

50376
1992
256

62201

50376
1992
256

UNIVERSITE DES SCIENCES ET TECHNIQUES
DE LILLE FLANDRES ARTOIS
UFR DE BIOLOGIE

N° d'ordre 1006

Présentée pour l'obtention du titre de

Docteur es-Sciences de l'Université de Lille I

par



Emmanuelle GUILLOT



**Etude Bactériologique des Eaux
Minérales Naturelles ;
Utilisation de Marqueurs
Moléculaires**

Soutenue le 4 décembre 1992



Membres du Jury :

Messieurs

R. DUCLUZEAU,
J. FRENEY,
C. ROMOND,
H. LECLERC,
J.P. HORNEZ,
P. BORDIER,

Président
Rapporteur
Rapporteur
Directeur
Examinateur
Examinateur

A mes Parents,

A ma Famille,

A mes Amis,

A Monsieur le Professeur LECLERC,

Professeur de Bactériologie et Virologie.
Chef de Service du Laboratoire de Bactériologie au Centre
Hospitalier Universitaire de Lille.

Vous êtes l'inspirateur de cette étude, vous m'avez guidée et apporté votre aide précieuse lors de l'élaboration de ce travail. Tout au long de ces trois années, vous avez toujours su faire preuve à mon égard d'une grande bienveillance, de beaucoup de patience et d'une totale confiance. Que la soutenance de cette thèse soit pour moi l'occasion de vous remercier et vous exprimer toute mon admiration.

Aux Membres du Jury,

J'aimerais exprimer toute ma gratitude à Monsieur R. DUCLUZEAU, Directeur de Recherche et Président du Centre INRA à Jouy en Josas, qui me fait l'honneur de présider le jury de cette thèse.

J'adresse mes vifs remerciements à Monsieur le Professeur J. FRENEY, Laboratoire Central de Microbiologie à l'Hôpital Edouard Herriot à Lyon, et à Monsieur le Professeur C. ROMOND, Laboratoire de Bactériologie à la Faculté de Pharmacie de Lille, qui ont accepté la lourde tâche d'être rapporteurs de ce travail.

Je tiens à remercier Monsieur J.P. HORNEZ, Maître de Conférences à l'Université des Sciences et Techniques de Lille, et Monsieur P. BORDIER, Président de la Chambre Syndicale des Eaux Minérales, pour l'intérêt qu'ils ont porté à ce travail et leur participation au jury de cette thèse.

J'aimerais témoigner toute ma reconnaissance aux industriels des Sociétés des Eaux Minérales de Contrexeville, Evian, Perrier, Vittel et Volvic, qui ont oeuvré à l'élaboration de ce travail. Je les remercie pour l'intérêt constant qu'ils ont porté à cette étude et pour leur collaboration efficace et chaleureuse au cours de ces trois années.

Je tiens à remercier l'ensemble du personnel du service de Bactériologie de la Faculté de Médecine de Lille, pour leur accueil chaleureux.

J'exprime une reconnaissance toute particulière à Thérèse FASQUEL pour son aide précieuse et efficace tout au long de ce travail. Elle a su me faire bénéficier de sa grande expérience pratique dans la bactériologie des eaux, et a toujours fait preuve à mon égard d'une extrême gentillesse.

Je remercie également Annie DEVALCKENAERE et Sylvie ARMAND qui par leurs critiques amicales et constructives ont participé à l'élaboration de ce travail.

J'adresse mes plus vifs remerciements aux secrétaires, à Martine VERBRUGGHE et Christine SIMON qui m'ont rendu de nombreux services, et en particulier à Colette DECHY qui a eu la gentillesse de dactylographier cette thèse et dont le soutien moral m'a souvent encouragé.

INTRODUCTION

L'eau dans la nature n'est jamais totalement stérile. Dans la nappe souterraine des sources même les mieux protégées, l'eau en mouvement constant contient toujours en quantité variable mais limitée, un certain nombre de germes ne dépassant que rarement le nombre de 1 à 10 bactéries par millilitre. Lorsque cette eau est captée et mise en bouteilles, elle passe dans un système fermé en "vase clos". La flore s'y multiplie naturellement conformément à la physiologie des microorganismes qui la composent. Ce sont des bactéries oligotrophes, capables de se développer en présence de substances organiques à l'état de traces.

Le développement commercial tout à fait spectaculaire des eaux minérales naturelles depuis les années 1970 a nécessité la mise au point d'une réglementation sanitaire européenne, avec des implications d'ordre microbiologique. Les eaux minérales naturelles ne doivent subir aucun traitement qui pourrait les modifier physiquement, chimiquement et biologiquement, de manière à conserver leur pureté originelle et leur effet bénéfique sur la santé, cautionné par l'Académie de Médecine. Si leurs caractéristiques physico-chimiques sont bien connues, en revanche, les connaissances sur la flore autochtone restent limitées à ce jour. Les études menées depuis le début du siècle au sujet de la microbiologie des eaux minérales ont été tout naturellement orientées, comme dans le cas des autres produits alimentaires, vers la recherche des bactéries pathogènes ou de bactéries qui pourraient être des indices d'une pollution fécale de la source. Par contre, nos connaissances concernant la nature et l'évolution dans l'eau minérale de ces populations microbiennes dites banales sont restées très pauvres. Du point de vue taxonomique les bactéries de l'eau appartiennent principalement aux genres *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Flavobacterium*, *Alcaligenes*, c'est-à-dire à des populations encore mal connues, nécessitant de

nombreuses années d'étude avant que ne soit élaborée une classification acceptable. Dans ces conditions les moyens actuels d'identification phénotypique de la flore aquicole restent précaires et peu performants. Il n'est donc pas surprenant que le pourcentage de souches identifiées avec un haut degré de probabilité soit faible (aux environs de 50%).

Comme chaque espèce vivante possède des séquences nucléotidiques spécifiques qui la distinguent de toute autre espèce, la composition génétique de chaque microorganisme est par essence une clef que l'on peut employer pour son identification. L'utilisation de sondes nucléiques dans la détection de séquences génomiques spécifiques est l'une des possibilités offertes par les techniques du génie génétique.

Le développement de la biologie moléculaire a conduit à une nouvelle approche d'identification et de typage moléculaires universels: le profil de restriction des gènes rRNA d'*Escherichia coli*, outil utilisé dans de nombreuses études de taxonomie et d'épidémiologie moléculaires.

Il nous a semblé d'un grand intérêt d'appliquer cette nouvelle technique de typage moléculaire à l'étude de la flore bactérienne des eaux minérales naturelles. En effet, il apparaît essentiel aujourd'hui de bien connaître la flore de l'eau minérale commercialisée à des centaines de milliers de bouteilles par an. La composition biologique de l'eau, probablement aussi importante que la composition chimique est à la base de ses qualités originelles et naturelles.

L'objectif de ce travail est donc d'approfondir les connaissances sur la flore bactérienne de l'eau minérale, de mieux identifier les bactéries qui la

composent pour mieux les reconnaître, en faisant appel aux techniques actuelles de la biologie moléculaire. Nous étudierons les caractéristiques biologiques de chaque source et leur évolution dans le temps en se basant sur l'étude des marqueurs moléculaires que sont les profils de restriction des gènes ARNr. En appliquant cette nouvelle technique de typage moléculaire à l'étude de la flore bactérienne de cinq eaux minérales naturelles, il nous sera possible d'une part de savoir si les bactéries identifiées par leur profil de restriction des gènes sont représentatives des cinq sources ou si elles sont spécifiques de chacune d'elles, d'autre part de suivre ces bactéries au cours du temps en recherchant les profils de restriction des gènes qui les caractérisent au cours de l'échantillonnage.

Le premier chapitre, consacré à la revue bibliographique comportera deux parties :

- la première traitera du microbisme des eaux minérales, dont les aspects épidémiologique, écologique (concernant la flore bactérienne autochtone) et réglementaire seront successivement abordés ;
- la seconde, montrera l'intérêt qu'il y a à utiliser les profils de restriction des gènes ribosomiaux comme outil d'identification et de typage moléculaires, en se référant à la littérature scientifique.

Dans le deuxième chapitre intitulé "Matériel et Méthodes" les différents aspects pratiques de l'étude (échantillonnage, recueil des souches, techniques utilisées, etc...) seront abordés.

Le chapitre suivant sera consacré aux résultats obtenus pour les cinq sources, résultats qui feront l'objet de la discussion.

Dans la discussion, nous parlerons en particulier des limites de l'identification basée sur les caractères phénotypiques et discuterons des nouvelles données scientifiques sur la flore autochtone, obtenues grâce à l'étude des marqueurs moléculaires.

Enfin, la conclusion fera la synthèse de la discussion et ouvrira quelques perspectives.

REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

I. LE MICROBISME DES EAUX MINÉRALES NATURELLES

1. Aspect épidémiologique

Dans les siècles passés, les eaux de distribution souvent contaminées par les eaux usées urbaines ou industrielles, véhiculaient des germes pathogènes d'origine fécale de façon quasi permanente. Cette large diffusion était à l'origine d'épidémies soudaines et graves de fièvre typhoïde, de dysenterie bacillaire, de choléra. Depuis le début du siècle, le développement industriel et technologique a permis de purifier les eaux d'alimentation par filtration et stérilisation. La désinfection des eaux par le chlore a constitué un événement sans précédent du point de vue épidémiologique. Grâce à elle, des millions de vies humaines ont été préservées. L'usage des eaux minérales embouteillées, beaucoup plus récent, a connu un formidable essor à partir des années soixante-dix, date à laquelle le PVC (polychlorure de vinyle) a remplacé le verre (Leclerc, 1990a).

Dans le cas des eaux distribuées par réseau, si les grandes épidémies historiques du passé ont disparu grâce au traitement chloré, il n'en subsiste pas moins un risque résiduel de maladies (essentiellement gastro-entérites ou diarrhées) de nature le plus souvent bénigne et d'apparition aléatoire, lié à des causes technologiques (absence ou déficience de traitement, interconnection, siphonnage...). Le tableau 1 rappelle l'origine très diverse de ces infections le plus souvent épidémiques, mais qui pourraient selon de récentes enquêtes réalisées en France se manifester de façon endémique (Ferley et coll., 1986). La connaissance de ces événements épidémiques est particulièrement développée aux Etats Unis. Craun (1986) y a dressé un

**Tableau 1. Principales maladies d'origine hydrique
et leurs agents responsables (Leclerc, 1990a)**

Maladies	Agents
Origine bactérienne	
Fièvres typhoïdes et paratyphoïdes	<i>Salmonella typhi</i> <i>Salmonella paratyphi</i> A et B
Dysenterie bacillaire	<i>Shigella</i> sp.
Choléra	<i>Vibrio cholerae</i>
Gastro-entérites aiguës et diarrhées	<i>Escherichia coli</i> entérotoxigène <i>Campylobacter jejuni/coli</i> <i>Yersinia enterocolitica</i> <i>Salmonella</i> sp. <i>Shigella</i> sp.
Origine virale	
Hépatites A et E	Virus hépatites A et E
Poliomyélite	Virus poliomyélitique
Gastro-entérites aiguës et diarrhées	Virus de Norwalk Rotavirus Astrovirus Calicivirus Adenovirus
	autres virus : Enterovirus Coronavirus Reovirus Pestivirus Picobirnavirus Parvovirus Torovirus
Origine parasitaire	
Dysenterie amibienne	<i>Entamoeba histolitica</i>
Gastro-entérite	<i>Giardia lamblia</i> <i>Cryptosporidium parvum</i>

remarquable bilan statistique des épidémies d'origine hydrique survenues aux Etats Unis de 1920 à 1980. Par comparaison avec les eaux d'alimentation distribuées en réseau, les données épidémiologiques concernant les eaux minérales embouteillées sont pratiquement inexistantes. Elles sont pourtant impliquées au cours de la grave épidémie portugaise rapportée et analysée par Blake et coll. (1977) et qui a été responsable de 2467 cas documentés et de 48 morts. La plupart des provinces du pays (17/18) furent touchées. *Vibrio cholerae* était isolé dans 42% des coquillages analysés au cours de l'épidémie et l'enquête montrait que la consommation de ces coquillages, crus ou insuffisamment cuits, était significativement plus fréquente chez les malades que chez les témoins. Dans la ville de Faro, le même type d'enquête épidémiologique révélait que la consommation d'une eau minérale commercialisée était aussi significativement associée aux cas de maladie. Cette épidémie s'est déroulée en 1974, à une date où la réglementation européenne n'était pas encore définie ni appliquée. Il apparaît inconcevable en effet, compte-tenu de la sévérité des normes actuelles et dans la mesure où elles sont respectées, qu'un tel incident puisse se renouveler.

La présence de certaines espèces bactériennes comme *Legionella pneumophila*, *Pseudomonas aeruginosa* doit être analysée avec une certaine prudence. Depuis 1976, date à laquelle la maladie des légionnaires a été individualisée cliniquement au cours de la fameuse épidémie de Philadelphie, on s'est particulièrement intéressé à l'écologie des *Legionella* (Leclerc, 1986). Ce sont des bactéries thermophiles que l'on peut retrouver dans les eaux des stations thermales à des taux de 10^3 à 10^6 colonies par litre comme le signalent Bornstein et coll. (1987). Il apparaît donc clairement, que les dispositions concernant l'usage de l'eau minérale dans les stations thermales doivent être établies en tenant compte de ces incidences épidémiologiques.

Le risque éventuel dû à la présence de *Pseudomonas aeruginosa* doit être évalué avec le même souci, d'autant que le rôle entéropathogène de cette bactérie paraît, dans l'état actuel des connaissances, assez mal défini (Pollack, 1984). Masson et Michel (1978) ont montré que ce germe pouvait se multiplier abondamment dans les eaux minérales embouteillées, mais sa croissance serait en partie inhibée par la flore autochtone (Gonzalez et coll., 1987b). Veron (1989) cite une entérite d'origine hydrique dite fièvre de Shangaï, qui présenterait un tableau clinique de fièvre typhoïde et surviendrait de façon épidémique ; elle aurait été provoquée par de l'eau de boisson contaminée par *Ps. aeruginosa*.

Régulièrement, en fonction de l'évolution épidémiologique, les infectiologues et les hygiénistes s'interrogent sur tel ou tel microorganisme porteur de risque, sur leur origine et sur le rôle possible des eaux d'alimentation dans leur diffusion.

Aux alentours des années 1970, l'apparition de certains cas de méningo-encéphalites amibiennes primitives dues aux eaux de piscine ou de baignade a suscité des hypothèses sur la circulation de ces amibes dans les eaux. Le travail de Dive et coll. (1979) réalisé sur les eaux d'alimentation et les eaux embouteillées (y compris les eaux minérales naturelles) a permis de confirmer l'absence générale d'amibes pathogènes et la grande dispersion naturelle des amibes non pathogènes dans le milieu aquatique et dans les eaux d'alimentation. Plus récemment, après avoir observé la forte incidence des mycobactéries dans les eaux de distribution (57,4%) Caroli et coll. (1985) au cours de l'examen systématique des eaux minérales embouteillées, en isolent dans 10,7% des échantillons. Les auteurs considèrent que leur présence résulte d'une contamination accidentelle et qu'il ne peut être

question d'un risque pour le consommateur même hospitalisé ou immuno-déprimé.

2. La flore bactérienne autochtone

L'analyse microbiologique des eaux minérales à l'émergence a toujours révélé la présence de quelques bactéries cultivables (<10 ml⁻¹ d'eau). Après l'embouteillage ce taux évolue normalement pour atteindre en quelques jours selon les cas 10^3 à 10^5 bactéries par millilitre. Buttiaux et Boudier (1960) ont été les premiers à décrire ce phénomène, considéré depuis lors comme un phénomène biologique naturel (Schmidt-Lorenz, 1976 ; Leclerc et coll., 1985). Depuis, de nombreux auteurs ont étudié cette multiplication dans la bouteille des bactéries autochtones, banales, présentes au griffon (Moutoussis et coll., 1960 ; Buelhmann, 1970 ; Del Vecchio et Fischetti, 1972 ; Baldini et coll., 1973 ; Masson et Chavin, 1973 ; Delabroise et Ducluzeau, 1974 ; De Felip et coll., 1976) et plus récemment (Schwaller et Schmidt-Lorenz, 1980, 1981, 1982 ; Bischofberger, 1983 ; Gonzalez et coll., 1987a ; Oger et coll., 1987). Numériquement, la flore atteindrait un maximum au bout d'une semaine à un mois après l'embouteillage, régresserait lentement par la suite. Geldreich et coll. (1975) ont proposé de limiter cette croissance en stockant les bouteilles au froid (réfrigération). Il n'en est pas moins vrai qu'un faible taux de bactéries dans la bouteille pourrait indiquer la présence possible de substances toxiques dans l'eau (Geldreich et Clark, 1965).

Les niveaux atteints différeraient peu d'une source à l'autre, mais dépendraient plutôt du matériau (verre ou polychlorure de vinyle (PVC)), et surtout des conditions de dénombrement (milieu de culture, température et

durée d'incubation). Le déterminisme de la multiplication après embouteillage reste encore mal connu, mais par hypothèse, on pourrait admettre qu'il résulte simplement de l'incorporation dans les cellules bactériennes de la totalité ou de la subtotalité du carbone organique initialement présent dans l'eau (Van Der Kooij, 1990). L'apport d'oxygène dissous au soutirage ne serait pas déterminant (Ducluzeau et coll. 1977) et le relargage de substances organiques à partir du PVC ne semblerait pas significativement plus important qu'à partir du verre Pyrex (Barbesier, 1970; Fouassin et Liebens-Bisqueret, 1977). Si le verre lavé industriellement conduit à une flore un peu moins nombreuse (Del Vecchio et Fischetti, 1972; Baldini et coll., 1973 ; Masson et Chavin, 1973) ce serait plutôt semble-t-il, à cause de la persistance de traces inhibitrices provenant du nettoyage des verres recyclés (Machtelinckx, 1975 ; Bischofberger, 1983).

2.1. Croissance bactérienne et caractéristiques

Pour accroître leur masse et se multiplier, les bactéries doivent trouver dans l'eau minérale les éléments nutritifs nécessaires : une source d'énergie, une source de carbone, d'azote et des éléments minéraux : phosphore, soufre, potassium, magnésium, manganèse, fer, calcium, sodium... Les principaux types métaboliques sont définis classiquement en fonction des composés donneurs d'électrons et des composés accepteurs d'électrons. L'énergie des bactéries provient de l'oxydation des composés réduits (donneurs d'électrons) qui peuvent être organiques ou minéraux (hydrogène ou composés réduits de l'azote, du soufre, du fer ou du carbone). Si l'on analyse les constituants des eaux minérales naturelles, on observe que les donneurs d'électrons ne peuvent être que des substances organiques tandis que l'accepteur d'électrons ne peut être que l'oxygène. Les seules bactéries

susceptibles de se multiplier appartiennent donc aux organotrophes aérobies (Leclerc et Mossel, 1989). L'aliment organique, source d'énergie est en même temps la source de carbone obligatoire. De ce point de vue, les bactéries sont appelées hétérotrophes pour les opposer aux bactéries autotrophes qui, au contraire, peuvent utiliser le CO_2 de l'air, comme seule source de carbone pour leur nutrition. Les eaux minérales contenant très peu de matière organique, les bactéries qui s'y développent sont qualifiées d'oligotrophes, selon la définition de Kuznetsov et coll. (1979), la plus communément admise chez les microbiologistes (Morgan et Dow, 1986). Schmidt-Lorenz (1976) les qualifie d'oligocarbofiles, ou encore d'oligocarbotolérants puisque ces bactéries de l'eau sont aussi capables de se développer sur des milieux riches de laboratoire. Parmi les bactéries marines, Martin et MacLeod (1984) distinguent les bactéries oligotrophes qui ont une croissance lente lorsque les concentrations de nutriments sont basses, des bactéries "eutrophes" ou "copiotrophes" qui ne se développent qu'en présence de hautes teneurs en composés nutritifs mais qui peuvent survivre dans les conditions précédentes. Par ailleurs, les bactéries des eaux minérales ne nécessitant pas de facteurs de croissance pour leur développement sont qualifiées de prototrophes (Leclerc, 1990a).

