avantages et les inconvénients de la nouvelle technologie de suivi sur site Colisence. (Heery et al., 2015)

Les avantages	Les inconvénients
<ul style="list-style-type: none"> • Haute sensibilité. • Rapide détection (75min). • Détection on site. • Système de détection portable. • Détection des VBNC. 	<ul style="list-style-type: none"> • Le cout élevé. • Besoin d'équipement. • Nécessité d'un personnel qualifié. • Formation continue.

4.1.6. La nouvelle technologie de suivi sur site TECTA™ B16

Tableau 12. Les avantages et les inconvénients de la nouvelle technologie de suivi sur site TECTA™ B16. (Burnet et al., 2019)

Les avantages	Les inconvénients
<ul style="list-style-type: none"> • Détection rapide. • Convivial. • Sensible. • Données haute résolution. • Simple, pratique et fiable. • Boîtier autonome doté d'un écran tactile de contrôle. • Connecté à internet pour accéder à distance. 	<ul style="list-style-type: none"> • Coût élevé • Temps d'incubation prolongé

4.2. Discussion

4.2.1. Critères de validation clés

Les normes ISO 17994 (International Organization for Standardization) fournissent un cadre internationalement reconnu pour la validation des techniques microbiologiques pour assurer la fiabilité des résultats, améliorer la comparabilité des données, répondre aux exigences réglementaires et renforcer la confiance des utilisateurs . Ces normes définissent les critères et les procédures à suivre pour évaluer les performances d'une technique en termes de sensibilité, de spécificité, de précision, de robustesse et d'autres paramètres pertinents. (ISO, 2004).

- Sensibilité : La capacité de la technique à détecter de faibles concentrations d'un microorganisme cible.
- Spécificité : La capacité de la technique à distinguer le microorganisme cible des autres microorganismes présents dans l'échantillon.
- Robustesse : La capacité de la technique à fournir des résultats cohérents dans des conditions variables et l'insensibilité d'analyse aux faibles modifications de la technique.

- Exactitude relative : La mesure de la proximité des résultats obtenus par la nouvelle méthode avec ceux de la méthode de référence, appliquées aux mêmes échantillons.
- Fidélité : L'uniformité des résultats d'essais répétés effectués dans les mêmes conditions, reflétant la précision et la cohérence de la méthode.
- Incertitude de mesure : Un paramètre lié au résultat de mesure, indiquant la dispersion des valeurs plausibles attribuables à la technique de mesure elle-même.
- Limite de détection : Le nombre minimum de particules nécessaire pour obtenir un résultat positif avec une fiabilité de 95%, permettant de distinguer les échantillons contaminés de ceux exempts de contaminants.
- Rendement : appelé aussi le taux, c'est le nombre de particules estimé dans un échantillon, sachant qu'il y a un nombre réel (même s'il est inconnu) de particules dont 100% ou moins sont récupérées par la méthode.
- Répétabilité : La mesure de la cohérence des résultats obtenus lors de mesures successives effectuées dans les mêmes conditions.
- Reproductibilité : La capacité de la méthode à produire des résultats cohérents lorsque la quantité mesurée est mesurée par différents opérateurs ou dans différents laboratoires, dans des conditions de mesure variées. (ISO, 2004)

D'après les Critères de validation clés et les tableaux présentés et qui s'exprime les avantages et les inconvénients de chaque méthode pour la détection des coliformes fécaux dans l'eau potable, plus précisément la bactérie *E.Coli* qui a été choisi après plusieurs études et recherches comme un indicateur fécal idéal. Trois types des méthodes sont analysés : des méthodes enzymatiques, moléculaires et des nouvelles technologies de suivi sur site, dans chaque méthode deux techniques sont étudiées et analysées.