Les souches possédant une vitesse de croissance lente à très lente sont majoritaires, ce qui constitue une caractéristique physiologique typique des bactéries isolées dans les eaux minérales (Schwaller et Schmidt-Lorenz, 1981). Le tableau 2 rappelle la définition de la vitesse de croissance proposée par ces auteurs.

Du point de vue de la température, toutes ces bactéries sont psychrotrophes, c'est-à-dire qu'elles peuvent se développer à des températures relativement basses de l'ordre de $+4^\circ\text{C}$ et que pour la plupart,

**Tableau 2. Temps nécessaire à la formation de colonies à 20°C
(Schwaller et Schmidt-Lorenz, 1981)**

	pour le développement primaire de colonies eau minérale --> agar	lors de repiquages ultérieurs après isolement agar-agar
croissance très lente	7 à 21 jours	4 à 7 jours
croissance lente	3 à 7 jours	2 à 4 jours
croissance normale	34 heures à 3 jours	1 à 2 jours
croissance rapide	jusqu'à 36 heures	jusqu'à 24 heures

leur température optimale de croissance se situerait aux environs de 28°C ; beaucoup d'entre elles sont incapables de se multiplier à +37°C, et à fortiori à +42°C (Richard et Morita, 1975 ; Schwaller et Schmidt-Lorenz, 1982).

L'adaptation des bactéries aux conditions spécifiques rencontrées en milieu aquatique se traduit également sur le plan morphologique. Schmidt-Lorenz et coll. (1990) ont montré que les bactéries se développant dans un milieu pauvre comme les eaux minérales sont de petite taille (1,4 x 0,2µm) par rapport aux mêmes bactéries cultivées dans des milieux classiques de laboratoire. Ce type de résultats a déjà été mis en évidence chez des bactéries d'eau de mer (Martin et Veldkam, 1978 ; Tabor et coll., 1981 ; Torella et Morita, 1981; Mac Donell et Hood, 1982). Parmi les bactéries marines, Sieburth (1979) a mis en évidence des formes cellulaires arrondies de petite taille, Dawson et coll. (1981) des formes naines et Morita (1975) des ultra-microbactéries. Ducluzeau et coll. (1976a) font remarquer que le taux maximum de bactéries dans les eaux minérales naturelles reste limité si on le compare à celui obtenu après croissance d'inoculum bactériens dans de très nombreux produits alimentaires. De telles populations bactériennes, de faible taille, atteignant des taux maximum inférieurs à 10⁶ bactéries/millilitre, n'entraînent la présence d'aucun trouble visible dans l'eau minérale (dans un bouillon de culture ordinaire, le trouble n'apparaît qu'à partir de 10⁷ bactéries par millilitre).

Le dénombrement des cellules bactériennes contenues dans l'eau minérale est habituellement réalisé sur des milieux gélosés dont la nature et les conditions d'incubation influenceront notablement sur le résultat (Stolp et Starr, 1981 ; Witzel et coll., 1982 ; Williams et coll., 1984). Les types de bactéries mises en évidence dépendent largement de la technique de culture et des

milieux utilisés. La méthode officielle (Anon, 1980, 1985) utilisant des milieux riches ensemencés en profondeur avec une incubation de 2 à 3 jours à 20-22°C ne permet pas d'isoler l'ensemble des bactéries viables présentes dans les eaux (Bischofberger et coll., 1990). Différents types de milieux peu concentrés ont été proposés pour l'étude des eaux de boisson (Collins et Willoughby, 1962 ; Strzelczyk et coll., 1967 ; Jones, 1970 ; Ruschke et Koehn, 1970 ; Means et coll., 1981 ; Fijksdal et coll., 1982).

Le milieu proposé par Reasoner et Geldreich en 1985, a constitué un progrès indiscutable dans ce domaine (Staley, 1985 ; Edberg et Smith, 1989). Le nombre de colonies observables étant de loin supérieur à celui obtenu avec tous les autres milieux décrits, le milieu de Reasoner et Geldreich semble être le plus approprié à l'étude de la flore des eaux de boisson, comme le montrent les études de Spino (1985), Korsholm et Sogaard (1987), et Morais et Da Costa (1990). Il est maintenant admis que l'utilisation de milieu de culture pauvre, ensemencé en surface, avec des temps d'incubation longs (14 à 20 jours) à une température de 20°C \pm 1°C, représentent les conditions de culture les mieux adaptées à l'étude de la flore aquicole (Jannasch, 1967, 1969, 1979; Bischofberger et coll., 1990).

Pourtant quelle que soit la qualité du milieu utilisé, il existe toujours un écart important, entre le nombre de colonies et le nombre de bactéries visibles en microscopie directe ou après coloration par des colorants fluorescents (acridine orange, DAPI, FIFT, etc..). Ce phénomène souvent rapporté, a été particulièrement analysé par Rasumov en 1932 et plus récemment par Overbeck en 1974. Il a été maintes fois signalé pour certains milieux aquatiques naturels, en particulier lacs (Rheinheimer, 1980) et océans (Jannasch et Jones, 1959) et semble être une caractéristique des eaux oligotrophes dont les eaux minérales font évidemment parties.

Dans la plupart des milieux aquatiques naturels, le taux de bactéries non cultivables peut dépasser 99%. Ces bactéries peuvent être mortes ou dormantes ou dans un état viable mais non cultivable (Colwell et coll., 1985). Ce type de situation (viable sans être cultivable) pourrait être assimilé aux stress qui rendent les bactéries incapables de se multiplier sur des milieux habituellement favorables (Kuznetsov et coll., 1979). La privation de nutriments (starvation) est une forme de stress pour les bactéries de l'eau (Roszak et Colwell, 1987). Les agressions physiques (température, radiations...) ou chimiques (pH, antibiotiques...) peuvent produire des altérations cellulaires ou moléculaires qui ne sont pas nécessairement fatales et même réparables dans certaines conditions. On les qualifie d'agressions subléthales. Ces bactéries qui sont viables (aptées à vivre) doivent être revivifiées pour se multiplier et former des colonies sur un milieu de culture (Leclerc, 1991). Les bactéries viables mais qui ne sont pas cultivables correspondent sans doute aux formes végétatives dormantes citées plus haut, caractérisées par leur petite taille (cellules naines, minicellules, ultramicrobactéries). Comme l'ont montré Oger et coll. (1987), il est possible de distinguer dans la flore bactérienne des eaux minérales, des cellules voire des minicellules visibles en épifluorescence, (viables ou non viables) déjà nombreuses à l'émergence (10^3 /millilitre), les cellules INT⁺ (aptées à réduire l'INT (2-(4-iodophenyl) - 3-(4nitrophenyl) - 5phenyl 2H tétrazolium) (Zimmermann et coll., 1978), qui seraient viables mais non nécessairement cultivables et apparaîtraient plus tardivement, à la fin de la première semaine d'embouteillage ($>10^4$ par millilitre), et enfin des cellules viables en gélose (cultivables) qui atteignent des taux de 10^3 à 10^5 par millilitre en des temps variables (1 à 6 semaines) selon les lots.

La présence de minicellules dans les eaux minérales au captage est un autre point commun à divers milieux oligotrophes. Ainsi, Tabor et coll. (1981) ont observé de telles minibactéries dans les grands fonds marins. Des formes cellulaires très petites ($< 0,1\mu\text{m}^3$) ont aussi été observées dans les eaux côtières (Ferguson et Rublee, 1976 ; Zimmerman, 1977) et dans certains lacs (Krambeck, 1978). Dans l'étude de Oger et coll. (1987), la fluorescence verte observée avec l'acridine orange fait penser qu'à l'émergence de l'eau minérale étudiée, les minicellules qui correspondent à des formes de survie à la raréfaction d'éléments nutritifs (Poindexter, 1981b), sont pauvres en ARN et donc probablement peu actives, mais qu'elles contiennent de l'ADN resté bicaténaire et pourraient encore se diviser (Hobbie et coll., 1977).

2.2. Aspect taxonomique

La classification des bactéries aquicoles et celle des eaux minérales en particulier ne pourra avancer qu'en fonction des progrès taxonomiques qui s'effectueront à l'intérieur des grands groupes (*Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Flavobacterium*, *Alcaligenes*, etc...) auxquels ces bactéries appartiennent.

En effet la taxonomie de ces grands groupes bactériens longtemps ignorés de la bactériologie médicale car considérés comme non pathogènes, reste encore très imprécise et souvent peu concordante d'un auteur à l'autre. La majorité des bactéries à Gram négatif du milieu aquatique n'a pas été étudiée ou est insuffisamment décrite (Reasoner et Geldreich, 1985). Ce sont souvent des bactéries à croissance lente, difficiles à identifier par les méthodes biochimiques classiques (absence de réaction ou réactions trop faibles pour être interprétées) (Spino, 1985). Quelques auteurs ont proposé différents systèmes simplifiés d'identification (Spino, 1985 ; Ward et coll.,

1986; Schmidt-Lorenz et coll., 1990). Cependant les moyens actuels d'identification restant précaires, il n'est pas surprenant alors, que le pourcentage des souches identifiées avec un haut degré de probabilité soit faible, aux environs de 50% (Leclerc, 1990a).

A la suite d'études réalisées par Ducluzeau (1976) et Ducluzeau et coll. (1976a, 1977), Schmidt-Lorenz (1976) et Schwaller et Schmidt-Lorenz (1981), il est possible de dresser un inventaire des principales espèces rencontrées dans les eaux minérales naturelles. Cette liste qui figure dans le tableau 3 est certainement incomplète, puisque la classification des bactéries aquicoles et celle des eaux minérales en particulier est encore peu avancée. Les principaux groupes bactériens présents (*Pseudomonas*, *Flavobacterium*, *Acinetobacter*, *Alcaligenes*) seraient communs à toutes les sources, leurs proportions respectives dans la flore représentant néanmoins d'après Schwaller et Schmidt-Lorenz (1981), une caractéristique de chaque source. Différentes études effectuées à l'émergence ou à l'embouteillage de l'eau minérale étudiée, en Espagne par Ramos-Cormenzana et coll. (1980), Mosso Romeo et coll. (1983), de la Rosa Jorge et coll. (1983), Quevedo-Sarmiento et coll. (1986), et Gonzalez et coll. (1987a), au Portugal par Manaia et coll. (1990) et Morais et Da Costa (1990), en Ouest Sibérie par Tronova (1984), en Suisse par Bischofberger (1983) et Bischofberger et coll. (1990), au Nigeria par Ogan (1992) confirment ces résultats. Dans l'étude de Quevedo-Sarmiento et coll. (1986) portant sur neuf sources d'eau minérale naturelle espagnole, deux groupes de bactéries sont majoritaires : les unes appartenant au genre *Pseudomonas* sp, les autres aux genres *Flavobacterium-Cytophaga-Flexibacter*. Le genre *Pseudomonas* apparaît également largement dominant

Tableau 3. Principales espèces bactériennes isolées dans les eaux minérales naturelles (Leclerc, 1990a)

. <i>Pseudomonas</i> , <i>Xanthomonas</i> et <i>Comamonas</i>	
Groupe ribonucléique I	
Sous groupe <i>aeruginosa</i>	
<i>Ps. fluorescens</i>	++++
<i>Ps. putida</i>	++
<i>Ps. chlororaphis</i>	++
Sous groupe <i>stutzeri</i>	
<i>Ps. stutzeri</i>	+
Sous groupe <i>alcaligenes</i>	
<i>Ps. alcaligenes</i>	+
<i>Ps. pseudoalcaligenes</i>	+
Groupe ribonucléique II	
<i>Ps. cepacia</i>	+
<i>Ps. pickettii</i>	+
Groupe ribonucléique III	
<i>Ps. acidovorans</i>	+
<i>Ps. testosteroni</i>	++
Groupe ribonucléique IV	
<i>Ps. diminuta</i>	++
<i>Ps. vesicularis</i>	++
Groupe ribonucléique V	
<i>X. maltophilia</i>	+
Espèces de position incertaine	
<i>Ps. paucimobilis</i>	++
<i>Ps. mesophilica</i>	+
<i>Ps. rubescens</i>	++
. Autres espèces et genres	
<i>Acinetobacter</i>	
<i>A. lwoffii</i>	++
<i>Alcaligenes</i>	
<i>A. xylosoxydans</i>	++
<i>A. piechaudii</i>	+
<i>Flavobacterium</i> sp.	+
<i>Agrobacterium</i> sp.	+

Légende : ++++ très fréquent, ++ assez fréquent, + rare

dans les travaux de Schmidt-Lorenz (1976), Mosso-Romeo et coll. (1983), de la Rosa Jorge et coll. (1983), Bischofberger (1983) et Tronova (1984). Dans la plupart des études, l'espèce *Pseudomonas fluorescens* est largement représentée, mais il est probable que l'ensemble désigné sous le nom de *Ps. fluorescens* comprend en réalité un grand nombre d'espèces génomiques nouvelles (Van Der Kooij, 1979). Si le genre *Acinetobacter* constitue une fraction importante de la flore bactérienne dans les travaux de Schmidt-Lorenz (1976), Bischofberger (1983), et Mosso-Romeo et coll. (1983), il est peu représenté ainsi que le genre *Alcaligenes* chez Quevedo-Sarmiento et coll. (1986). Gonzalez et coll. (1987a) sont les seuls à avoir mis en évidence des bactéries du genre *Caulobacter* sur l'ensemble de leur étude, portant sur trois marques d'eau minérale embouteillée. Le genre *Caulobacter*, peu commun dans les eaux minérales naturelles, avait déjà été mis en évidence dans des eaux oligotrophes de l'environnement. (Dow et Lawrence, 1980 ; Poindexter, 1981a).

2.3. Effet antagoniste

On a souvent comparé la flore autochtone de l'eau minérale aux communautés microbiennes de l'homme (biocénoses) qui peuplent naturellement l'intestin, la bouche, la naso-pharynx, la peau etc... Ces communautés sont étroitement dépendantes des tissus au niveau desquels elles se développent, et de leurs constituants. Elles occupent en quelque sorte le terrain et forment des barrières qui s'opposent à la pénétration des espèces étrangères éventuellement pathogènes. Ces effets de barrière ont été mis en évidence, puis largement décrits par Ducluzeau et Raibaud (1979) dans le cas particulier de la flore intestinale.

Sur la base de ce principe, Ducluzeau et coll. (1976c, 1984) ont réalisé un certain nombre d'expériences avec l'eau minérale de Vittel, qui servent de référence en la matière. En particulier, lorsqu'un inoculum d'*E. coli* est introduit dans ce milieu en présence de la flore autochtone, il perd sa viabilité beaucoup plus rapidement que dans le cas où la suspension bactérienne est inoculée dans l'eau à l'émergence stérilisée par filtration. Les auteurs montrent que cet effet antagoniste, est dû aux bactéries dominantes de la flore autochtone et plus précisément aux actions synergiques que peuvent exercer deux ou plusieurs souches de cette flore. Le mécanisme de cette action antagoniste pourrait être attribué à une substance inhibitrice, accumulée dans l'eau au cours des cycles successifs de croissance et de lyse des populations autochtones.

2.4. Pouvoir pathogène

Il peut paraître paradoxal de parler de pouvoir pathogène à propos de micro-organismes qui peuplent les eaux les plus pures, et qui se multiplient dans les milieux naturels conformément aux lois de la physiologie microbienne. D'après les connaissances que l'on possède des bactéries autochtones des eaux minérales, cette éventualité d'un risque biologique paraît peu probable. Leur métabolisme (oligotrophe) et leur nutrition (prototrophe) font qu'elles ne sont pas adaptées à vivre dans un organisme humain ou animal. Leur psychrotrophie (optimum de température de croissance : 25-30°C) les rend particulièrement vulnérables et rebelles à toute implantation sur un tissu humain (Delabroise et Ducluzeau, 1974 ; Ducluzeau, 1976). Le tube digestif, avec ses barrières naturelles (piège gastrique, mucus et muqueuse gastrique, motricité intestinale, cytoprotection intestinale), sa flore microbienne multiple et complexe exerçant des antagonismes puissants,

son tissu lymphoïde différencié et les mécanismes immunologiques généraux et locaux, se prête particulièrement mal à l'implantation de ces bactéries fragilisées et stressées.

Plusieurs études confirment précisément la haute improbabilité de ce type d'événement. Ducluzeau et coll. (1976b) ont montré que les bactéries autochtones présentes dans l'eau minérale de Vittel, étaient incapables de s'implanter et de se multiplier dans le tube digestif de souris axéniques. Les souches de *Pseudomonas* absorbées par les animaux tendent à disparaître des fèces plus rapidement que des spores de *Bacillus subtilis* utilisées comme marqueurs. Les auteurs notent une destruction partielle de ces populations viables. Certaines souches ne sont jamais retrouvées dans le fèces et il en est conclu qu'elles ont été totalement détruites.

La qualité de l'eau utilisée pour la préparation des biberons des nourrissons est reconnue par tous comme un choix essentiel. Autrefois, on utilisait des eaux minérales conditionnées en bouteille de verre. Depuis 1970, on a recours au conditionnement en PVC et certains se sont interrogés sur les modifications du microbisme qui pourraient en résulter et sur les effets de santé éventuels, en particulier chez les nourrissons. Pour répondre à cette question une étude clinique a été réalisée par Leclerc (1989) avec deux groupes de 30 nourrissons. L'un alimenté par du lait reconstitué avec de l'eau minérale "X" en flacons de PVC, l'autre par du lait reconstitué avec la même eau minérale naturelle pasteurisée (en flacons de verre). La méthode appliquée était celle du double insu. Les nourrissons choisis répondaient à des critères d'inclusion bien précis ; la diarrhée était définie selon les critères usuels : nombre de selles, consistance, odeur, retentissement sur le poids, notion d'hyperthermie. Au cours de cette enquête, sur 60 nourrissons, neuf ont présenté des signes de diarrhée tels qu'ils avaient été définis : cinq

d'entre eux avaient reçu l'eau conditionnée en bouteille de verre, quatre l'eau conditionnée en PVC. Il en a été conclu que le type de conditionnement, dans les conditions expérimentales de ce travail, n'avait pas d'incidence sur l'apparition de troubles diarrhéiques.

Les infections nosocomiales (contractées par les malades au cours de l'hospitalisation) surviennent de façon privilégiée chez les patients à haut risque infectieux, comme les immunodéprimés et sont dues pour leur grande majorité à des bactéries multirésistantes aux antibiotiques. Partant de ces données, certains auteurs comme Duquino et Rosenberg (1986), Rosenberg et Duquino (1989) se sont inquiétés de la résistance aux antibiotiques des bactéries autochtones des eaux minérales naturelles. Les mêmes interrogations avaient été posées 10 ans auparavant par Leclerc et coll. (1977) et Leclerc et Mizon (1978) à propos des eaux d'alimentation distribuées par réseau. Quoiqu'il en soit, cette question des bactéries des eaux minérales naturelles résistantes aux antibiotiques, ne présente pas de grand intérêt du point de vue de la santé publique. Ce sont des bactéries psychrotrophes incapables de s'implanter au niveau du tube digestif de l'homme et de rentrer en compétition avec des populations résidentes parfaitement adaptées (Ducluzeau, 1976). De plus, comme le fait remarquer Leclerc (1991), les infections nosocomiales sont principalement des infections urinaires, post-opératoires (infection de la paroi), respiratoires, des septicémies et rarement des infections du tube digestif, car même en cas de déficit immunitaire, de nombreuses barrières naturelles restent à franchir: piège gastrique, motricité et cyto protection intestinale, et surtout flore intestinale avec son potentiel d'interactions et d'antagonismes microbiens.

Au delà de ces études expérimentales et cliniques, depuis que les eaux minérales font l'objet d'une large exploitation commerciale et d'un contrôle

sanitaire (CEE), aucun fait ni aucun événement n'a été signalé ou décrit dans la littérature scientifique et médicale, mettant en cause le rôle de cette flore autochtone. En toute connaissance de cause, les législations et les experts ont défini, pour les eaux minérales naturelles, des normes dont la rigueur et la sévérité garantissent l'absence de risque pour le consommateur avec la plus haute probabilité (si l'on admet que le risque zéro n'existe pas).

3. Aspect réglementaire

3.1. Réglementation

Au niveau Européen, chaque état ayant sa propre législation et sa propre définition des eaux minérales naturelles, il était impératif qu'un rapprochement des législations soit établi, pour permettre leur exploitation et leur commercialisation. C'est l'objet de la Directive du Conseil des Communautés, parue au Journal Officiel des Communautés Européennes en date du 15 juillet 1986 (Anon, 1980).

On entend par "eau minérale naturelle", une eau bactériologiquement saine, au sens de l'article 5, ayant pour origine une nappe ou un gisement souterrain et provenant d'une source exploitée par une ou plusieurs émergences naturelles ou forées. L'eau minérale naturelle se distingue nettement de l'eau de boisson ordinaire :

- par sa nature, caractérisée par sa teneur en minéraux, oligo-éléments, ou autres constituants et, le cas échéant par certains effets,

- par sa pureté originelle,

l'une et l'autre caractéristiques ayant été conservées intactes en raison de l'origine souterraine de cette eau qui a été tenue à l'abri de tout risque de pollution.

Ces caractéristiques, qui sont de nature à apporter à l'eau minérale ses propriétés favorables à la santé, doivent avoir été appréciées :

- sur les plans : (1) géologique et hydrologique, (2) physique, chimique et physico-chimique, (3) microbiologique, (4) si nécessaire, pharmacologique, physiologique et clinique ;

- selon les critères énumérés à la partie II (prescription d'ordre géologique et hydrogéologique, physique, chimique et physico-chimique, microbiologique, clinique et pharmacologique ;

- selon les méthodes scientifiquement agréées par l'autorité responsable.

La composition, la température et les autres caractéristiques essentielles de l'eau minérale naturelle doivent demeurer stables dans le cadre de fluctuations naturelles ; en particulier, elles ne doivent pas être modifiées par les variations éventuelles de débit.

Au sens de l'article 5, on entend par microbisme normal d'une eau minérale naturelle, la flore bactérienne sensiblement constante constatée à l'émergence avant toute manipulation et dont la composition qualitative et

quantitative, prise en considération pour la reconnaissance de cette eau, est contrôlée par des analyses périodiques.

Il est particulièrement important de préciser le contenu de l'article 5 mentionné ci-dessus.

1. A l'émergence, la teneur totale en microorganismes revivifiables d'une eau minérale naturelle doit être conforme à son microbisme normal et témoigner d'une protection efficace de la source contre toute contamination. Elle doit être déterminée dans les conditions prévues à l'annexe 1 (à 20-22°C et à 37°C).

Après l'embouteillage, cette teneur ne peut dépasser 100 par millilitre à 20-22°C en 72 h sur agar-agar. Cette teneur doit être mesurée dans les 12 h suivant l'embouteillage, l'eau étant maintenue à 4°C à environ 1°C pendant cette période de 12 h.

A l'émergence, ces valeurs devraient normalement ne pas dépasser respectivement 20 par millilitre à 20-22°C en 72 h et 5 par millilitre à 37°C en 24 h, étant entendu que ces valeurs doivent être considérées comme des nombres guides et non comme des concentrations maximales.

2. A l'émergence et au cours de sa commercialisation, une eau minérale naturelle doit être exempte :

- de parasites et microorganismes pathogènes,
- d'*Escherichia coli* et d'autres coliformes et de streptocoques fécaux,
dans 250 millilitres de l'échantillon examiné,

- d'anaérobies sporulés sulfato-réducteurs, dans 50 millilitres de l'échantillon examiné,
- de *Pseudomonas aeruginosa*, dans 250 millilitres de l'échantillon examiné.

3. Sans préjudice des paragraphes 1 et 2 ainsi que des conditions d'exploitation prévues à l'annexe II, au stade de la commercialisation :

- la teneur totale en microorganismes revivifiables de l'eau minérale naturelle ne peut résulter que de l'évolution normale de sa teneur en germes à l'émergence,
- l'eau minérale naturelle ne peut présenter aucun défaut au point de vue organoleptique.

Il est tout aussi important de préciser que l'eau minérale naturelle ne doit subir aucun traitement correctif avant ou après son conditionnement comme le précise l'article 4 de la Directive. Cette exigence imposée par la loi a pour but d'éviter toute modification préjudiciable à leur valeur thérapeutique.

Une eau minérale naturelle, telle qu'elle se présente à l'émergence, ne peut faire l'objet d'aucun traitement ou adjonction autre que :

. la séparation des éléments instables, tels que les composés du fer et du soufre, par filtration ou décantation, éventuellement précédée d'une oxygénation, pour autant que ce traitement n'ait pas pour effet de modifier la composition de cette eau dans ses constituants essentiels lui conférant ses propriétés,

. l'élimination totale ou partielle de gaz carbonique libre par des procédés exclusivement physiques,

. l'incorporation ou la réincorporation de gaz carbonique dans les conditions prévues à l'annexe I, partie III.

En particulier, tout traitement de désinfection par quelque moyen que ce soit et, sous réserve du paragraphe I, l'adjonction d'éléments bactériostatiques ou tout autre traitement de nature à modifier le microbisme de l'eau minérale sont interdits.

L'eau minérale naturelle est un produit commercialisé, et pour permettre cette diffusion dans les meilleures garanties d'hygiène, le Codex Alimentarius (Anon, 1982) a proposé des spécifications qui sont rapportées en annexe.

3.2. Critères et Indicateurs microbiologiques

Deux types d'indicateurs microbiologiques témoignent d'une contamination et donc d'un risque éventuel pour le consommateur : (1) les indicateurs de contamination technologique concernant les bactéries contaminantes introduites dans l'eau au cours de son transport, de son stockage ou de son embouteillage et (2) les indicateurs de contamination fécale universellement utilisés dans le contrôle bactériologique de l'eau et des aliments (Leclerc, 1990b).

(1) Il est indispensable que les conditions d'exploitation et d'embouteillage évitent ou limitent dans toute la mesure du possible les contaminations de l'environnement (aérien). Ces contaminants sont capables

de se développer à la température de 42°C comme l'ont montré en Suisse Schmidt-Lorenz et Jaeggi (1983) et Schmidt-Lorenz et coll. (1987). Le tableau 4 extrait d'un travail de Leclerc et coll. (1985) illustre ce phénomène. Les espèces rencontrées peuvent être des moisissures ou des levures ; ce sont plus généralement des bactéries et surtout des bactéries à Gram positif des genres *Bacillus*, *Staphylococcus*, *Micrococcus*. Le contrôle interne de ces contaminants dans les eaux embouteillées serait certainement très utile pour valider les bonnes pratiques de fabrication.

La signification de la présence du bacille pyocyanique est plus complexe. Ce germe est un pathogène opportuniste pour certains malades à risque (Pollack, 1984) souvent responsable de diarrhée aiguë chez le nourrisson (Florman et Schifrin, 1950 ; Falcao, 1972). Brown (1968) et Gonzalez et coll. (1987b) ont montré qu'il pouvait survivre dans l'eau pendant plus d'un an. Son aptitude à se multiplier abondamment dans les bouteilles d'eau minérale dans des conditions qui ne sont pas bien précisées mais qui pourraient porter leur nombre jusqu'à 10^4 ou 10^5 bactéries/millilitre a été mise en évidence par Masson et Michel (1978). En conséquence, comme le prévoit la législation, la présence de *Pseudomonas aeruginosa* n'est admise dans aucun échantillon d'eau testé.

(2) La recherche d'indicateurs de contamination fécale s'est révélée essentielle au cours du temps pour évaluer la qualité de l'eau de boisson (Buttiaux, 1960 ; Leclerc, 1976 ; Schmidt-Lorenz, 1976). Il n'en est pas moins vrai que la connaissance de ces indicateurs (coliformes, streptocoques fécaux) a largement progressé au cours de ces vingt dernières années en particulier en ce qui concerne les coliformes (Brenner, 1984). Il serait

Tableau 4. Espèces bactériennes isolées à 42°C d'une eau minérale naturelle embouteillée (Leclerc et coll., 1985)

	Echantillon																								
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25
Nombre/1250ml	25	34	54	199	296	98	583	183	61	227	121	818	301	700	29	188	958	550	572	276	44	977	105	133	18
<i>Acinetobacter Lwoffii</i>		4	25							54		46		100											
<i>Pseudomonas</i> (non-pigmentés)		4	2				15		34			5		400											
<i>Flavobacterium</i>									5																
<i>Bacillus</i>		1	2	1			1		2	15	34		30						1			1			1
<i>Micrococcus</i>	1		4		12								6			2								1	
<i>Staphylococcus hominis</i>		5		24	10	3	98	8				14	19	10		71	240	130	20	55	5		30	6	4
<i>Staphylococcus warneri</i>	11	8	14	82	141	32	211	93		35	32	212	201	40	29	80	470	280	104	170	32	13	66	39	7
<i>Staphylococcus epidermidis</i>					78	53	177	25	19	56		468	75	120		34	248	135	447	20	5	957	4	39	
<i>Staphylococcus aureus</i>	13	4		23			81	48		1	39	46													

coupable pour l'hygiéniste de ne pas la prendre en considération. Toute cette problématique a été analysée récemment par Leclerc et Mossel (1989) et Leclerc (1990b). Elle conduit à relativiser les critères en fonction de leur signification. Ainsi les *Escherichia coli*, et d'une façon générale les coliformes thermotolérants sont des indicateurs représentatifs et significatifs. Au contraire, la présence des coliformes psychrotrophes qui végètent et prospèrent dans le milieu au même titre que beaucoup d'autres bacilles à Gram négatif comme les *Pseudomonas fluorescens*, est d'une signification tout à fait relative. Dans la réglementation Codex Alimentarius (Anon, 1982) cette différence de poids des indicateurs est prise à juste titre en considération. En fait toute présence suspecte d'un indicateur (ex. : coliformes) devrait faire l'objet d'une identification précise (au niveau espèce) selon les règles de la taxonomie moderne pour confirmer ou infirmer une contamination d'origine fécale.

Depuis l'existence de la réglementation européenne, aucun fait ni aucun incident de type épidémique, ou plus généralement de type infectieux lié à l'usage des eaux minérales embouteillées, n'a été signalé. Mais compte tenu de l'évolution épidémiologique analysée dans le premier paragraphe, il convient d'être vigilant quant à l'apparition de nouveaux risques. On doit en particulier surveiller très scrupuleusement la présence des indicateurs bactériens de contamination cités ci-dessus. Plusieurs études portant sur la qualité bactériologique des eaux minérales naturelles ont mis en évidence la présence en faible quantité de coliformes (Warburton et coll., 1986), de *P. aeruginosa* (Rivilla et Gonzalez, 1988 ; Manaia et coll., 1990 ; Ogan, 1992), ou de staphylocoques (Hunter et Burge, 1987), dans des bouteilles d'eau minérale commercialisées, les rendant impropres à la consommation.

II. LE PROFIL DE RESTRICTION DES GENES CODANT POUR LES ARN RIBOSOMAux : NOUVELLE METHODE D'IDENTIFICATION ET DE TYPAGE UNIVERSELS DES SOUCHES BACTERIENNES

1. L'identification bactérienne traditionnelle

L'identification d'une bactérie comporte avant tout, la détermination de ses noms de genre et d'espèce. L'espèce bactérienne est actuellement définie comme un groupe d'hybridation ADN-ADN (Wayne et coll., 1987). C'est-à-dire que, théoriquement l'ADN total d'une souche "inconnue" devrait être hybridé avec celui des souches types de la classification internationale pour permettre de déterminer son espèce génomique. Le degré d'homologie génomique entre deux souches bactériennes dépasse 70% si elles appartiennent à la même espèce. Il est généralement compris entre 30 et 50%, s'il s'agit de deux espèces du même genre. Il est souvent inférieur à 30% si les deux bactéries appartiennent à deux genres différents.

En fait, en pratique, l'identification des espèces repose encore sur des tests phénotypiques plus ou moins empiriques. Et, à l'heure actuelle, l'identification de certains groupes bactériens à croissance lente et à faible versatibilité métabolique (*Legionella*, *Campylobacter*, *Leptospira*..) est extrêmement difficile. Au sein de chaque espèce, il existe différents marqueurs épidémiologiques. Le typage des bactéries, c'est-à-dire l'identification de types à l'intérieur d'une espèce, est nécessaire à l'élucidation des épidémies.

Les marqueurs épidémiologiques classiques (biotypie, sérotypie, lysotypie et bactériocinotypie) ne sont utilisables que pour un nombre limité d'espèces bactériennes, pour lesquelles une longue phase de mise au point a été nécessaire (sélection d'antigènes, de souches bactériocinogènes, de phages, de souches sensibles ; préparation et absorption des sérums).

De plus, pour beaucoup d'espèces on n'a pas mis au point de système de typage "classique" approprié ou entièrement satisfaisant.

2. Approche moléculaire de l'identification bactérienne

Le développement de la biologie moléculaire a conduit à une nouvelle approche d'identification et de typage moléculaires universels, affranchie du processus de régulation qui altère la stabilité des marqueurs phénotypiques. Il s'agit de la détermination du profil de restriction des gènes codant pour les ARN ribosomaux de la bactérie à identifier, proposé pour la première fois en 1986 par Grimont et Grimont.

2.1. Les ARN ribosomaux chez la bactérie

2.1.1. Rôle dans la structure du ribosome

Le ribosome est un constituant bactérien majeur, impliqué dans le mécanisme de la traduction. Dans une bactérie en phase de croissance active, il peut y avoir jusqu'à 20.000 ribosomes par génome. Ils contiennent 10% des protéines bactériennes totales et représentent 80% de la masse totale de l'ARN cellulaire. Le nombre de ribosomes est en relation directe avec l'activité de synthèse protéique de la bactérie (Nomura et Post, 1980 ; Lewin, 1988).

Tous les ribosomes d'une bactérie sont identiques. Ils peuvent être dissociés en deux sous-unités, dont l'une est environ deux fois plus grande que l'autre. Chez *Escherichia coli*, les acides ribonucléiques ribosomaux (ARNr), désignés par leur constante de sédimentation (Svedberg ou S) ont été séquencés et la séquence en acides aminés de la plupart des protéines a été déterminée (Brosius et coll., 1981 ; Woese et coll., 1983 ; Noller, 1984 ; Lake, 1985).

La petite sous-unité (30S) est constituée de l'ARN 16S et de 21 protéines. La grande sous-unité (50S) contient l'ARN 23S, le petit ARN 5S et 31 protéines (tableau 5). A l'exception d'une protéine présente en quatre copies par ribosome, chaque protéine n'est représentée que par une copie. La configuration asymétrique du ribosome complet 70S est illustrée par la figure 1. Les ARN ribosomaux, liés aux protéines ribosomales au niveau de sites d'interactions spécifiques, peuvent être considérés comme le squelette de chaque sous-unité.

Les deux ARNr majeurs présentent un nombre élevé de bases appariées formant des structures secondaires spécifiques. Les sites de liaison des protéines sur l'ARNr ribosomal sont localisés au niveau de ces structures secondaires, souvent en épingle à cheveux, dont les branches contiennent des renflements non appariés (Edling et Bassel, 1980).

Le modèle habituel de l'ARN 16S d'*E. coli* est schématisé dans la figure 2. La molécule présente quatre domaines principaux dont moins de la moitié de la séquence est constituée de bases appariées. Les régions isolées en double hélice ont tendance à être courtes (inférieures à 8 paires de bases). Souvent les régions duplex ne sont pas parfaites et contiennent des renflements de bases non appariées.

Tableau 5. Le ribosome d'*E. coli* contient trois molécules d'ARN et 52 protéines (Lewin, 1988)

	Ribosome	Petite sous-unité	Grande sous-unité
Vitesse de sédimentation	70S	30S	50S
Masse (daltons)	2 520 000	930 000	1 590 000
ARN majeurs		16S = 1 541 bases	23S = 2 904 bases
ARN mineurs			5S = 120 bases
Masse d'ARN	1 664 000	560 000	1 104 000
Proportion d'ARN	66%	60%	70%
Nombre de protéines		21 polypeptides	31 polypeptides
Masse des protéines	857 000	370 000	487 000
Proportion des protéines	34%	40%	30%

Les protéines de la petite sous-unité sont numérotées S1-S21. Les protéines de la grande sous-unité sont numérotées L1-L34, en raison de quelques appellations initiales inappropriées.

Figure 1. Le ribosome 70S peut se maintenir par associations entre des régions particulières des deux sous-unités, comme le montrent ces deux images.
(Lewin, 1988)

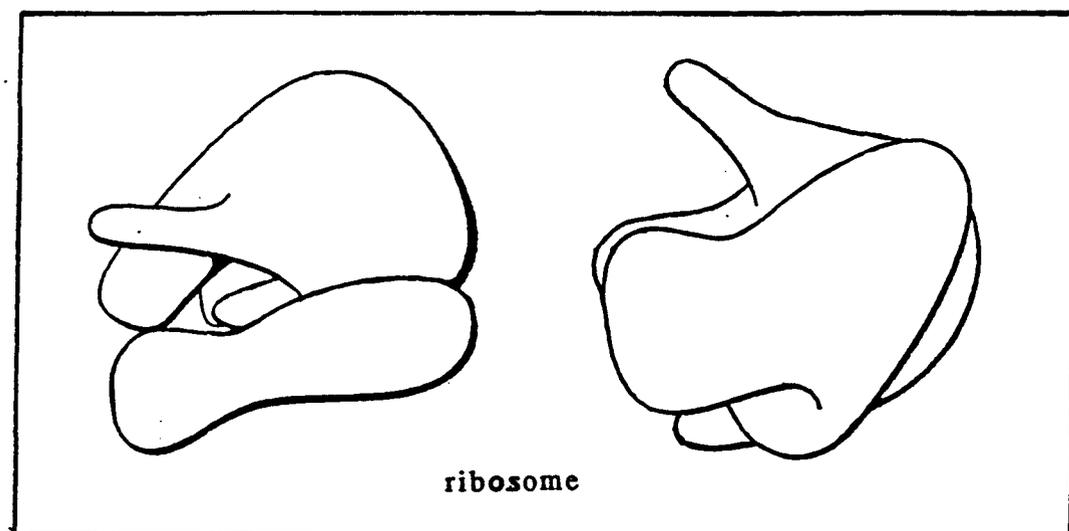
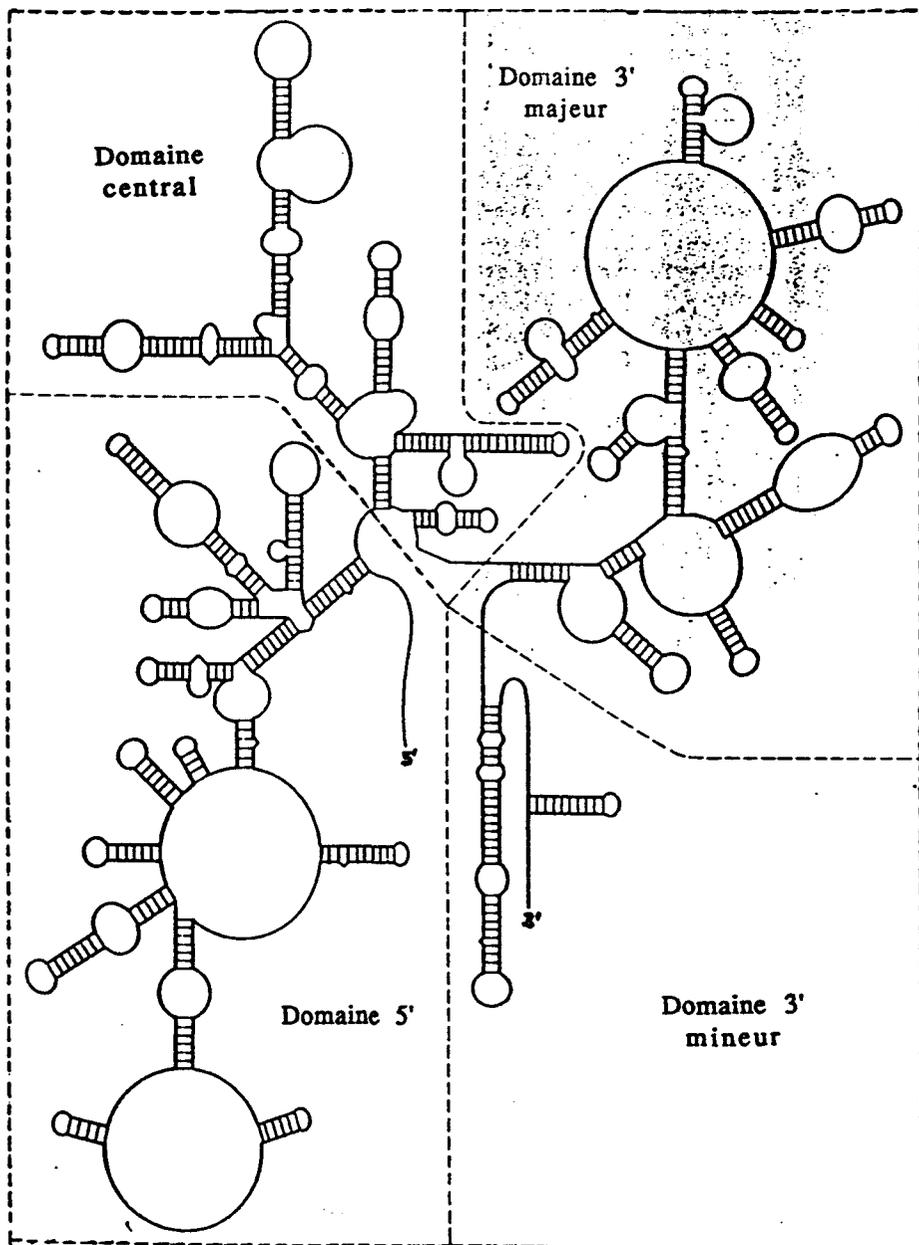