- Les méthodes enzymatiques ont été validées par rapport à la simplicité d'application et à la vitesse de détection, elles permettent des mesures rapides ce qui en fait d'excellents outils de détection et suivi de contamination fécale en quasi temps réel (Gunda et al.,2017) Le temps requis pour obtenir les résultats est varié en fonction de la concentration d'*E.Coli* dans l'échantillon d'eau. Pour des concentrations plus faibles les résultats sont obtenus dans un temps inférieur que les échantillons plus concentrés. (Gunda et al., 2017)

En plus l'utilisation des substrats fluorogènes et chromogènes comme la 4 – méthylumbelliféryl-b-D-Glucuronide (MUGlu) permet d'accélérer la détection et d'améliorer la précision. (Rompré et al., 2002). Ces méthodes basent sur la détection d'une enzyme spécifique à un groupe, un genre ou une espèce, ici on parle dans le contexte de la sensibilité.

De plus, les résultats sont facile à interprétés grâce à une observation optique qui indique la présence ou l'absence d'*E.Coli* dans l'échantillon, le changement de couleur soit dans le test de l'enzyme β -D-Glucuronidase ou dans le Dip test est observable à l'œil nu ce qui rend l'application et l'interprétation plus facile (Gunda et al., 2017 ; Rompré et al.,2002).

Par contre, la sensibilité des méthodes enzymatiques fondées sur l'expression de l'enzyme β -Glucuronidase est limitée pour une identification positive d' *E.Coli* parce que *E.Coli* n'est pas la seule bactérie à exprimer l'enzyme β -D-Glucuronidase, et toutes les *E.Coli* ne l'expriment d'ailleurs pas, comme la souche pathogène *E.Coli* O157:H7 ne produit pas cette enzyme et n'est donc pas détectable par de tels tests, Des interférences avec d'autre organismes non- cibles sont donc possibles (Cazals,2019), mais certains études ont montré que les GLUC des bactéries non-cibles étaient moins induites dans l'environnement que celle d'*E.Coli*, et les concentrations sont généralement négligeables par rapport à la concentration produite par cette dernière. (Tryland et Fiksdal, 1998)

En revanche la base de ces méthodes est la détection d'une enzyme spécifique, et les enzymes sont instables hors leur température et pH idéal, alors des faux négatifs sont attendus ce qui rend ces méthodes moins spécifique.

Lorsque ces méthodes ne détectent pas directement les microorganismes mais seulement les enzymes qui les produites alors une détection des bactéries viables mais non-cultivables est impossible (Cazals, 2019).

- Toujours pour l'objectif de la détection des coliformes fécaux dans l'eau potable. Des méthodes de détection des acides nucléiques ont été développées en réponse aux nombreuses limites imposées par certaines autres méthodes.

Ces méthodes moléculaires ont été validées par rapport à leur spécificité, sensibilité et exactitude des résultats obtenus parce qu'elles ciblent des séquences spécifiques d'ADN des coliformes fécaux (Bernier, 2007) et pas seulement d'une seule espèce comme les méthodes enzymatiques qui basées principalement sur la détection d'*E.Coli*. Cette spécificité de

détection permettre de mieux comprendre la source et l'origine de la contamination par l'identification précise des espèces.

En plus elles détectent des faibles concentrations des coliformes fécaux dans les échantillons (Yokoyama et al., 2010). Cette sensibilité est très importante d'une part pour assurer les normes de potabilité d'eau et d'autre part pour éliminer tout risque lié à cette contamination parce que même des faibles concentrations peuvent être un signe de la présence des microorganismes pathogènes.

Malgré les avantages associés aux méthodes moléculaires, il est nécessaire de mentionner les limites de ces méthodes pour bien les comparés avec les deux autres méthodes analysés dans cette étude.

Bien que certaines méthodes moléculaires soient plus rapides que la PCR en temps réel, tel que la technique isotherme à boucle qui prend un temps d'analyse inférieur à 1 heure (Yokoyama et al., 2010), mais elles peuvent encore prendre plus de temps que les méthodes enzymatiques pour obtenir des résultats, cela peut retarder d'une manière ou d'une autre la prise de décision et la mise en œuvre de mesures correctives au cas de contamination.