Figure 2. Les quatre domaines de l'ARNr 16S :
chacun contient plusieurs courtes
régions double-brin. (Lewin, 1988)



2.1.2. Organisation des gènes codant pour les ARN ribosomaux

Les ARN ribosomaux sont codés par des gènes multiples organisés en opérons. Ils représentent de loin le produit prédominant de la transcription puisqu'ils constituent 80 à 90% de la masse totale de l'ARN cellulaire chez les eucaryotes comme chez les procaryotes. Le nombre d'opérons codant pour l'ARNr varie de 7 chez *E. coli* (Kiss et coll., 1977) jusqu'à atteindre plusieurs centaines chez les eucaryotes supérieurs. Le nombre de ces copies est grossièrement corrélé à la taille du génome et à la vitesse de croissance des bactéries (Amikan et coll., 1984 ; Gottlieb et Rudner, 1985 ; Bercovier et coll., 1986 ; Lazo et coll., 1987). Ainsi, il n'y a qu'une copie chez les mycobactéries à croissance lente et chez certains mycoplasmes, deux copies chez les mycobactéries à croissance rapide et chez d'autres mycoplasmes, trois copies chez les *Brucella*, sept copies chez les entérobactéries et dix et onze copies chez les *Bacillus*.

Chez *E. coli*, les sept unités de transcription, appelées opéron *rrn* sont dispersées dans le génome.

L'absence de toute variation dans les séquences des molécules d'ARN implique que toutes les copies de chacun des gènes doivent être identiques, ou tout au moins doivent avoir des différences inférieures au seuil de détection dans l'ARN messager (qui est d'environ 1%).

Chaque opéron *rrn* est transcrit sous la forme d'un précurseur unique (ARN 30S) à partir duquel seront libérées par coupure, les molécules individuelles d'ARNr matures (Pace, 1973 ; Ginsburg et Steitz, 1975). L'enzyme responsable de la maturation chez la bactérie est l'ARNase III.

L'organisation globale des 7 opérons d'*E. coli* est la même (Brosius et coll., 1981) ; ils contiennent tous les 3 molécules d'ARNr, dans l'ordre 16S-23S-5S comme le montre la figure 3. La transcription est initiée à partir de 2 promoteurs P1 et P2 disposés en tandem (Young et Steitz, 1979) et s'achève au niveau des deux terminateurs t1 et t2. Le promoteur principal P1 est situé à environ 300 paires de bases en amont du début de la séquence de l'ARN 16S; à 110 paires de bases de P1 se trouve le second promoteur P2. Entre les séquences de l'ARN 16S et 23S se trouve une région intercalaire transcrite de 400 à 500 paires de bases codant pour un ou deux ARN de transfert (ARNt) (Morgan et coll., 1977). Dans certains opérons, on peut trouver des séquences d'ARNt supplémentaires situées à l'extrémité 3' (Morgan et coll., 1978).

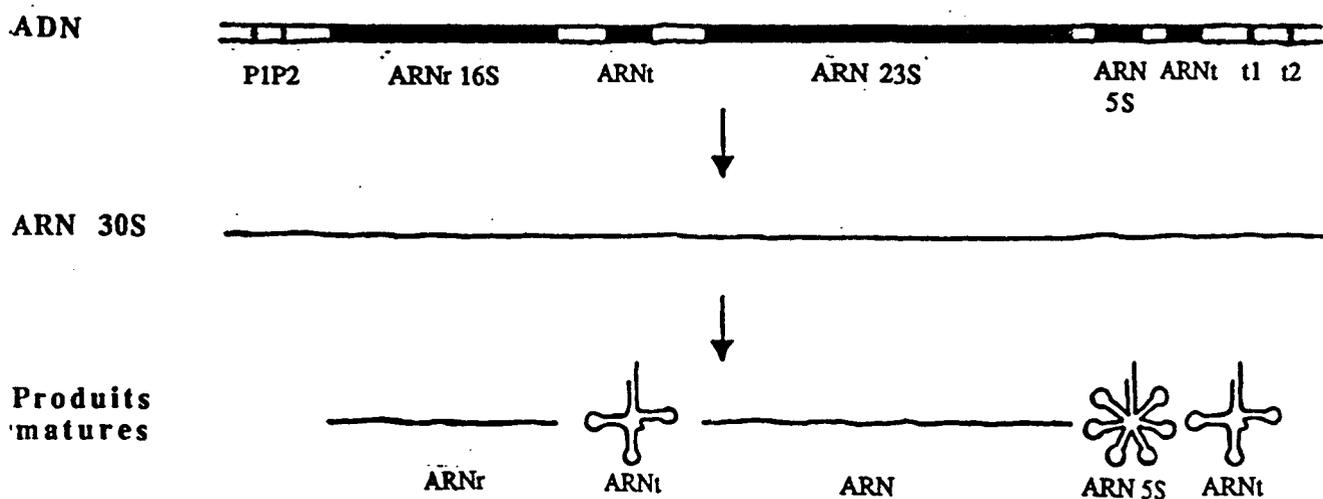
2.2. Les ARN ribosomaux comme sonde universelle

Les ARN ribosomaux sont universellement distribués: on les retrouve dans toutes les cellules vivantes chez lesquelles ils constituent l'élément clef de la synthèse protéique. Chez les procaryotes ils sont composés d'ARN 23S, 16S et 5S (Noller, 1984).

Ce sont des molécules qui ont peu varié au cours de l'évolution, beaucoup moins que l'ensemble des protéines. Leur séquence nucléotidique et leur structure secondaire apparaissent très conservées d'une espèce à l'autre. De même, leur fonction (rôle dans la structure et la fonction du ribosome) n'a pas évolué et est restée la même chez tous les organismes (Fox et coll., 1980 ; Olsen et coll., 1986). Il est généralement admis que les régions du génome les mieux conservées au cours de l'évolution, c'est-à-dire celles qui présentent un haut degré de similitude même entre des espèces phylogénétiquement éloignées, sont celles qui ont un rôle fonctionnel bien défini et stable.

Figure 3. Les opérons *rrn* contiennent à la fois les gènes de l'ARNr et de l'ARNt. (Lewin, 1988)

Chaque séquence fonctionnelle est séparée de la suivante par une région intercalaire transcrite; les longueurs des séquences leader et terminales dépendent des promoteurs et des "terminateurs" qui sont utilisés. Chaque produit ARN doit être libéré du transcrite au moyen de coupures de chaque côté.



Dans une même bactérie, les séquences ribosomales apparaissent presque toujours invariables bien que codées par plusieurs gènes. Au cours de l'évolution, il a donc fallu le maintien d'une pression sélective sur les multiples copies des gènes ribosomiaux, de manière à empêcher l'accumulation de mutations nuisibles.

Par ailleurs, d'un point de vue pratique, les ARN ribosomiaux présents en grande quantité dans toutes les cellules vivantes, peuvent être de ce fait facilement isolés et étudiés.

Pour toutes ces raisons, ils représentent un outil de choix pour les études phylogénétiques chez les procaryotes et les eucaryotes, études basées sur l'analyse comparée de leur séquence (Fox et coll., 1980 ; Stackebrandt et Woese, 1984 ; Olsen et coll., 1986 ; Pace et coll., 1986 ; Woese, 1987 ; Thompson et coll., 1988).

La phylogénie des êtres vivants peut être établie par la comparaison des séquences nucléotidiques de chaque catégorie d'ARN. Il existe des portions d'ARNr dont la séquence est identique chez tous les êtres vivants et, plus encore, chez toutes les bactéries (Fox et coll., 1980 ; Pace et coll., 1986 ; Woese, 1987). La conséquence est qu'un ARN 16S ou 23S d'une bactérie pourra s'hybrider avec le gène correspondant (après dénaturation de l'ADN) de n'importe quelle bactérie même phylogénétiquement éloignée (Grimont et Grimont, 1986). Une seule et même sonde marquée provenant d'*Escherichia coli* sera utilisable pour toutes les identifications (Stull et coll., 1988). L'identification repose sur le polymorphisme des fragments de restriction de l'ADN codant pour les ARNr : ainsi le nombre et la taille des bandes seront variables d'une espèce à l'autre.

En pratique, on observe que le profil de la souche à identifier est composé d'un nombre de fragments d'ADN égal ou supérieur au nombre de copies d'opérons situées sur le chromosome bactérien. En effet, puisque chez les procaryotes, les multiples opérons ribosomaux sont dispersés dans le génome, il est fort probable que ce dernier soit clivé au moins une fois entre chaque copie de l'opéron, générant un nombre de fragments hybridés au moins égal au nombre de copies de l'opéron du génome étudié. Si, en plus, le génome est coupé à l'intérieur de la séquence ribosomale, alors le nombre de fragments hybridés obtenus sera supérieur au nombre de copies de l'opéron. La taille des fragments dépend de la position des sites de restriction dans les diverses copies de l'opéron et à proximité immédiate (Grimont et Grimont, 1991).

3. Obtention des profils de restriction des gènes codant pour les ARNr

Les endonucléases de restriction reconnaissent des séquences très précises au niveau de l'ADN. Les opérons ARNr peuvent contenir des séquences reconnues par des endonucléases de restriction, ou avoir de telles séquences à proximité. Après clivage de l'ADN d'une bactérie par une enzyme de restriction, les fragments d'ADN obtenus sont séparés selon leur taille par électrophorèse en gel d'agarose, dénaturés et transférés à une membrane de nitrocellulose ou de nylon (par capillarité : méthode de Southern, 1975, ou par l'action d'une dépression : transfert sous vide) et enfin hybridés avec une sonde constituée d'ARN 16S et 23S selon les conditions physicochimiques optimales pour réaliser une hybridation ADN-ARN ou ADN-ADN (Grimont et

Grimont, 1991) (figure 4). Du fait de la conservation de la séquence de nombreuses portions de chaque sorte d'ARNr au cours de l'évolution, une seule sonde constituée d'ARNr d'une seule bactérie (par exemple *Escherichia coli*, comme le décrivent Stull et coll., 1988) pourra s'hybrider aux gènes correspondants de bactéries appartenant à n'importe quelle branche phylogénétique (Grimont et Grimont, 1986).

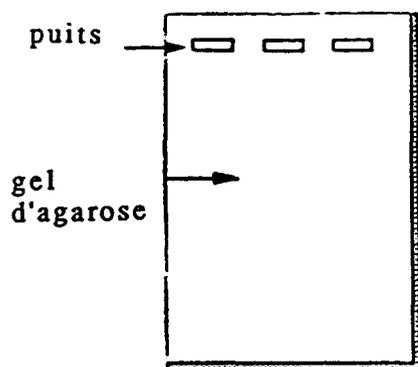
Cette sonde est marquée soit au phosphore radioactif par marquage terminal en 5', grâce à la polynucléotide kinase (Grimont et Grimont, 1986), soit par extension d'oligonucléotides non spécifiques utilisant la reverse transcriptase en présence de $\alpha^{32}\text{P}$ -dCTP (Picard-Pasquier et coll., 1989), soit à la biotine-11-dUTP (Pitcher et coll., 1987 ; Altwegg et Mayer, 1989), soit par une substance chimique, l'acétylaminofluorène (AAF), haptène détectable grâce à des anticorps monoclonaux couplés à une enzyme (Tchen et coll., 1984; Grimont et coll., 1989a), soit encore par couplage direct d'une enzyme détectée par chimioluminescence (Koblavi et coll., 1990 ; Gustafarro et Persing, 1992). Les gènes codant pour les ARN ribosomaux peuvent être clonés et utilisés comme sonde. Après lavage de la membrane, la révélation du marquage de la sonde permet de visualiser les fragments d'ADN portant des gènes (ou fragments de gènes) codant pour les ARN ribosomaux.

4. Applications des profils de restriction des gènes ARNr

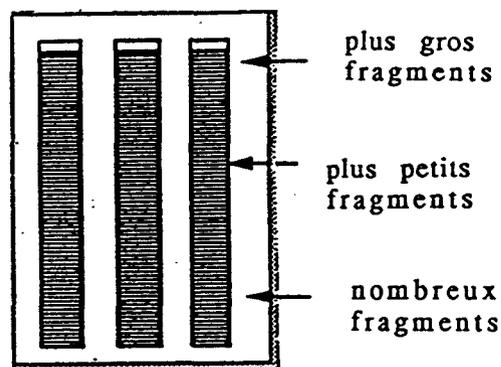
Cette méthode a, selon les groupes d'organismes étudiés, deux applications principales : l'identification lorsque les espèces sont génétiquement homogènes et le typage moléculaire lorsque les espèces sont

Figure 4. Profils de restriction des gènes ARNr
(Grimont et Grimont, 1991)

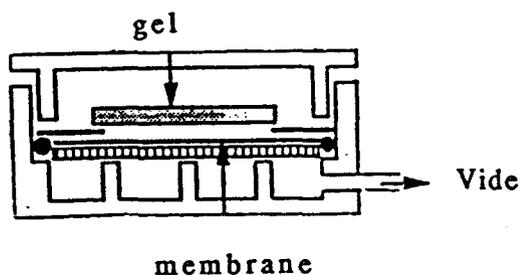
a) Dépôt dans des puits des ADN clivés par des endonucléases



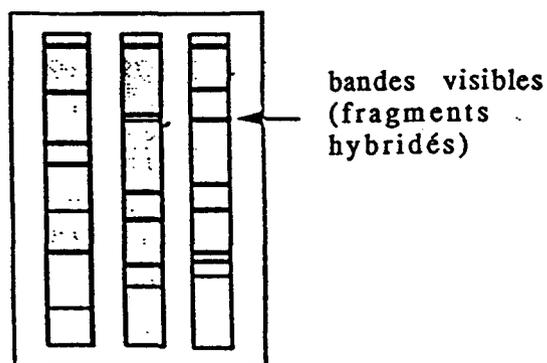
b) Séparation des fragments d'ADN par électrophorèse



c) Transfert sous vide des fragments sur une membrane de nylon



d) Hybridation avec l'ARN marqué et visualisation du marquage



- a) Dépôt dans des puits des ADN clivés par des endonucléases
- b) Séparation des fragments d'ADN par électrophorèse
- c) Transfert sous vide des fragments sur une membrane de nylon
- d) Hybridation avec l'ARN marqué et visualisation du marquage

génétiqnement hétérogènes. De nombreuses études taxonomiques et épidémiologiques portant sur des germes pathogènes d'un grand intérêt médical, ont bénéficié de cette technique. Le tableau 6 est un récapitulatif de l'ensemble des études citées ci-dessous.

4.1. Applications à l'identification d'espèces

Brucella

Certaines espèces bactériennes sont si homogènes génétiquement que toutes les souches de l'espèce donnent un seul profil de restriction des gènes ARNr : c'est l'exemple des *Brucella* qui ne constituent qu'une seule espèce génomique et ne peuvent pas être séparées par les profils de restriction des gènes ARNr (Verger et coll., 1987).

Legionella

Actuellement 28 espèces de *Legionella* et 43 sérotypes ont été caractérisés. Les propriétés biochimiques sont très pauvres et ne permettent pas une identification fiable de l'espèce. Les méthodes immunologiques, les plus souvent utilisées pour l'identification des *Legionella*, nécessitent l'obtention de 43 sérums (nombre en expansion constante) et sont parfois en défaut (réactions croisées, nouveaux sérogroupes). Grimont et coll. (1989b) ont appliqué la méthode des profils de restriction des gènes codant pour les ARNr 16S + 23S d'*E. coli* à l'étude taxonomique des *Legionella*. Chacune des 28 espèces existantes a été caractérisée par un profil spécifique pour chaque espèce. Saunders et coll. (1988) avaient obtenu des résultats comparables en utilisant une sonde ribosomale 16S + 23S de *L. pneumophila*.

Borrelia burgdorferi

Deux espèces génomiques ont été trouvées chez *Borrelia burgdorferi* responsable de la borréliose de Lyme, qui ne peuvent être identifiées que par les profils de restriction de gènes ARNr (Postic et coll., 1990). Le nombre et la taille des fragments de restriction de ces gènes suggèrent la présence d'une seule copie de gènes ribosomiaux chez *Borrelia*.

Providencia

Afin d'étudier la différenciation infraspécifique de *Providencia alcalifaciens*, Picard et coll. (1991) ont comparé le polymorphisme de l'ADN ribosomal aux résultats publiés sur le polymorphisme enzymatique et sur l'hybridation ADN/ADN. Cette corrélation a conduit à proposer la création de deux espèces dans *P. alcalifaciens*.

Yersinia

Picard-Pasquier et coll. (1990) ont montré que la classification interspécifique du genre *Yersinia*, basée sur l'étude du polymorphisme de l'ADN ribosomal, était en accord avec celle préalablement établie par Goaullet et Picard (1984) basée sur le polymorphisme enzymatique.

D'autres travaux, tels ceux de Romaniuk et Trust (1987) et Moureau et coll. (1989) sur le genre *Campylobacter*, ceux de Magee et coll. (1987) sur le genre *Candida*, et ceux de Yogev et coll. (1988) sur certaines espèces de mycoplasmes, ont utilisé l'approche ribotypique pour caractériser différentes espèces à l'intérieur du genre étudié.

4.2. Applications en épidémiologie

Haemophilus influenzae

Irino et coll. (1988) ont utilisé la technique des profils de restriction des gènes ARNr pour typer une centaine de souches de *Haemophilus influenzae* impliquées dans l'épidémie de fièvre purpurique brésilienne. Toutes les souches d'hémocultures, et les souches isolées de conjonctivites associées à la maladie, présentaient le même type de profil, qui est donc le type principal en cause dans cette maladie.

Salmonella

Altwegg et coll. (1989) ont fait appel à cette méthode pour typer des souches de *Salmonella typhi* responsables de fièvres typhoïdes. Ces souches, infectées par un phage commun, ne pouvaient être différenciées par la lysotypie, marqueur épidémiologique classique des *Salmonella*. Parallèlement, Martinetti et Altwegg (1990) ont montré que l'analyse génique ARNr est une méthode sensible et utile pour le typage épidémiologique de *Salmonella enteritidis*, méthode pouvant être complétée par l'analyse des plasmides quand ils sont présents.

Providencia

La technique des ribotypes a permis à Owen et coll. (1988) de typer 26 souches de *Providencia stuartii* isolées de différents hôpitaux du Royaume Uni, non différenciables par les techniques biochimiques classiques.

Shigella

Nastasi et coll. (1990) ont réalisé l'analyse moléculaire de souches de *Shigella boydii* de sérotype 2, isolées en Italie du nord à partir d'une épidémie

de dysenterie, et en Italie du sud à partir de cas d'infections apparemment non liées. Deux types de profils étaient mis en évidence: les cas d'infections à *Shigella boydii* de sérotype 2 survenus au cours de l'année de l'étude pouvaient donc être attribués à deux clones bactériens différents.

Vibrio cholerae

Les marqueurs épidémiologiques indispensables pour suivre la dynamique des épidémies de choléra sont actuellement insuffisants. Sont connus 2 biotypes (*cholerae* et *El Tor*), 3 sérotypes (Ogawa, Inaba, Hikojima) et 25 lysotypes instables. La méthode des profils de restriction des gènes ARNr a été appliquée à des souches d'Afrique et d'Asie (Koblavi et coll., 1990). Un total de 17 profils a été trouvé parmi 88 souches de *Vibrio cholerae* O1. Les biotypes *cholerae* (3 profils) et *El Tor* (14 profils) sont distingués. Ce travail jette un doute sur la notion de pandémie, puisque la dernière pandémie n'est pas due à la propagation d'un seul clone, mais est plutôt le résultat du chevauchement dans le temps d'épidémies dues à des clones différents.

Leptospira

Les leptospires sont actuellement subdivisés en 202 sérotypes. La détermination des sérotypes nécessite l'immunisation de lapins et des absorptions croisées (les réactions croisées entre sérotypes sont nombreuses) et demande un délai d'environ deux mois. Les hybridations ADN-ADN ont délimité 6 espèces, ce qui représente un nombre d'entités insuffisant pour une étude épidémiologique. La méthode des ribotypes a été appliquée à l'étude de 71 souches représentant 67 sérotypes (Pérolat et coll., 1990). Les 67 sérotypes se sont répartis en 50 profils de restriction différents. Ces données constituent la base d'un système de typage moléculaire pour le genre *Leptospira*.

Pseudomonas

Stull et coll. en 1988 ont été les premiers à montrer que les profils de restriction des gènes ARNr représentaient un moyen efficace pour le typage de *Ps. cepacia*. Un an plus tard, Rabkin et coll. (1989) ont comparé différentes méthodes de typage de *Ps. cepacia*, les mieux adaptées aux études épidémiologiques d'infections par ce germe. Ils conclurent que la ribotypie, associée à la sérotypie et à la biotypie, constituait le système de typage le plus performant.

Anderson et coll. (1991) et Lipuma et coll. (1988, 1991) ont analysé par cette approche, un ensemble d'isolats cliniques de *Ps. cepacia*, obtenus en particulier à partir de patients atteints de fibrose cystique.

Legionella

Van Ketel et de Wever (1989) ont étudié l'épidémiologie de *Legionella pneumophila* impliquée dans la maladie du légionnaire. Les isolats de patients hospitalisés dans le même établissement, en été, entre 1984 et 1987 présentaient le même profil que les souches de *L. pneumophila* isolées à partir des systèmes de refroidissement et d'air conditionné. Ces résultats mettaient en cause les systèmes d'aération de l'hôpital dans les infections nosocomiales à *Legionella pneumophila*.

Tram et coll. (1990) et Schoonmaker (1992) ont étudié de façon analogue, l'épidémiologie des infections nosocomiales à *L. pneumophila*, dans différents hôpitaux parisiens et américains.

Staphylococcus

Différentes équipes de recherche ont appliqué la technique des ribotypes à l'étude des staphylocoques, responsables de nombreux cas d'infections chez l'homme. De Buysier et coll. (1989) et Thomson-Carter et coll.

(1989) ont typé des souches de staphylocoques appartenant à des espèces différentes, et à l'intérieur de la même espèce. Chaque espèce était caractérisée par des types de profils différents. A l'intérieur de quelques espèces (*S. aureus* et *S. epidermidis*) des profils distincts mais présentant des bandes communes pouvaient être observés.

Bialkowska-Hobrzanska et coll. (1990), puis récemment Izard et coll. (1992) ont étudié par cette approche, des Staphylocoques coagulase-négatifs, principalement les *Staphylococcus epidermidis* impliqués dans des cas de péritonites chez des patients dialysés pour insuffisance rénale.

De leur côté, Prevost et coll. (1992) ont trouvé plus performante la technique des profils de restriction en champ pulsé par rapport à la ribotypie, dans l'étude des *Staphylococcus aureus* résistants à la méthicilline et responsables de nombreuses infections nosocomiales.

D'autres grands groupes bactériens, non cités ci-dessus, ont fait l'objet d'études épidémiologiques basées sur l'étude des ribotypes. Ce sont les cas d'*Escherichia coli* isolé de prélèvements urinaires parmi une population de femmes hospitalisées en gériatrie (Lipuma et coll., 1989), de *Pasteurella multocida* associée à des cas de choléra chez la volaille (Snipes et coll., 1989), et de *Bacteroides* responsable de troubles diarrhéiques chez l'homme et l'animal (Smith et Callihan, 1992).

Cette revue bibliographique sur les profils de restriction des gènes ARNr ne prétend pas dresser la liste exhaustive de l'ensemble des études taxonomiques et épidémiologiques publiées à ce jour. Elle rend néanmoins compte d'une large, constante et actuelle utilisation des profils de restriction des gènes ARNr dans le typage de souches appartenant à de grands groupes bactériens très divers. Il est à prévoir que cette méthode de typage

moléculaire pourra remplacer la sérotypie, la lysotypie, la bactériocinotypie et d'autres méthodes classiques et disparates. Cette évolution s'accélénera lorsque des automates pour la préparation de l'ADN (et autres manipulations techniques) et l'interprétation des profils de restriction après hybridation (comparaison avec des banques de données) seront performants.

Tableau 6. Tableau récapitulatif des différentes espèces microbiennes étudiées par ribotype

Espèces	Sondes	Enzymes de restriction	Références
I. Bactéries à Gram négatif			
1. Entérobactéries			
<i>Escherichia coli</i>	rRNA d' <i>E. coli</i>	EcoR I	Lipuma et coll. (1989)
<i>Pasteurella multocida</i>	rRNA d' <i>E. coli</i>	Sma I, Sal I EcoR I Pst I	Snipes et coll. (1989)
<i>Providencia alcalifaciens</i>	16S + 23S rRNA d' <i>E. coli</i>	EcoR I Hind III	Picard et coll. (1991)
<i>Providencia stuartii</i>	16S + 23S rRNA de <i>P. stuartii</i>	EcoR I Hind III	Owen et coll. (1988)
<i>Salmonella typhi</i>	plasmide pkk 3535 contenant les séquences complémentaires rRNA d' <i>E. coli</i>	EcoR I Sma I Pst I	Altwegg et coll. (1989)
<i>Salmonella enteritidis</i>	plasmide pkk 3535 contenant les séquences complémentaires rRNA d' <i>E. coli</i>	Sma I Sph I	Martinetti et Altwegg (1990)
<i>Shigella boydii</i>	16S + 23S rRNA d' <i>E. coli</i>	Bgl II, EcoR I	Nastasi et coll. (1990)
<i>Yersinia enterocolitica</i> <i>pseudotuberculosis</i> <i>intermedia</i> <i>aldovae</i> <i>frederiksensii</i> <i>kristentenii</i>	16S + 23S rRNA d' <i>E. coli</i>	EcoR I Hind III	Picard-Pasquier et coll. (1990)

Tableau 6. (suite)

Espèces	Sondes	Enzymes de restriction	Références
2. Non entérobactéries			
<i>Brucella melitensis</i> <i>abortus suis</i> <i>neotomae</i> <i>ovis</i> <i>canis</i>	16S + 23S rRNA d' <i>E. coli</i>	EcoR I Hind III Bam H I	Verger et coll. (1987)
<i>Pseudomonas cepacia</i>	rRNA d' <i>E. coli</i> et de <i>Ps. cepacia</i>	EcoR I	Stull et coll. (1988)
	rRNA d' <i>E. coli</i>	EcoR I	Rabkin et coll. (1989)
	rRNA d' <i>E. coli</i>	EcoR I	Anderson et coll. (1991)
	rRNA d' <i>E. coli</i>	EcoR I	Lipuma et coll. (1988, 1991)
<i>Legionella</i> (28 espèces)	16S + 23S rRNA d' <i>E. coli</i>	EcoR V Hind III	Grimont et coll. (1989)
	plasmide contenant les séquences complémentaires 16S + 23S rRNA de <i>L. pneumophila</i>	Nci I	Saunders et coll. (1988)
<i>Legionella pneumophila</i>	16S + 23S rRNA d' <i>E. coli</i>	EcoR I Hind III	Van Ketel et de Wever (1989)
	16S + 23S rRNA d' <i>E. coli</i>	Hind III	Tram et coll. (1990)
	16S + 23S rRNA d' <i>E. coli</i>	Hpa I EcoR I	Schoonmaker et coll. (1992)

Tableau 6. (suite)

Espèces	Sondes	Enzymes de restriction	Références
<i>Haemophilus influenzae</i>	16S + 23S rRNA d' <i>E. coli</i>	EcoR I EcoR V	Irino et coll. (1988)
<i>Vibrio cholerae</i>	16S + 23S rRNA d' <i>E. coli</i>	Bgl I	Koblavi et coll. (1990)
<i>Leptospira</i> (différentes espèces)	16S + 23S rRNA d' <i>E. coli</i>	EcoR I	Perolat et coll. (1990)
<i>Borrelia burgdorferi</i>	16S + 23S rRNA d' <i>E. coli</i>	EcoR I EcoR V Hind III Pst I	Postic et coll. (1990)
<i>Bacteroides</i> sp.	rRNA de <i>B. fragilis</i>	EcoR I Pst I	Smith et Callihan (1992)
<i>Bacteroides fragilis</i>	plasmide pkk 3535 contenant les séquences complémentaires rRNA d' <i>E. coli</i>	Hind III Bam HI	
<i>Campylobacter jejuni</i> et autres espèces	16S rRNA de <i>Campylobacter</i>	EcoR V Rsa I	Romaniuk et Trust (1987)
<i>jejuni</i> <i>coli</i> <i>laridis</i> <i>fetus</i> <i>upsaliensis</i>	16S rRNA de <i>Campylobacter</i>	Xho I Bgl II	Moureau et coll. (1989)

Tableau 6. (suite)

Espèces	Sondes	Enzymes de restriction	Références
II. Bactéries à Gram positif			
<i>Staphylococcus</i> (12 espèces)	plasmide contenant les séquences complémentaires 16S rRNA de <i>Bacillus subtilis</i>	Hind III EcoR I	Debuyser et coll. (1989)
(7 espèces)	rRNA d' <i>E. coli</i>	Hind III EcoR I	Thomson-Carter et coll. (1989)
<i>Staphylococcus aureus</i>	16S + 23S rRNA d' <i>E. coli</i>	Cla I EcoR I Hind III	Prevost et coll. (1992)
Staphylococoques coagulase négatifs	16S + 23S rRNA	Cla I Hpa I	Bialkowska-Hobrzanska et coll. (1990)
	16S + 23S rRNA d' <i>E. coli</i>	EcoR I Hind III	Izard et coll. (1992)
III. Autres groupes microbiens			
<i>Candida albicans</i>	plasmide contenant les séquences complémentaires 17 S + 23S rRNA de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	EcoR I	Magee et coll. (1987)
<i>Mycoplasma hominis pneumoniae</i>	plasmide pMC5 contenant les séquences complémentaires 16S + 23S rRNA de <i>Mycocapricolum</i>	EcoR I Pst I	Yogev et coll. (1988)

MATERIEL ET METHODES

I. MATERIEL

1. Souches bactériennes

Cinq eaux minérales parmi les plus importantes sources françaises, appelées A, B, C, D et E ont été étudiées. A, B, C et D sont des eaux minérales naturelles non gazeuses ; E est une eau minérale naturelle gazeuse.

Toutes les souches de l'étude proviennent de l'émergence de chacune des sources. Elles ont été isolées au griffon par chaque société, puis transmises par colis postal à notre laboratoire.

2. Milieu de culture et réactifs

Le milieu de culture utilisé est le milieu Reasoner (Reasoner et Geldreich, 1985) relativement pauvre, recommandé pour l'étude de la flore bactérienne hétérotrophe des eaux de boisson.

Deux types de milieu sont utilisés : les milieux R₂A et R₃A. Le milieu R₃A est deux fois plus concentré que le milieu R₂A sauf pour le pyruvate de sodium. La composition détaillée des milieux R₂A et R₃A ainsi que de l'ensemble des réactifs utilisés est précisée en annexe.

II. METHODES

1. Echantillonnage

Six séries de prélèvements ont été réalisées tous les 2 mois de septembre 1989 à septembre 1990. Chaque série comprenait deux échantillons (α , β) de un litre. L'échantillon α était stocké durant 3 jours à la température de $20^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$. L'échantillon β était conservé durant 20 jours dans les mêmes conditions de température. Ce double mode de stockage était en principe destiné à recueillir une plus grande diversité de souches et d'espèces.

2. Recueil des souches

Le recueil des souches a été réalisé au niveau de chaque société selon le protocole suivant :

- Prélever aseptiquement 2 fois 1 litre d'eau à l'émergence dans un flacon de verre (de préférence Pyrex), lavé au mélange sulfochromique, stérile, bouché émeri de préférence, soit un échantillon α et un échantillon β .
- Stocker l'échantillon α à la température du laboratoire (20°C) durant 3 à 5 jours.
- Stocker l'échantillon β à la température du laboratoire (20°C) durant 20 à 30 jours.
- Isoler sur milieu Reasoner (R₂A) par étalement de 0,1 millilitre.
- Incuber à $20^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ pendant 14 jours.
- Répéter l'opération 5 fois, soit sur 0,5 millilitre.

- Retenir toutes les colonies considérées comme différentes sur la base de leurs caractères morphologiques.

- Sélectionner au maximum 10 colonies différentes morphologiquement (aspect, couleur, consistance, forme, etc...)

- Les souches sont cultivées sur milieu Reasoner (R₃A), soit en gélose inclinée, soit en piqûre en culot, étiquetées et envoyées à notre laboratoire pour l'étude.

3. Culture bactérienne

La culture bactérienne se fait en boîtes de Pétri sur milieu Reasoner R₃A à une température de 20°C pendant 48 heures à 7 jours.

4. Identification basée sur des caractères phénotypiques

Les souches ont été identifiées selon les méthodes bactériologiques classiques.

Une série de tests phénotypiques a été réalisée :

- Coloration de Gram (coloration au violet de gentiane, solution iodo iodurée de lugol et fushine).

- Etude du type respiratoire sur milieu "Hugh et Leifson" (Hugh et Leifson, 1953). Les bactéries sont inoculées par piqûre centrale dans le culot d'un milieu solidifié "Hugh et Leifson" contenant du glucose. Après culture de

24 heures, plusieurs aspects peuvent être observés en fonction de l'activité oxydante, fermentante, alcalinisante ou inerte du germe.

- Test à l'oxydase mettant en évidence la présence d'une cytochrome oxydase dans le système enzymatique du germe (Kovacs, 1956 ; Gadberry et coll., 1980).

- Test de mobilité (Buttiaux et coll., 1974). Le germe est ensemencé par "piqûre" dans une gélose molle. Il est dit mobile s'il y a diffusion autour de la piqûre.

- Etude de la fermentation des sucres (lactose et glucose) sur milieu de Kligler. La colonie est repiquée sur un tube de milieu de Kligler, en strie centrale droite sur la tranche, puis en piqûre profonde dans le culot. La fermentation du lactose est lue sur la tranche : lactose + = jaune, lactose - = rouge. Celle du glucose est lue dans le culot : glucose + = jaune, glucose - = rouge (Buttiaux et coll., 1974).

- Test de pigmentation sur milieux de King (King et coll., 1954). Le milieu King A favorise la production de pyocyanine ou pigment bleu. Le milieu King B favorise la production de pyoverdine ou pigment vert.

L'identification au niveau de l'espèce est réalisée à l'aide des galeries API 20 NE (API system ; S.A. La Balme-les-Grottes, France). Il s'agit d'un système standardisé combinant 8 tests conventionnels et 12 tests d'assimilation pour l'identification des bacilles à Gram négatif, non entérobactéries, principalement composés des genres suivants :

Pseudomonas, *Acinetobacter*, *Flavobacterium*, *Moraxella*, *Aeromonas*, etc...
(Geiss et coll., 1985 ; Peladan et Monteil, 1988).

Les bactéries non identifiées (pourcentage d'identification < 80%) ont été classées dans le groupe des souches non identifiées. Les souches non identifiées mais élaborant le pigment fluorescent ont été classées parmi les *Pseudomonas* sp. (à pigment fluorescent).

5. Technique des profils de restriction des gènes codant pour les ARN ribosomaux

Parmi les 460 bacilles à Gram négatif étudiés en phénotypie, 208 ont été tirés au sort pour l'étude des profils de restriction des gènes.

5.1. Extraction et purification de l'ADN bactérien

Le tapis bactérien provenant de 5 à 8 boîtes de Pétri est récolté puis lavé trois fois dans une solution saline d'EDTA pH 8. Le culot bactérien obtenu est pesé (poids moyen 0,3g) et peut être conservé au congélateur à -20°C.

Lyse bactérienne :

La méthode utilisée est celle de Beji et coll. (1987) consistant en une lyse alcaline en présence d'un détergent, le dodecyl sulfate de sodium (SDS). Pratiquement, le culot bactérien (d'environ 0,3g) est remis en suspension dans 500µl de solution saline EDTA pH 8. On ajoute alors 3 millilitres de soude (NaOH 0,03N) fragilisant les parois bactériennes. On laisse agir quelques minutes puis on ajoute 500µl de SDS 25%. On agite doucement jusqu'à l'obtention d'une solution visqueuse caractéristique de la lyse. Rapidement on

neutralise en ajoutant 10 millilitres de solution EDTA pH 7 afin d'éviter une dénaturation de l'ADN par la soude (l'EDTA inhibe l'action des DNases libérées lors de la lyse en complexant les ions magnésium nécessaires à leur action).

Déprotéinisation :

Le lysat est traité à la pronase E (800 μ l de pronase E à 0,2%) pendant 1 heure à 37°C. On réajuste la salinité à 1M avec une solution de NaCl 5M (1/5 du volume total) puis on ajoute un volume équivalent de mélange chloroforme - alcool isoamylique (24/1, V/V). On agite doucement jusqu'à l'obtention d'une suspension laiteuse, puis on centrifuge le mélange pendant 15 minutes à 10.000t/mn. La phase aqueuse supérieure, contenant les acides nucléiques, est récupérée et précipitée dans deux fois son volume en alcool absolu conservé à -20°C. L'ADN précipité, récupéré soit par enroulement autour d'une tige de verre, soit par centrifugation, puis séché, est dissous dans 5 millilitres d'une solution de SSC 0,01M.