De plus, un peu de complexité est associée à ces méthodes par rapports aux méthodes enzymatiques. Une autre percée dans le monde de la biologie moléculaire est l'utilisation d'une technique plus avancée et plus flexible (LAMP) qui ne nécessite pas un changement thermique, toute la réaction se passe dans une température constante (65C°), et qui ne nécessite pas de matériels sophistiqués, il se fait seulement de mettre les réactifs dans un thermocycleur ou dans un bain marie (Mori et al., 2002), alors plus vite et moins chères que le PCR en temps réel mais elle reste plus coûteuses et plus compliquées que les méthodes enzymatiques principalement en raison du coût élevé de l'équipement et des réactifs requis pour l'analyse.

Un autre problème réside que certain méthodes moléculaires tel que le PCR en temps réel peut être inhibées par des substances organiques et inorganiques retrouvées naturellement dans l'eau tels les métaux et les minéraux, les polysaccharides et les acides humiques ce qui peut conduire à des résultats faussement positifs ou faussement négatifs. Par conséquent, il est crucial de garantir la pureté et la qualité du matériel d'ADN ou d'ARN départ, (Bernier, 2007). Mais il faut motionner ici que l'amplification isotherme à boucle (LAMP) à dépasser cette limite et à la capacité de tolérer ces inhibiteurs. Par contre le grand problème associé à

cette technique isotherme est la complexité et le grand nombre des amorces par cible qui augmente les interactions amorce-amorce.

- Les technologies suivies sur site ont été développées pour fournir un examen fécal simple et efficace qui permet la détection rapide des contaminations fécales (Cazal, 2019), ce qui réduit le temps d'incubation très long dans certaines méthodes de détection telles que les méthodes enzymatiques (Heery et al., 2015).

Ainsi, parmi les caractéristiques marquantes dans ces technologies c'est :

- la sensibilité qui permet à cette technique la capacité de détecter des petites concentrations des microorganismes.
- la facilité de connecté à l'internet pour accéder à distance.
- la simplicité de l'utilisation.

De plus, pas toutes les technologies de suivi sur site possèdent les mêmes avantages, par exemple, la technique Colisense a besoin d'un personnel qualifié pour l'utiliser à cause de leur équipement, alors que la technique TECTA™B16 n'a pas besoin de personnel qualifié, soit pour leur utilisation ou bien pour l'interprétation des résultats obtenus (Burnet et al., 2019).

En revanche, il faut noter que ces nouvelles technologies partagent le même problème qui est le cout élevé.

Conclusion

Conclusion

Afin d'assurer la sécurité sanitaire des usagers d'eau potable, il est nécessaire de détecter le plus rapidement possible toute contamination fécale. La détection des coliformes fécaux dans l'eau potable demeure un défi auquel l'humanité fait face pour encore bien des générations et comme les méthodes classiques de détection sont relativement simples et limitées, alors il est devenu indispensable de développer des méthodes modernes et récentes. (Lemarchand et Lebaron, 2003)

Dans ce travail, une analyse de différentes études qui démontrent certaines techniques récentes utilisées pour la détection des coliformes fécaux est nécessaire. Alors il apparaît plus judicieux de comparer ces méthodes sur leur capacité à protéger les citoyens vis-à-vis à cette menace sanitaire.

Les études analysées démontrent que le choix de la technique la plus appropriée pour la détection des coliformes fécaux dans l'eau potable dépend de plusieurs facteurs, tels que la sensibilité et la spécificité requise, le coût, la disponibilité des ressources et le délai de détection souhaité. (ISO, 2004)

- Les méthodes enzymatiques offrent la détection la plus rapide, mais elles sont moins sensibles et moins spécifiques.
- Les méthodes moléculaires offrent la meilleure sensibilité et spécificité, mais elles sont également les plus exigeantes en termes d'expertise technique.
- Les nouvelles technologies de suivi sur site offrent une haute sensibilité et détectent les VBNC aussi, mais elles sont plus coûteuses.

Alors il apparaît plus clair que le choix de la technique la plus appropriée dépend de l'objectif de chercheur.

- Si vous avez un budget limité, utilisez une méthode enzymatique.
- Si vous avez besoin de la méthode la plus précise possible, quelle que soit la rapidité ou le coût, utilisez une méthode moléculaire.
- Si vous avez besoin d'une méthode rapide et facile à utiliser, même si elle est moins précise, utilisez une nouvelle technologie de suivi sur site.

Au regard des informations et connaissances, la combinaison de plusieurs techniques peut être utile pour obtenir une image plus complète de la contamination fécale de l'eau potable.

Références bibliographiques

1. Aikawa T., Horino S., Ichihara Y. 2015. A novel and rapid diagnostic method for discriminating between feces of Sika deer and Japanese serow by loop-mediated isothermal amplification. *Mamm Genome.*, 26: 355-363
2. Arul L., Benita G., Balasubramanian P. 2008. Functional insight for beta-D-glucuronidase in *Escherichia coli* and *Staphylococcus sp.* *RLH1.* 2(8), 339-343.
3. Ashbolt N. J. 2004. Microbial contamination of drinking water and disease outcomes in developing regions. *Toxicology* 198:229-238.x
4. Bain C.C., Bravo-Blas A., Scott C.L., Perdiguero E.G., Geissmann F., Henri S., Malissen B., Artis D., Mowat A.M. 2014. Constant replenishment from circulating monocytes maintains the macrophage pool in the intestine of adult mice. (10) :929-937.
5. Bernier J. 2007. Transport technologique et validation de tests microbiologiques sur un laboratoire mobile conçu pour la surveillance de la qualité de l'eau en région éloignées
6. Bouziani H. 2000. L'eau de la pénurie eaux maladies. Edition : IBN KHALDOUNE
7. Brenner H , Gaydos L. 1977. The constrained brownian movement of spherical particles in cylindrical pores of comparable radius: Models of the diffusive and convective transport of solute molecules in membranes and porous media. (58) :312-356.
8. Buchanan R.E. and Gibbons N.E. 1974. *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology.* 8th Edition, Williams and Wilkins, Baltimore, 1268 p
9. Burnet J.-B., Dinh Q. T., Imbeault S., Servais P., Dorner S., Prévost M. 2019. Autonomous online measurement of β -D-glucuronidase activity in surface water : is it suitable for rapid *E. Coli* monitoring ? *Water Research*, 152, 10.
10. Bustin, S. A. 2000. Absolute quantification of mRNA using realtime reverse transcription polymerase chain reaction assays. *Journal of Molecular Endocrinology* .169-193.
11. Cabral J. P. S. 2010. Water Microbiology. Bacterial Pathogens and Water. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 7, 3657-3703.
12. Cazals M. 2019. Application d'une nouvelle technologie de détection enzymatique pour le suivi en quasi-temps réel de la dynamique d'*Escherichia coli* dans des eaux récréatives 5 [Mémoire de maîtrise, Polytechnique Montréal]. PolyPublie.
<https://publications.polymtl.ca/3946/>
13. CEAEQ. 2000. Recherche et dénombrement des coliformes totaux ; méthode par filtration sur membrane. Centre d'expertise en analyse environnementale, Gouvernement du Québec.