Action de la RNase :

L'ARN contaminant est éliminé par l'action de la RNase pancréatique à une concentration finale de 53 μ g/millilitre. On laisse incuber 30 minutes à 60°C puis on renouvelle l'étape de déprotéinisation comme précédemment. L'ADN est ensuite précipité dans deux fois son volume en alcool isopropylique, puis dissous une nuit dans une solution de SSC 0,1M..

La pureté de l'ADN est vérifiée en mesurant les rapports d'absorption 260/280 et 260/230 qui doivent être respectivement au moins égaux à 1,8 et 2 selon Marmur (1961).

La concentration de la solution d'ADN est estimée par photométrie. Une unité de densité optique à 260nm correspond à une solution d'ADN double-brin à 50 μ g/millilitre.

5.2. Digestion des ADN chromosomiques

20 enzymes de restriction commercialisées par Gibco-BRL avec leur tampon de digestion respectif ont été testées (tableau 7). Le choix s'est porté sur l'enzyme PvuII capable de digérer efficacement l'ADN de 7 espèces parmi les plus représentatives des eaux minérales.

L'ADN bactérien (2 μ g) est digéré pendant 2 heures à 37°C dans le tampon de digestion adéquat.

5.3. Electrophorèse en gel d'agarose

Le gel contenant 0,7% d'agarose est placé en position horizontale et immergé dans du tampon Tris Borate EDTA (TBE), comme le décrivent Maniatis et coll. (1982). Les hydrolysats d'ADN, additionnés du tampon de dépôt (1/10 du volume total), sont déposés dans les puits du gel et séparés en fonction de leur poids moléculaire au cours d'une électrophorèse de 16 heures à 15 volts.

Pour visualiser les fragments d'ADN, on plonge le gel dans une solution de bromure d'éthydium (BET). Le BET s'intercale entre les bases des acides nucléiques, donnant une fluorescence orange sous rayons ultra-violet (UV). Les bandes d'ADN sont alors visualisées sous UV et photographiées avec un appareil Polaroid. Les films utilisés sont des films Polaroid 667 (positif seul) et 665 (positif + négatif).

Tableau 7. Liste des enzymes de restriction testées

Enzyme de restriction	Tampon d'incubation	Conditions d'incubation
BamH1 isolée de <i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	R1	2 heures à 37°C
BglI isolée de <i>Bacillus globigii</i>	R2	2 heures à 37°C
BstEII isolée de <i>Bacillus stearothermophilus</i>	R2	2 heures à 60°C
CfoI isolée de <i>Clostridium formicoaceticum</i>	R1	2 heures à 37°C
ClaI isolée de <i>Caryophanon latum</i>	R1	2 heures à 37°C
EcoRI isolée d' <i>Escherichia coli</i> Ry13	R3	2 heures à 37°C
EcoRII isolée d' <i>Escherichia coli</i> R245	R6	2 heures à 37°C
HaeII isolée de <i>Haemophilus aegyptius</i>	R2	2 heures à 37°C
HincII isolée de <i>Haemophilus influenzae</i> Rc	R4	2 heures à 37°C
HindIII isolée de <i>Haemophilus influenzae</i> Rd	R2	2 heures à 37°C
KpnI isolée de <i>Klebsiella pneumoniae</i>	R4	2 heures à 37°C
MboI isolée de <i>Moraxella bovis</i>	R2	2 heures à 37°C
PstI isolée de <i>Providencia stuartii</i>	R2	2 heures à 37°C
PvuII isolée de <i>Proteus vulgaris</i>	R6	2 heures à 37°C
SaII isolée de <i>Streptomyces albus</i> G	R10	2 heures à 37°C
Sau3A isolée de <i>Staphylococcus aureus</i>	R4	2 heures à 37°C
SmaI isolée de <i>Serratia marcescens</i>	R4	2 heures à 30°C
SstI isolée de <i>Streptomyces stanford</i>	R2	2 heures à 37°C
SspI isolée de <i>Sphaeratilus</i> sp.	R6	2 heures à 37°C
XhoI isolée de <i>Xanthomonas campestris</i>	R2	2 heures à 37°C

Le marqueur de poids moléculaire "1Kb ladder", commercialisé par Gibco-BRL, est déposé sur chaque gel, de manière à pouvoir évaluer la taille des bandes en kilobases.

5.4. Transfert

Le transfert du matériel génétique du gel d'agarose sur la membrane de nylon (Hybond N, Amersham) se fait sous vide, en utilisant l'appareil de transfert "Vacugene 2016" (LKB Pharmacia) (figure 5). La méthode classique de Southern (1975) utilisant le transfert par capillarité a été modifiée.

La membrane de nylon est immergée dans du SSC 2X puis placée sur le support poreux de l'appareil. Un cache plastique est déposé autour de la membrane pour permettre de réaliser le vide. Le gel est déposé sur l'ensemble et la pompe à vide est mise en marche.

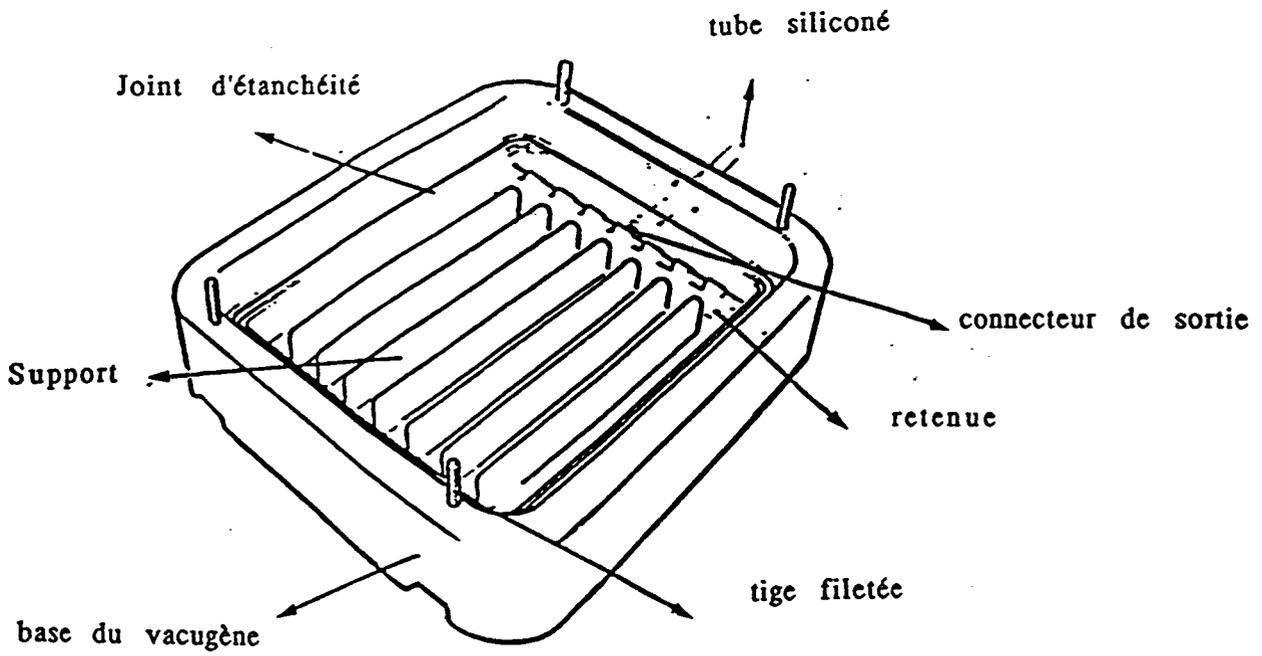
Les étapes de prétransfert sont réalisées au sein de l'unité de transfert en recouvrant successivement le gel par les différentes solutions.

Elles consistent en :

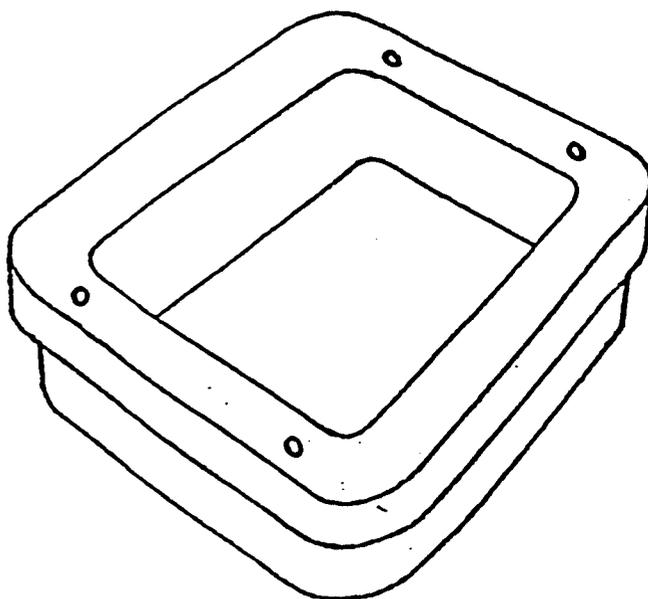
- une dépurination par une solution de HCl 0,25N pendant 20 minutes. Cette étape permet d'optimiser le transfert, en cassant les fragments d'ADN de haut poids moléculaire.

Figure 5. Description du système de transfert sous vide
VACUGENE 2016

Base de l'appareil



Cadre supérieur



- une dénaturation de 20 minutes afin d'obtenir une dissociation des doubles brins d'ADN. Cette étape est essentielle puisque seuls les fragments simple-brin se fixent sur le support solide.

- une neutralisation de 20 minutes.

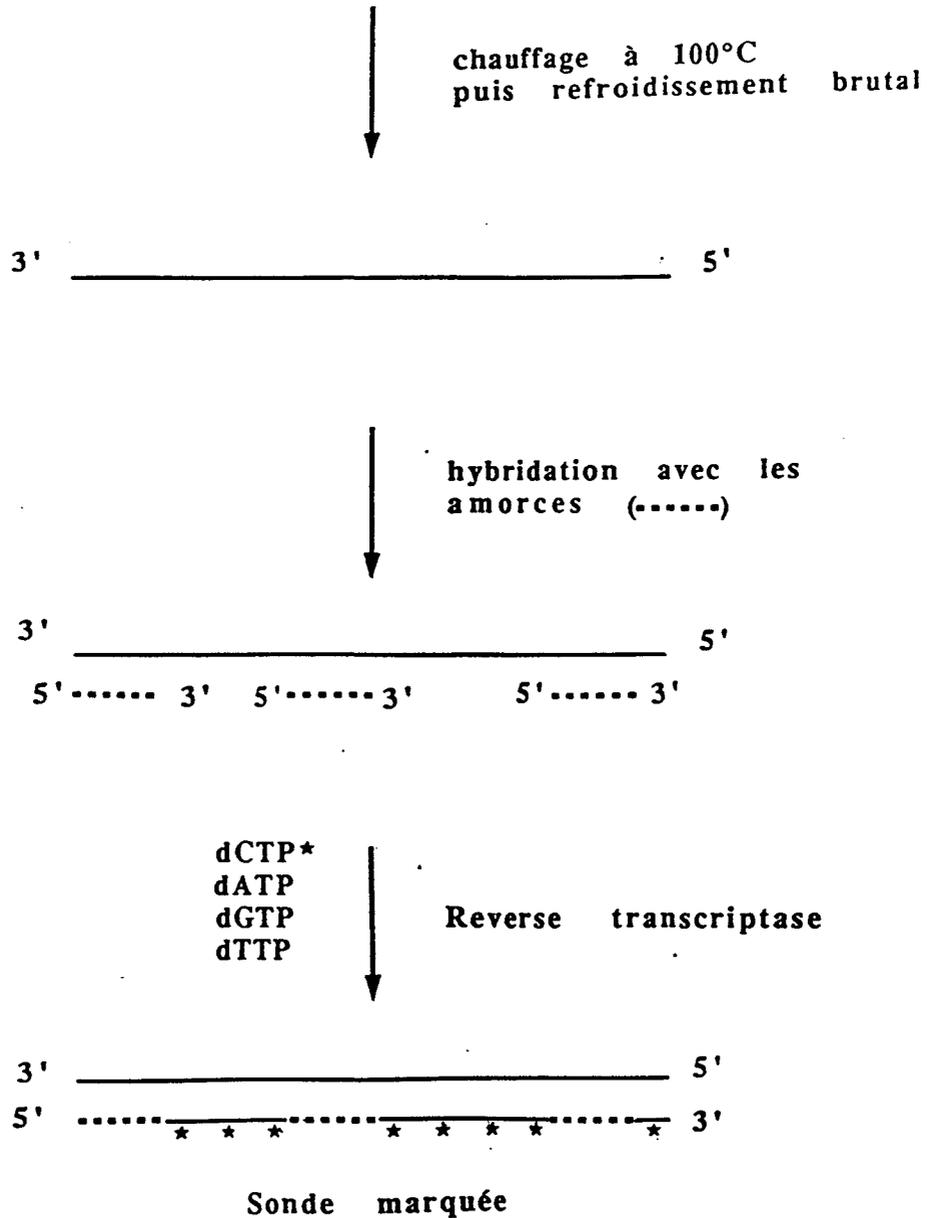
Le transfert proprement dit peut avoir lieu durant 1 heure avec la solution de transfert (SSC 20X). Le filtre nylon est ensuite récupéré, déposé délicatement sur une feuille de papier Whatman et séché à l'air pendant 15 minutes. Le filtre est ensuite cuit pendant 15 minutes à 85°C de manière à fixer les fragments d'ADN transférés. Les membranes sont conservées sous cellophane à température ambiante.

5.5. Marquage des ARN ribosomiaux 16S + 23S d'*Escherichia coli*

Le principe du marquage consiste à synthétiser à partir des ARN ribosomiaux 16S + 23S d'*E. coli*, une séquence homologue d'ADN marquée par l'incorporation d'un nucléotide radioactif. Le marquage de la sonde est réalisé par la technique de multiamorçage au hasard (random priming) (Multiprime DNA labelling system ; Amersham Little Chalfort United Kingdom) ainsi que la décrivent Picard-Pasquier et coll. (1989). Les ARN ribosomiaux 16S + 23S d'*E. coli* sont incubés en présence de séquences "primer", initiant la polymérisation des 4 désoxyribonucléotides dont le ($\alpha^{32}\text{P}$) dCTP, et de l'enzyme Reverse transcriptase (Boehringer) (figure 6).

Figure 6. Marquage par la technique de multi-amorçage au hasard (random-priming)

Sonde ARN 16S + 23S



Dans un tube eppendorf on dissout :

1 μ l d'ARNr 23S + 16S (Boehringer)

159 μ l d'H₂O

Chauffer le mélange 5 minutes à 100°C puis le placer immédiatement dans la glace.

Parallèlement sont ajoutés dans un tube eppendorf conservé dans la glace :

60 μ l de tampon de marquage

25 μ l de BSA (sérum albumine bovine)

47,5 μ l d'H₂O

25 μ l de (α^{32} P) dCTP (Amersham)

10 μ l de Reverse transcriptase (Boehringer)

Le tampon de marquage et la BSA sont fournis dans le kit de marquage "Multiprime DNA labelling system" commercialisé par Amersham (Amersham little chalfort, United Kingdom).

On ajoute alors 50 μ l de la solution d'ARNr 16S + 23S préalablement dénaturée par chauffage et conservée dans la glace. On mélange quelques secondes et on incube 30 minutes à 37°C. L'arrêt de la réaction s'opère en ajoutant 9 μ l d'une solution d'EDTA 0,5M. La sonde marquée est conservée dans la glace ou congelée à -20°C.

Le marqueur de poids moléculaire ("1Kb DNA ladder" LKB) est marqué suivant le même protocole puis autohybridé.

5.6. Hybridation

5.6.1. Préhybridation

Le but est de saturer les sites de fixation potentiels du filtre nylon par de l'ADN, et de diminuer ainsi les bruits de fond lors de l'hybridation.

Le filtre nylon placé dans un sac d'hybridation hermétiquement clos est incubé 30 minutes à 65°C dans la solution "Rapid Hybridation Buffer" (Amersham). Pour un filtre d'une surface de 6 x 10 cm², on utilise 10 millilitres de solution "Rapid Hybridation Buffer".

5.6.2. Hybridation

La sonde marquée est dénaturée par chauffage 5 minutes à 100°C, suivi d'un refroidissement brutal dans la glace.

La quantité de sonde nécessaire est alors prélevée (de manière à obtenir une concentration finale dans le sac de 4ng/millilitre, soit 8µl de sonde pour 10 millilitres de volume final), mélangée à 1 millilitre de solution "Rapid Hybridation Buffer", puis introduit dans le sac d'hybridation préalablement ouvert. L'hybridation a lieu pendant 3 heures à 65°C sous agitation.

5.6.3. Lavages

Ils sont déterminants : c'est durant les lavages que sont éliminés l'excès de sonde et les faux hybrides ADN/ADN ne présentant pas 100% d'homologie.

Les filtres sortis des sacs sont placés au fond d'un plateau et subissent 3 séries de lavage de force ionique décroissante, avec agitation :

- 2 lavages de 10 minutes dans une solution de 2xSSC, 0,1SDS à la température du laboratoire ;

- 1 lavage de 15 minutes dans une solution de 1xSSC, 0,1SDS à la température de 65°C ;

- 2 lavages de 10 minutes dans une solution de 0,7xSSC, 0,1SDS à la température du laboratoire.

Les filtres sont ensuite séchés 10 minutes à 85°C.

5.6.4. Autoradiographie

Les filtres nylon sont autoradiographiés en présence d'un film "Kodak XAR-5" dans une cassette blindée munie de 2 écrans renforçateurs "Kodak-X-OMAT" placée à -80°C. La révélation des films se fait au bout de 2 à 10 jours.

5.6.5. Interprétation des profils de restriction des gènes ARNr.

. Les profils de restriction des gènes sont constitués d'un ensemble de bandes, correspondant aux fragments du génome bactérien ayant hybridés avec la sonde. La représentation schématique des profils est réalisée en mesurant la distance des bandes en millimètre, par rapport à la ligne des puits, et en reproduisant ces distances en millimètre sur papier grâce à un programme informatique mis au point au laboratoire.

Le marqueur de poids moléculaire "1Kb ladder (Gibco-BRL) peut permettre d'évaluer approximativement le poids des bandes en kilobases.

. De manière à permettre la comparaison des autoradiogrammes une attention particulière a été portée sur la reproductibilité de la technique: le temps d'hydrolyse enzymatique (2 heures), les conditions d'électrophorèse (16 heures à 15 volts avec un gel d'agarose à 0,7%) ont été scrupuleusement respectés pour chaque gel.

. Des souches de l'étude utilisées comme marqueurs internes de référence ont été déposées sur les gels. Ainsi, il est possible de réévaluer les légères différences de migration possibles entre deux gels, par la comparaison des profils de restriction des gènes des souches utilisées comme marqueurs internes de référence. Des autoradiogrammes différents peuvent être comparés avec sécurité.

. Le but de l'étude est de rechercher les profils identiques parmi un ensemble de profils correspondant aux souches étudiées. La comparaison des profils se fait à l'oeil en plaçant les autoradiogrammes sur une table lumineuse. Les profils constitués d'un certain nombre de bandes sont comparés dans leur entier et non bande par bande. L'intensité des bandes n'est pas pris en compte. On regarde seulement la présence ou l'absence d'une bande.

RESULTATS

I. IDENTIFICATION BASEE SUR DES CARACTERES PHENOTYPIQUES

508 souches au total isolées aux 5 émergences A, B, C, D et E entre septembre 1989 et septembre 1990, ont été envoyées à notre laboratoire pour être analysées. 31 n'ont pas produit de subculture. Les 477 souches cultivables ont fait l'objet d'un examen détaillé de leurs caractères morphologiques, culturels et biochimiques. 3,6% (soit 17 souches) sont des bacilles ou cocci à Gram positif, 96,4% (460 souches) sont des bacilles à Gram négatif.

1. Bacilles à Gram négatif

Les 460 bacilles à Gram négatif ont été identifiés au niveau de l'espèce à l'aide de galeries API 20 NE associées à des tests biochimiques complémentaires. Ce sont tous des germes aérobies stricts, non fermentants, de type oxydatif, à mobilité et pigmentation variables.

Le tableau 8 donne pour chacune des sources, la liste des espèces rencontrées avec leur fréquence respective. Parmi les 460 souches analysées, 202, soit 43,9% sont reconnues au niveau de l'espèce (14 espèces), tandis que 258, soit 56% ne le sont pas (47,4% des souches ne sont pas identifiées au niveau de l'espèce pour la source A, 77,2% pour la source B, 53,3% pour la source C, 49% pour la source D et 56,4% pour la source E). Sur les 258 souches non identifiées, 65 synthétisent le pigment fluorescent et ont été classées dans le groupe *Pseudomonas* sp. (à pigment fluorescent).

Le genre *Pseudomonas* est largement dominant dans les 5 sources (63% pour l'eau A, 58,7% pour B, 45,5% pour C, 55% pour D et 43,5% pour E).

Tableau 8. Fréquence des espèces isolées à l'émergence des eaux minérales A, B, C, D et E

		Nombre et pourcentage (%)					
Espèces	Profils	A	B	C	D	E	TOTAL
<i>Pseudomonas</i>							
<i>Ps. fluorescens</i>	a	39(33.6)	11(11.9)	25(27.7)	25(25)	/	100
<i>Ps. putida</i>	b	10(8.6)	2(2.1)	/	/	/	12
<i>Ps. chlororaphis</i>	c	2(1.7)	3 (3.3)	/	3(3)	7(11.3)	15
<i>Pseudomonas</i> sp (pigment fluorescent)	d	14(12)	33(35.8)	7(7.7)	6(6)	5(8)	65
<i>Ps. stutzeri</i>	e	2(1.7)	/	/	/	1(1.6)	3
<i>Ps. cepacia</i>	f	/	/	/	/	2(3.2)	2
<i>Ps. vesicularis</i>	g	4(3.4)	2(2.1)	6(6.6)	3(3)	7(11.3)	22
<i>Ps. mesophilica</i>	h	/	1(1)	/	1(1)	1(1.5)	3
<i>Ps. paucimobilis</i>	i	2(1.7)	2(2.1)	3(3.3)	17(17)	4(6.4)	28
<i>Comamonas</i>							
<i>C. acidovorans</i>	j	/	/	3(3.3)	/	/	3
<i>C. testosteroni</i>	k	/	/	5(5.5)	/	1(1.5)	6
<i>Xanthomonas</i>							
<i>X. maltophilia</i>	l	/	/	/	/	1(1.5)	1
<i>Acinetobacter</i>							
<i>A. lwoffii</i>	m	2(1.7)	/	/	/	1(1.5)	3
<i>Agrobacterium</i>							
<i>A. radiobacter</i>	n	/	/	/	1(1)	2(3.2)	3
<i>Flavimonas</i>							
<i>F. oryzihabitans</i>	o	/	/	/	1(1)	/	1
souches non identifiées	p	41(35.6)	38(41.3)	41(45.5)	43(43)	30(48.4)	193
TOTAL		116(100)	92(100)	90(100)	100(100)	62(100)	460

/ : aucune souche isolée

A l'intérieur du genre *Pseudomonas*, les souches élaborant le pigment fluorescent, réparties entre les espèces *Ps. fluorescens*, *Ps. putida*, *Ps. chlororaphis*, et le groupe *Pseudomonas* sp., constituent un ensemble très représentatif. Elles sont au nombre de 192, soit 41,7% du total des souches. Pour l'eau A elles représentent 56% des souches, pour l'eau B 53,2%, pour l'eau C 35,5%, pour l'eau D 34%, et seulement 19,4% pour l'eau E dans laquelle aucun *Ps. fluorescens* et *Ps. putida* n'ont été isolés.

Si l'espèce *Ps. fluorescens* est de loin la plus fréquente (100/192), *Ps. putida* (12/192) et *Ps. chlororaphis* (15/192) sont rares.

Les espèces *Ps. vesicularis* et *Ps. paucimobilis* sont caractéristiques de la flore des eaux minérales puisqu'on les retrouve dans les 5 sources. L'espèce *Ps. vesicularis* apparaît à une faible fréquence dans les sources A (3,4%), B (2,1%), C (6,6%) et D (3%), mais est relativement bien représentée dans la source E (11,3%). De même, l'espèce *Ps. paucimobilis* est rare dans les sources A (1,7%), B (2,1%), C (3,3%) et E (6,4%), mais constitue une fraction importante de la flore de la source D (17%). Les autres espèces du genre *Pseudomonas*, *Ps. cepacia* et *Ps. mesophilica*, sont rares. Deux souches de *Ps. cepacia* ont été isolées dans l'eau E, et une souche de *Ps. mesophilica* dans les eaux B, D et E.

Les genres *Comamonas*, *Xanthomonas*, *Acinetobacter*, *Agrobacterium* et *Flavimonas*, ne constituent que 3,7% de l'ensemble des souches. Ils ne sont représentés que par une ou deux espèces et n'apparaissent que dans une ou deux eaux. *C. acidovorans* n'est isolé que dans la source C (3,3%), *C. testoteroni* dans les sources C (5,5%) et E (1,8%), *X. maltophilia* dans la source E (1,5%), *A. lwoffii* dans les sources A (1,7%) et E (1,5%), *A. radiobacter* dans les sources D (1%) et E (3,2%), et enfin *F. oryzihabitans* dans la source D (1%).

Les tableaux 9 à 13 montrent pour chaque émergence la répartition détaillée des espèces en fonction des échantillons (I à VI) et des types de prélèvements (α et β). Les 6 échantillons étant réalisés à deux mois d'intervalle, entre septembre 1989 et septembre 1990, il est possible de mettre en évidence les espèces ou groupes bactériens, les plus stables dans le temps. Globalement, pour l'ensemble des 5 sources, l'espèce *Ps. fluorescens*, le groupe *Pseudomonas* sp. et celui des souches non identifiées, constituent l'ensemble bactérien le plus conservé au cours de l'échantillonnage (isolés dans 2 à 6 échantillons successifs selon les sources). En particulier l'espèce *Ps. fluorescens* se retrouve dans cinq échantillons différents pour la source D, dans quatre échantillons pour les sources A et C et dans deux échantillons, I et VI, réalisés à 12 mois d'intervalle pour la source B. Pour chaque émergence, certaines espèces apparaissent plus ou moins bien conservées dans le temps. Ce sont les cas des espèces *Ps. putida* pour l'eau A et *Ps. paucimobilis* pour l'eau D, très stables puisque isolées dans 4 échantillons successifs. Les espèces *Ps. vesicularis* et *C. testosteroni* pour l'eau C, *Ps. chlororaphis*, *Ps. vesicularis* et *Ps. paucimobilis* pour l'eau E, apparaissent dans 3 échantillons différents. Enfin, certaines espèces sont isolées dans deux échantillons successifs : *Ps. vesicularis* et *Ps. paucimobilis* pour l'eau A, *Ps. fluorescens* et *Ps. chlororaphis* pour l'eau B, *Ps. paucimobilis* et *C. acidovorans* pour l'eau C, et *Ps. chlororaphis* pour l'eau D.

Si l'on s'intéresse à la répartition des espèces en fonction du type de prélèvement (α ou β), on s'aperçoit que pour chaque source, un certain nombre d'espèces n'ayant pas été isolées dans le prélèvement α , apparaissent dans le prélèvement β . Pour l'eau A, ce sont les cas des espèces *Ps. chlororaphis*, *Ps. stutzeri* et *Ps. vesicularis* ; pour l'eau B, de *Ps. putida*,

Tableau 9. Répartition des espèces en fonction de l'échantillonnage (I à VI) et du type de prélèvement (α, β) pour la source A

Espèces	Echantillonnage						Total
	I	II	III	IV	V	VI	
<i>Ps. fluorescens</i>	α 8 β 7	α 4 β 7	α / β 8	α / β /	α 1 β 4	α / β /	α 13 β 26
<i>Ps. putida</i>	α 3 β /	α / β /	α 1 β 2	α 3 β /	α 1 β /	α / β /	α 8 β 2
<i>Ps. chlororaphis</i>	α / β /	α / β 2	α / β 2				
<i>Pseudomonas</i> sp.	α / β /	α 4 β 3	α 4 β /	α 2 β /	α 1 β /	α / β /	α 11 β 3
<i>Ps. stutzeri</i>	α / β 2	α / β /	α / β 2				
<i>Ps. vesicularis</i>	α / β /	α / β /	α / β /	α / β /	α / β 1	α / β 3	α / β 4
<i>Ps. paucimobilis</i>	α / β /	α 1 β /	α / β /	α / β /	α 1 β /	α / β /	α 2 β /
<i>A. lwoffii</i>	α / β /	α / β /	α 1 β 1	α / β /	α / β /	α / β /	α 1 β 1
Souches non identifiées	α / β 1	α 1 β /	α 3 β /	α 3 β 8	α 7 β 6	α 6 β 6	α 20 β 21

/ aucune souche

Tableau 10. Répartition des espèces en fonction de l'échantillonnage (I à VI) et du type de prélèvement (α , β) pour la source B

Espèces	Echantillonnage						Total
	I	II	III	IV	V	VI	
<i>Ps. fluorescens</i>	α 4 β /	α / β /	α / β /	α / β /	α / β /	α / β 7	α 4 β 7
<i>Ps. putida</i>	α / β /	α / β /	α / β /	α / β /	α / β /	α / β 2	α / β 2
<i>Ps. chlororaphis</i>	α / β /	α 2 β /	α / β /	α 1 β /	α / β /	α / β /	α 3 β /
<i>Pseudomonas</i> sp.	α 6 β /	α / β 2	α 8 β 10	α / β /	α 4 β /	α 2 β 1	α 20 β 13
<i>Ps. vesicularis</i>	α / β /	α 1 β 1	α / β /	α / β /	α / β /	α / β /	α 1 β 1
<i>Ps. mesophilica</i>	α / β /	α / β /	α / β /	α / β 1	α / β /	α / β /	α / β 1
<i>Ps. paucimobilis</i>	α / β /	α / β /	α / β /	α / β /	α / β 2	α / β /	α / β 2
Souches non identifiées	α / β 6	α 3 β 6	α / β /	α 8 β 6	α 7 β 2	α / β /	α 18 β 20

/ aucune souche

Tableau 11. Répartition des espèces en fonction de l'échantillonnage (I à VI) et du type de prélèvement (α , β) pour la source C

Espèces	Echantillonnage						Total
	I	II	III	IV	V	VI	
<i>Ps. fluorescens</i>	α 2 β 1	α / β /	α / β /	α 1 β /	α 1 β /	α 10 β 10	α 14 β 11
<i>Pseudomonas sp.</i>	α / β 1	α 1 β 2	α / β 1	α / β /	α / β /	α 1 β 1	α 2 β 5
<i>Ps. vesicularis</i>	α / β /	α / β /	α 1 β /	α 1 β /	α / β /	α 4 β /	α 6 β /
<i>Ps. paucimobilis</i>	α / β /	α / β 1	α / β /	α / β /	α / β /	α / β 2	α / β 3
<i>C. acidovorans</i>	α / β /	α 2 β /	α / β 1	α / β /	α / β /	α / β /	α 2 β 1
<i>C. testosteroni</i>	α / β 1	α / β /	α 1 β /	α / β /	α 3 β /	α / β /	α 4 β 1
Souches non identifiées	α 4 β 5	α 3 β 3	α 6 β 7	α 3 β 3	α 4 β 3	α / β /	α 20 β 21

/ aucune souche

Tableau 12. Répartition des espèces en fonction de l'échantillonnage (I à VI) et du type de prélèvement (α , β) pour la source D

Espèces	Echantillonnage						Total
	I	II	III	IV	V	VI	
<i>Ps. fluorescens</i>	α 2 β 1	α / β 8	α 1 β 4	α / β /	α / β 1	α 7 β 1	α 10 β 15
<i>Ps. chlororaphis</i>	α / β /	α / β /	α / β 2	α / β 1	α / β /	α / β /	α / β 3
<i>Pseudomonas</i> sp.	α 1 β 1	α / β 1	α / β /	α / β 1	α / β /	α / β 2	α 1 β 5
<i>Ps. vesicularis</i>	α / β /	α / β /	α / β /	α / β /	α / β 3	α / β /	α / β 3
<i>Ps. mesophilica</i>	α / β 1	α / β /	α / β 1				
<i>Ps. paucimobilis</i>	α / β /	α 2 β /	α 3 β 1	α / β /	α 3 β 1	α / β 7	α 8 β 9
<i>A. radiobacter</i>	α / β /	α 1 β /	α / β /	α / β /	α / β /	α / β /	α 1 β /
<i>F. oryzihabitans</i>	α / β /	α 1 β /	α / β /	α / β /	α / β /	α / β /	α 1 β /
Souches non identifiées	α 7 β 5	α 4 β /	α 2 β 3	α 8 β 8	α / β 4	α 2 β /	α 23 β 20

/ aucune souche

Tableau 13. Répartition des espèces en fonction de l'échantillonnage (I à VI) et du type de prélèvement (α , β) pour la source E

Espèces	Echantillonnage						Total
	I	II	III	IV	V	VI	
<i>Ps. chlororaphis</i>	$\alpha 1$ $\beta 1$	$\alpha 1$ $\beta 1$	$\alpha /$ $\beta /$	$\alpha 2$ $\beta 1$	$\alpha /$ $\beta /$	$\alpha /$ $\beta /$	$\alpha 4$ $\beta 3$
<i>Pseudomonas sp.</i>	$\alpha /$ $\beta /$	$\alpha /$ $\beta /$	$\alpha /$ $\beta 1$	$\alpha 2$ $\beta /$	$\alpha /$ $\beta /$	$\alpha /$ $\beta 2$	$\alpha 2$ $\beta 3$
<i>Ps. stutzeri</i>	$\alpha /$ $\beta 1$	$\alpha /$ $\beta /$	$\alpha /$ $\beta 1$				
<i>Ps. cepacia</i>	$\alpha /$ $\beta 2$	$\alpha /$ $\beta /$	$\alpha /$ $\beta 2$				
<i>Ps. vesicularis</i>	$\alpha /$ $\beta /$	$\alpha /$ $\beta 1$	$\alpha /$ $\beta /$	$\alpha 1$ $\beta 1$	$\alpha 1$ $\beta 3$	$\alpha /$ $\beta /$	$\alpha 2$ $\beta 5$
<i>Ps. mesophilica</i>	$\alpha /$ $\beta /$	$\alpha /$ $\beta /$	$\alpha /$ $\beta 1$	$\alpha /$ $\beta /$	$\alpha /$ $\beta /$	$\alpha /$ $\beta /$	$\alpha /$ $\beta 1$
<i>Ps. paucimobilis</i>	$\alpha /$ $\beta 1$	$\alpha /$ $\beta /$	$\alpha 1$ $\beta /$	$\alpha /$ $\beta 2$	$\alpha /$ $\beta /$	$\alpha /$ $\beta /$	$\alpha 1$ $\beta 3$
<i>C. testosteroni</i>	$\alpha 1$ $\beta /$	$\alpha /$ $\beta /$	$\alpha 1$ $\beta /$				
<i>X. maltophilia</i>	$\alpha /$ $\beta /$	$\alpha 1$ $\beta /$	$\alpha /$ $\beta /$	$\alpha /$ $\beta /$	$\alpha /$ $\beta /$	$\alpha /$ $\beta /$	$\alpha 1$ $\beta /$
<i>A. lwoffii</i>	$\alpha /$ $\beta /$	$\alpha 1$ $\beta /$	$\alpha /$ $\beta /$	$\alpha /$ $\beta /$	$\alpha /$ $\beta /$	$\alpha /$ $\beta /$	$\alpha 1$ $\beta /$
<i>A. radiobacter</i>	$\alpha /$ $\beta /$	$\alpha 1$ $\beta 1$	$\alpha /$ $\beta /$	$\alpha /$ $\beta /$	$\alpha /$ $\beta /$	$\alpha /$ $\beta /$	$\alpha 1$ $\beta 1$
Souches non identifiées	$\alpha 2$ $\beta 3$	$\alpha /$ $\beta 3$	$\alpha 3$ $\beta 4$	$\alpha 1$ $\beta /$	$\alpha 4$ $\beta 5$	$\alpha 2$ $\beta 3$	$\alpha 12$ $\beta 18$

/ aucune souche

Ps. mesophilica et *Ps. paucimobilis* ; pour l'eau C, de *Ps. paucimobilis*; pour l'eau D ; de *Ps. chlororaphis*, *Ps. vesicularis* et *Ps. mesophilica* ; et pour l'eau E, de *Ps. stutzeri*, *Ps. cepacia* et *Ps. mesophilica*.

2. Le groupe des bacilles et cocci à Gram positif

Ce groupe, peu représenté dans l'ensemble des eaux (17 souches correspondant à 3,6% de la totalité des bactéries cultivables) n'a pas fait l'objet d'une identification précise dans le cadre de cette étude (sauf pour les staphylocoques identifiés au niveau de l'espèce à l'aide de galeries API Staph (API System ; S.A. La Balme-les-Grottes, France).

Au total, 11 *Bacillus* et 2 *Micrococcus* ont été isolés de la source B, un *Staphylococcus hominis* et 2 *Staphylococcus epidermidis* de la source D, et un *Bacillus* de la source E.

II. LES PROFILS DE RESTRICTION DES GENES CODANT POUR LES ARN RIBOSOMAux

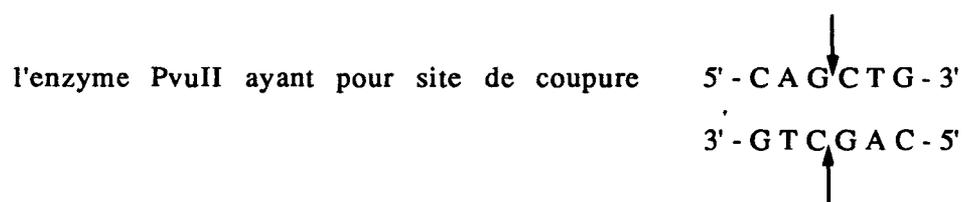
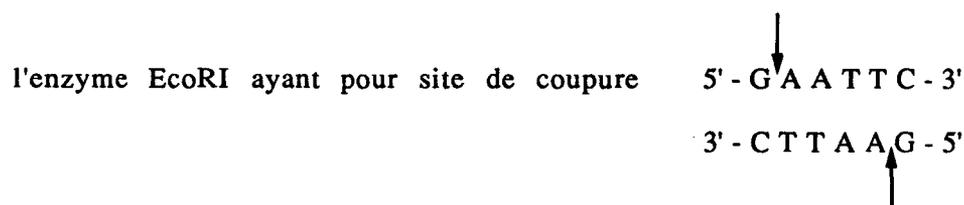
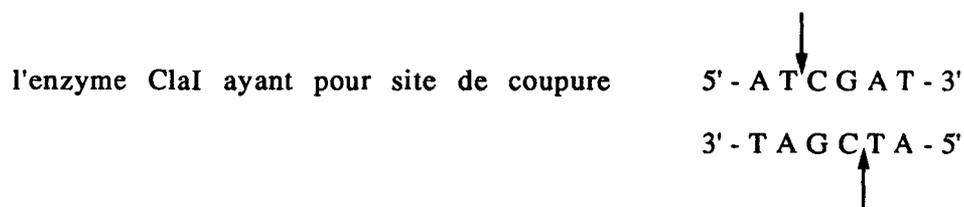
1. Choix de l'enzyme de restriction

20 enzymes de restriction commercialisées par Gibco-BRL avec leur tampon de digestion correspondant (R1 à R11, de salinité croissante) ont été testées sur les ADN de 7 espèces bactériennes communément trouvées dans les eaux minérales naturelles. Il s'agit des espèces *Acinetobacter lwoffii*, *Pseudomonas paucimobilis*, *Pseudomonas putida*, *Comamonas acidovorans*,

Xanthomonas maltophilia, *Alcaligenes xylosoxidans* et *Pseudomonas fluorescens*. Pour chaque espèce, plusieurs souches différentes ont été utilisées.