14. Chelli L., Djouhr I.N. 2013, Analyses des eaux de réseau de la ville de Béjaia et évaluation de leur pouvoir entartrant Mémoire de magister, Université A. MIRA – bejaia – 7 p.
15. Clesceri L. S., Greenberg A.E., Eaton A.D. 1998. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, Arnold E. Greenberg éd. American Public Health Association, Washington, D. C : 1325 pages pages.
16. Craw P., Balachandran W. 2012. Isothermal nucleic acid amplification technologies for point-of-care diagnostics : a critical review.
17. Dasgupta S., Gunda N S K., Mitra S K.2016. Fishing, trapping and killing of *Escherichia coli* (*E.Coli*) in potable water. Environmental Science : Water Research & Technology. 2(6) : 931–941.
18. Degremont. 2005 .Mémento technique de l'eau Deuxième édition Tom1, P 39-50.
19. Desjardins R.1997.Le traitement des eaux : 2^{ème} éd.rev.et améliorée. 304p.
20. Dupont A. 1986. Hydraulique urbain, hydrologie, captage et traitement des eaux. 6^{ème} édition. Edition : EYROLLES. Paris. P : 64 - 66.
21. Edberg R., Raczynski M., Prost J.C., Elmur T. 2000. Aide à la fiabilisation de l'eau potable en milieu rural. Aspect techniques et financiers .Oieau, France .P : 5.
22. Edberg S. C., Rice E. W., Karlin R. J., Allen M. J.2000. *Escherichia coli* : the best biological drinking water indicator for public health protection. Journal of Applied Microbiology(29) : 106-116.
23. Ehtisham-Ul –haque S., Zaman M.A., Kiran M., Rafique M.K.2018.Current loop-mediated isothermal amplification (LAMP) technologies for the detection of poultry pathogens.
24. Eliot E., Colwell R.R.1985.Indicator organisms for estuarine and marine waters. (32) :61-79.
25. Francy D. S., Myers D. N., Metzker K. D. 1993. *Escherichia coli* and fecal-coliform bacteria as indicators of recreational water quality.
26. Garcia-Armisen T., Lebaron P., Servais P. 2005. β -D-Glucuronidase activity assay to assess viable *Escherichia coli* abundance in freshwaters. Letters in Applied Microbiology, 40 : 278–282
27. Garcia-Armisen T., Servais P.2004. Enumeration of viable *E.Coli* in rivers and wastewaters by fluorescent in situ hybridization. 58:269– 279
28. George I., Petit M., Servais P. 2000. Use of enzymatic methods for rapid enumeration of coliforms in freshwaters. Journal of Applied Microbiology, 88(3), 404-413.

29. Gerard P. 2004. Analyse physico-chimique. Edition : UCL/AC/ADST/YDDR : P 6-7.
30. Grabow W. O. Du Preez M. 1979. Comparison of m-Endo LES, MacConkey, and Teepol media for membrane filtration counting of total coliform bacteria in water. *Applied and Environmental Microbiology* 38 (3), 351–358
31. Guerzou F. 2008. Etude de la potabilité des eaux souterraines de la région de Djelfa (Aspect physico-chimique). Mémoire de Fin d'Etude en Vue de l'Obtention du Diplôme d'Ingénieur d'Etat en Biologie. P56.
32. Gunda N S K., Dasgupta S ., Mitra S K .2017. DipTest: A litmus test for *E.Coli* detection in water. *PLoS One* .12 (9): e0183234.
33. Heery B., Briciu-Burghina C., Zhang D., Duffy G., Brabazon D., Regan F.2015. ColiSense, today's sample today : A rapid on-site detection of β -d-Glucuronidase activity in surface water as a surrogate for *E.Coli*.
34. Hounsou M.B., Agbossou E.K., Ahamide B., Akponikpe I.2010. Qualité bactériologique de l'eau du bassin de l'Ouémé : cas des coliformes totaux et fécaux dans les retenues d'eau de l'Okpara, de Djougou et de Savalou au Bénin. 4(2) : 377-390.
35. INSPQ .2003. Institut national de santé publique du Québec 2003.
36. ISO. 2004. 17994. Water Quality – Criteria for establishing equivalence between microbiological methods. International Standards Organization, Geneva.
37. Jean.2002 Jeanjuc .Elleric, La dégradation de la qualité de l'eau dans les réseaux, Paris.
38. Kilian M., Bülo, P. 1976. Rapid diagnosis of *Enterobacteriaceae*.84 :245-251.
39. Lanteigne J. 2003. Encyclopédie de l'agora.
40. Lebaron P., Henry A., Lepeuple A., Pena G., Servais P.2005. . An operational method for the real- time monitoring of *E.Coli* numbers in bathing waters. 50(6) : 652-659.
41. Lefèvre. 1991. Les analyses d'eau avec les tests prêts à l'emploi : la potabilité de l'eau, les eaux piscicoles, l'eau des piscines, laboratoire Merck-Clevenot.
42. Lemarchand K., Lebaron P. 2003. Occurrence of *Salmonella spp.* and *Cryptosporidium spp.* in a French coastal watershed : relationship with fecal indicators. *FEMS Microbiol Lett* 218:203-209.
43. Ley A., Barr S., Fredenburgh D., Taylor M., Walker N.1993. Use of 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-b-D-galactopyranoside for the isolation of b-D-galactosidase-positive bacteria from municipal water supplies. *Can. J. Microbiol.* 39, 821 – 825.

44. Maheux A., Boudreau D.K., Bisson M.A., Dupont V.D., Bouchard S., Nkuranga M., Bergeron M.G., Rodriguez M. 2014. Molecular Method for Detection of Total Coliforms in Drinking Water Samples.
45. Manzanas C., Morrison E., Kim Y.S., Alipanah., Adedokun G., Jin S., Osborne T.Z., Fan Z.H. 2003. Molecular testing devices for on-site detection of *E. Coli* in water samples.
46. McDougald D., Rice S., Weichart D., Kjelleberg S. 1998. Nonculturability : adaptation or debilitation?
47. Mead P. S., Griffin P. M. 1998. *Escherichia coli* O 157:H7. The Lancet, 352, 1207-1212
48. Means E. G. B. H. Oison. 1981. Coliform inhibition by bacteriocin-like substances in drinking water distribution Systems. Appl Environ Microbiol 42:506- 512.
49. Mendes Silva. D., Domingues. L. 2015. On the track for an efficient detection of *Escherichia coli* in water : A review on PCR-based methods. Ecotoxicol. Environ. Saf., 113: 400-411.
50. Mori S., Ohtani Y., Imanaka K. 2002. Reaction times and anticipatory skills of karateathletes. (2) :213-30.
51. Njiru Z.K., Traub R., Ouma J.O., Enyaru J.C., Matovu E. 2011. Detection of Group 1 *Trypanosoma brucei gambiense* by Loop-Mediated Isothermal Amplification. 49 (4) :1530-1536
52. Notomi T., Okayama H., Masubucki H., Yonekawa T., Watanabe K., Amino N., Hase T. 2000. Loop-mediated isother- mal amplification of DNA, Nucleic Acids Res 28, E63.
53. Odonkor S.T., Ampofo J. K. 2013. *Escherichia coli* as an indicator of bacteriological quality of water : an overview. Microbiology Research, 4(2), 5-11.
54. Oliver J. D. 1995. The viable but non-culturable state in the human pathogen *Vibrio vulnificus*. FEMS Microbiol Lett 133:203-208.
55. OMS. 2006. Background document for preparation of WHO Guidelines for drinking-water quality. Geneva. Switzerland
56. OMS. 2017. Directives de qualité pour l'eau de boisson : 4 éd. intégrant le premier additif [Guidelines for drinking-water quality: 4th ed. incorporating first addendum] ISBN 978-92-4-254995-9
57. Ouahchia C., Hamaidi Chergui F., Hamaidi M. S., Saidi F. 2015. Qualité bactériologique de l'eau potable des différents réservoirs et chez les consommateurs

- de la commune de Tipaza alimentés par la station de Sidi Amar à partir de l'eau de surface du lac barrage de Boukourdane.23 :139-154
58. Palmer M., Covich A., Finlay B.J., Gibert J., Hyde K.D., Johnson K.R., Kairesalo T., Lake P., Lovell C.R., Naiman R.J., Ricci C., Sabater F., Stayter D. 1997. Biodiversity and ecosystem processes in freshwater sediments. *Ambio*. 26:571-577.*
59. Paneth N. 2004. Assessing the contributions of John Snow to epidemiology : 150 years after removal of the broad street pump handle. *Epidemiology* 15:514-6.
60. Pardee A. B., Prestidge L. S. 1961. The initial kinetics of enzyme induction. *Biochimica et 49(1), Biophysica Acta*, 77-88.
61. Payment P. J., Siemiatycki J., Richardson L., Renaud G., Franco F., Prevost M. 1997. A prospective epidemiological study of gastrointestinal health effects due to the consumption of drinking water. *Int. J. Environ. Health Res.* 7:5- 31
62. Rejsek F. 2002. Analyse des eaux aspects réglementaires et techniques. Ed CRDP, Aquitaine. France, 358 p.
63. Reuter C., Slesiona N., Hentschel S., Aehlig O., Breitenstein A., Csáki A., Henkel T., Fritzsche W. 2019. Loop-mediated amplification as promising on-site detection approach for *Legionella pneumophila* and *Legionella spp.* *Applied microbiology and biotechnology* .104 (1) : 405-415.
64. Rice E. W., Allen M. J., Edberg S. C. 1990. Efficacy of β -Glucuronidase assay for identification of *Escherichia coli* by the Defined-Substrate Technology. *Applied and Environmental Microbiology*, 56(5), 1203-1205.
65. Rodier J. 2005. L'analyse de l'eau : Eaux naturelles, Eaux résiduaires, Eau de mer. 8eme édition : Dunod, Paris.
66. Rompré A., Servais P., Baudart J., de-Roubi, M.-R., Laurent P. 2002. Detection and enumeration of coliforms in drinking water : current methods and emerging approaches. *Journal of Microbiological Methods*, 49(1), 31-54.
67. Rosni N.M., Sahdan M.Z., Wibowo K.M., Muslihata A., Hashim I.S., Ahmad S.A., Sari Y., Mansor Z. 2018. The Detection of *Escherichia Coli* in Water resources.
68. Roy B.G., Ryndock E., Lappa C.M. 2020. Utilizing loop-mediated isothermal amplification to detect the presence of *Escherichia coli* : An inquiry-driven undergraduate laboratory module.
69. Sahoo P.R., Sethy K., Mohapatra S., Panda D. 2016. Loop mediated isothermal Amplification : An innovative gene amplification technique for animal diseases, *Veterinary World*, 9(5) : 465-469.

70. Straub T. M. D. P., Chandler. 2003. Towards a unified System for detecting waterborne pathogens. *J Microbiol Methods* 53:185-197.
71. Tambi A., Brighub U., Guptab A.B. 2023. Methods for detection and enumeration of coliforms in drinking water.
72. Tryland I., Fiksdal L. 1998. Enzyme characteristics of β -D-Galactosidase- and β -D-Glucuronidase-positive bacteria and their interference in rapid methods for detection of water borne coliforms and *Escherichia coli*. *Applied and Environmental Microbiology*, 64(3), 1018-1023.
73. Verhille S. 2013. Les indicateurs microbiens dans l'évaluation de l'eau potable : interpréter les résultats de laboratoire et comprendre leur signification pour la santé publique.
74. Wade J.T., Reppas N.B., Church G.M., Struhl K. 2006. The Transition between Transcriptional Initiation and Elongation in *E. Coli* Is Highly Variable and Often Rate Limiting.
75. Wang D., LIU F., Huo G., Ren D., LI Y. 2008. Development and evaluation of a loop-mediated isothermal amplification method for detecting *Escherichia coli* O:157 IN RAW MILK.
76. Watkins and Jian .1997. Cultural methods of detection for microorganisms : recent advances and successes.
77. Watts M. 2014. A Loop-Mediated Isothermal Amplification (LAMP) Assay for *Strongyloides stercoralis* in Stool That Uses a Visual Detection Method with SYTO-82 Fluorescent Dye. *The American journal of tropical medicine and hygiene*. 90. (2), 306-311.
78. Wilson GS and Miles A. 1975 (eds) : Topley & Wilsons Principles of Bacteriology, Virology and Immunology, ed 6. Baltimore, Williams & Wilkins, pp 858-886
79. Wu P.C.S., Yeh G., Hsiao C. 2011. The Effect of Store Image and Service Quality on Brand Image and Purchase Intention for Private Label Brands. 19(1) :30-39.
80. Yokoyama E., Uchimura M., Ito k. 2010. Detection of Enteroaggregative *Escherichia coli* by Loop- Mediated Isothermal Amplification.
81. Siteweb1 : (https://www.drmicrobe.com/fiches/Citrobacter_sp.php)
82. Siteweb2 :
(<http://www.doh.wa.gov/CommunityandEnvironment/DrinkingWater/Contaminants/Coliform.aspx>)
83. Siteweb3 : https://www.drmicrobe.com/fiches/Citrobacter_sp.php)

Annexes

Annexe 1 : Tampon phosphate/ 1 comprimé pour 100 ml d'eau distillée

Sodium chloride.....	8
Potassium chloride.....	0.2
Di-sodium hydrogen phosphate.....	1.15
Potassium dihydrogen phosphate.....	0.2
Ph	7.3+/-0.2 à 25 °C

Annexe 2 : Le tampon Thermopol (Bst)

Tris-HCl	20 mM
pH	8,8
KCl	10 mM
(NH ₂) SO ₂₄	10 mM
Triton-X 100.....	0,1%
MgSO ₄	2 mM
New England Biolabs ; Ipswich ; MA)	

Annexe3 : Le Tampon d'amplification isotherme 10 X (Bst 2.0)

Tris-HCl	20 mM
(NH) SO	10 mM
KCl	150 mM
MgSO	2 mM
Tween®20.....	1%
PH	8,8 à 25 °C

Résumé

ملخص

بكتيريا القولون هي مؤشرات مهمة للجودة الميكروبيولوجية لمياه الشرب، مما يجعل اكتشافها عنصر أساسي لضمان حماية الصحة العامة. يقدم هذا الملخص دراسة مقارنة للطرق الحديثة في الكشف عن القولون البرازي في مياه الشرب. قامت الدراسة بتحليل الأساليب الحديثة المختلفة للكشف عن القولون البرازي وتقييم أدائها من حيث الحساسية، الخصوصية، السرعة، سهولة الاستخدام والتكلفة. تشمل التقنيات الرئيسية التي تمت دراستها: الطرق الإنزيمية، التقنيات الجزيئية، وتقنيات المراقبة في الموقع. وخلصت الدراسة إلى أن اختيار تقنية الكشف تعتمد على عدة عوامل، مثل الدقة المطلوبة، سرعة التحليل، توفر الموارد والتكلفة.

الكلمات المفتاحية: الجودة الميكروبيولوجية، التلوث البرازي، الكشف السريع، الإشريكية القولونية (إي كولاي)، مؤشر البراز

Résumé

Les bactéries coliformes sont des indicateurs cruciaux de la qualité microbiologique de l'eau potable, ce qui rend leur détection un élément essentiel pour garantir la protection de la santé publique. Ce résumé présente une étude comparative des techniques récentes pour la détection des coliformes fécaux dans l'eau potable, L'étude a analysé les différentes techniques récentes pour la détection des coliformes fécaux, en évaluant leurs performances en termes de sensibilité, de spécificité, de rapidité, de simplicité d'utilisation et de coût. Les principales techniques étudiées incluent : les techniques enzymatiques, moléculaires et les technologies de suivi sur site. L'étude a conclu que le choix de la technique de détection dépend de plusieurs facteurs, tels que la précision requise, la rapidité d'analyse, la disponibilité des ressources et le coût.

Mots clés : Qualité microbiologique, contamination fécale, détection rapide, *E.Coli*, indicateur fécal.

Abstract

Coliform bacteria are crucial indicators of the microbiological quality of drinking water, making their accurate detection essential element to ensure public health protection. This summary presents a comparative study of recent techniques for the detection of fecal coliforms in drinking water. The study analyzed the different recent techniques available for the detection of fecal coliforms, evaluating their performance in terms of sensitivity, specificity, speed, ease of use and cost. The main techniques studied include: enzymatic techniques, molecular techniques and on-site monitoring technologies. The study concluded that the choice of technique depends on several factors, such as the required accuracy, speed of analysis, resource availability and cost.

Keywords : Microbiological quality, fecal contamination, rapid detection, *E.Coli*, fecal indicator.