Le choix devait se porter sur une enzyme unique, pour toute l'étude, capable de digérer les ADN d'un ensemble d'espèces différentes et permettant une discrimination des profils de restriction des gènes ARNr.

3 enzymes de restriction ont donné des résultats satisfaisants :

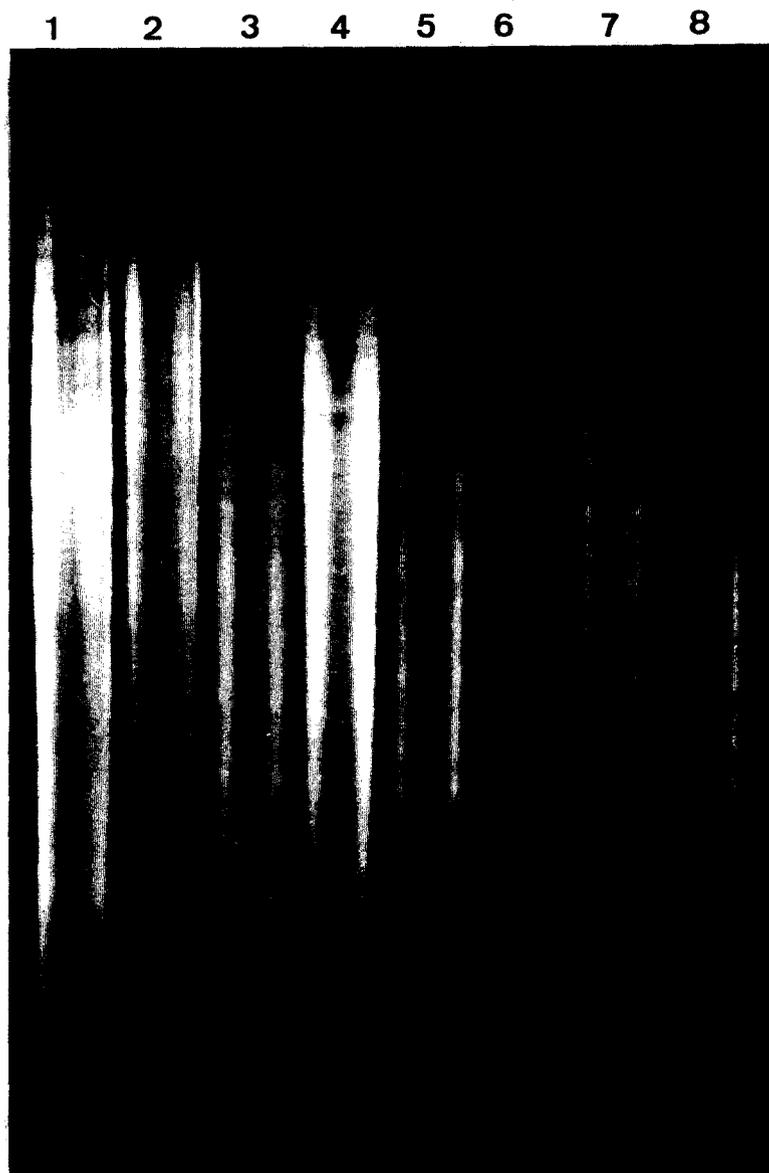


Les figures 7, 9 et 11 montrent les profils de restriction obtenus après digestion respectivement par les enzymes *Cla*I, *Eco*RI et *Pvu*II.

Les figures 8, 10 et 12 présentent les profils de restriction des gènes ARNr correspondants, obtenus après transfert et hybridation avec la sonde 16S + 23S ARNr d'*Escherichia coli*.

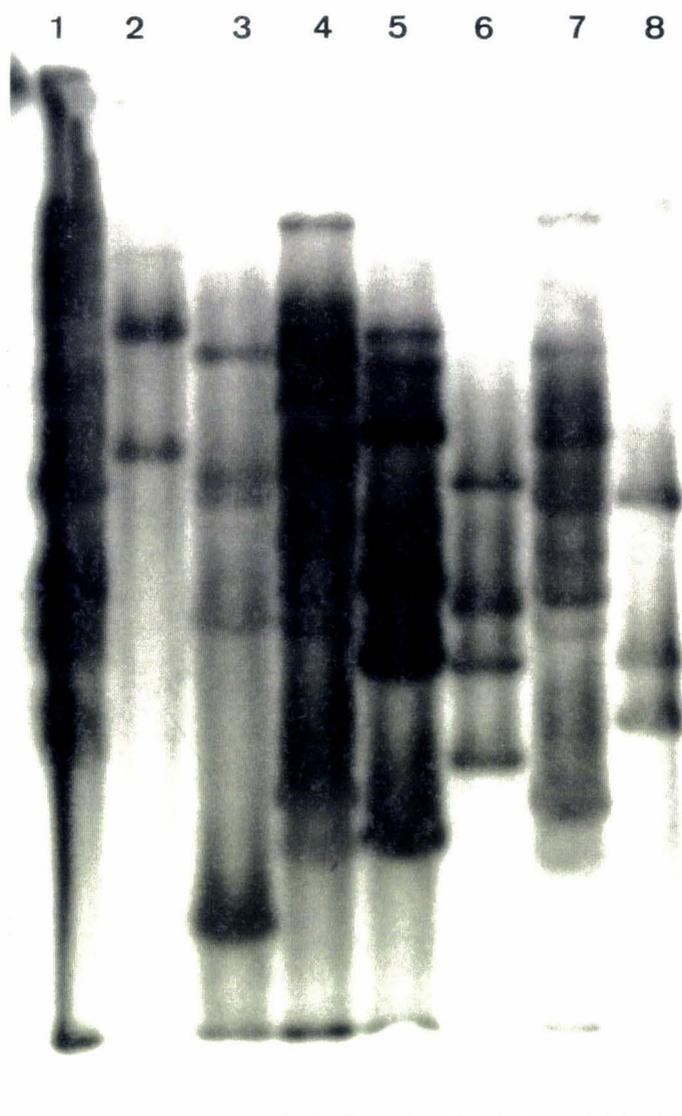
Pour des raisons pratiques, l'enzyme *Pvu*II a été choisie pour l'ensemble de l'étude.

Figure 7. Profils de restriction obtenus après digestion par ClaI



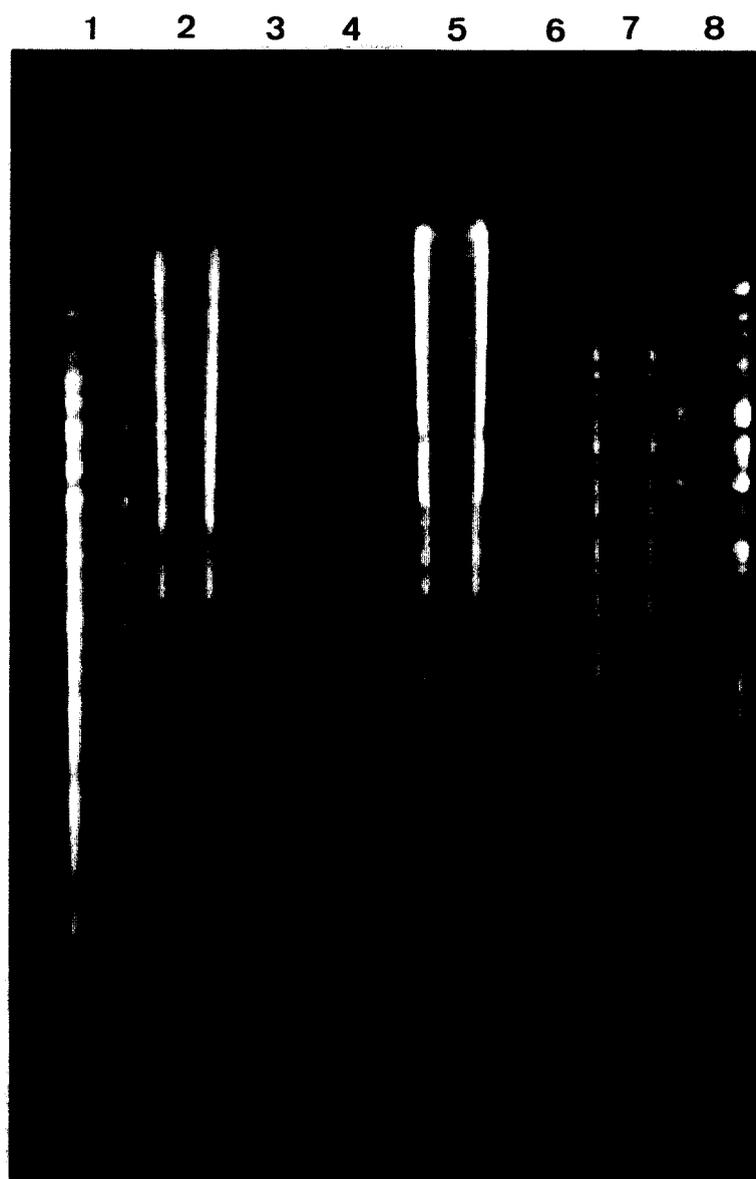
puits 1: *Acinetobacter lwoffii*; puits 2: *Pseudomonas paucimobilis*; puits 3: *Pseudomonas putida*; puits 4: *Comamonas acidovorans*; puits 5: *Xanthomonas maltophilia*; puits 6: *Alcaligenes xylooxidans*; puits 7: *Ps. fluorescens*; puits 8: *Ps. fluorescens*

Figure 8. Profils de restriction des gènes obtenus après hybridation (ClnI)



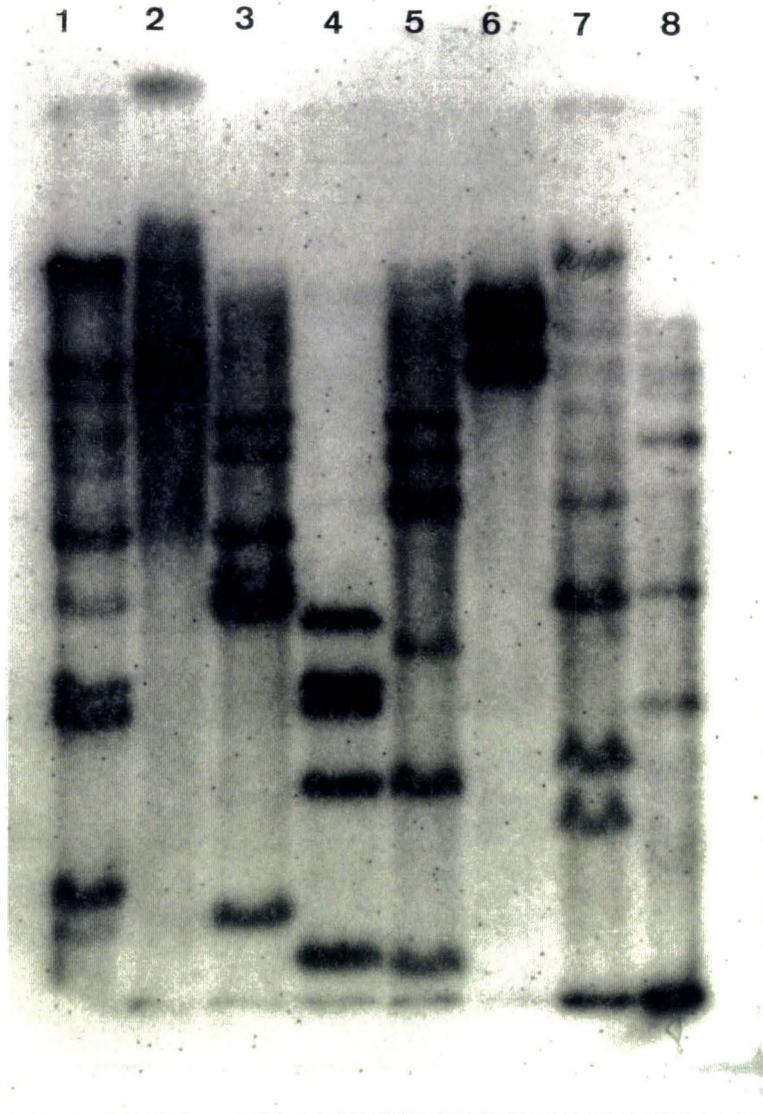
puits 1: *Acinetobacter lwoffii*; puits 2: *Pseudomonas paucimobilis*; puits 3: *Pseudomonas putida*; puits 4: *Comamonas acidovorans*; puits 5: *Xanthomonas maltophilia*; puits 6: *Alcaligenes xylooxidans*; puits 7: *Ps. fluorescens*; puits 8: *Ps. fluorescens*

Figure 9. Profils de restriction obtenus après digestion par EcoRI



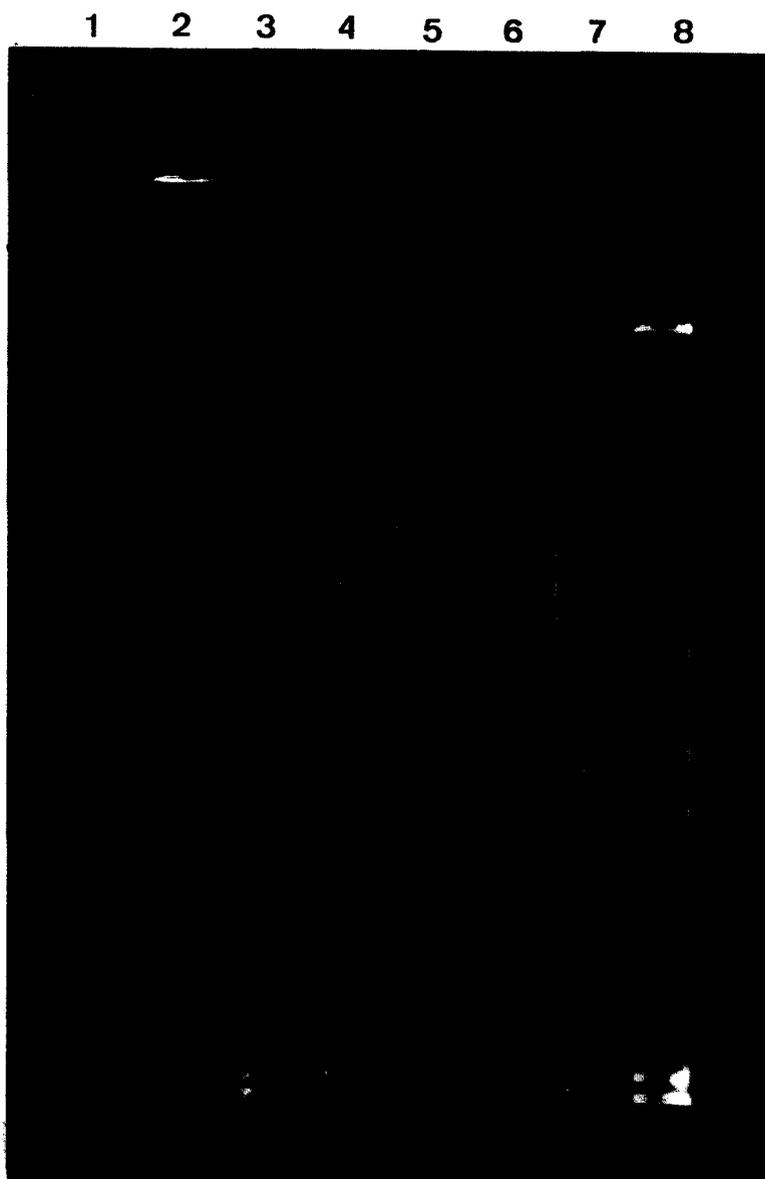
puits 1: *Acinetobacter lwoffii*; puits 2: *Pseudomonas paucimobilis*; puits 3: *Pseudomonas putida*; puits 4: *Comamonas acidovorans*; puits 5: *Xanthomonas maltophilia*; puits 6: *Alcaligenes xylooxidans*; puits 7: *Ps. fluorescens*; puits 8: *Ps. fluorescens*

Figure 10. Profils de restriction des gènes obtenus après hybridation (EcoRI)



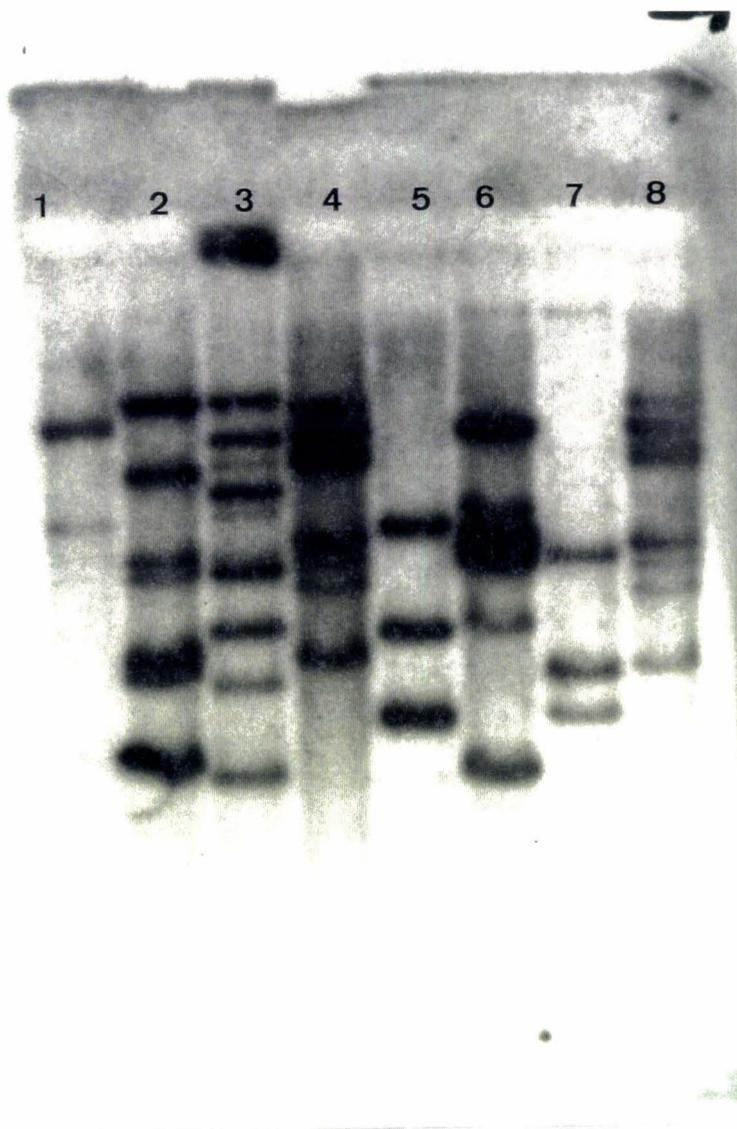
puits 1: *Acinetobacter lwoffii*; puits 2: *Pseudomonas paucimobilis*; puits 3: *Pseudomonas putida*; puits 4: *Comamonas acidovorans*; puits 5: *Xanthomonas maltophilia*; puits 6: *Alcaligenes xylooxidans*; puits 7: *Ps. fluorescens*; puits 8: *Ps. fluorescens*

Figure 11. Profils de restriction obtenus après digestion par PvuII



puits 1: *Acinetobacter lwoffii*; puits 2: *Pseudomonas paucimobilis*; puits 3: *Pseudomonas putida*; puits 4: *Comamonas acidovorans*; puits 5: *Xanthomonas maltophilia*; puits 6: *Alcaligenes xylooxidans*; puits 7: *Ps. fluorescens*; puits 8: *Ps. fluorescens*

Figure 12. Profils de restriction des gènes obtenus après hybridation (PvuII)

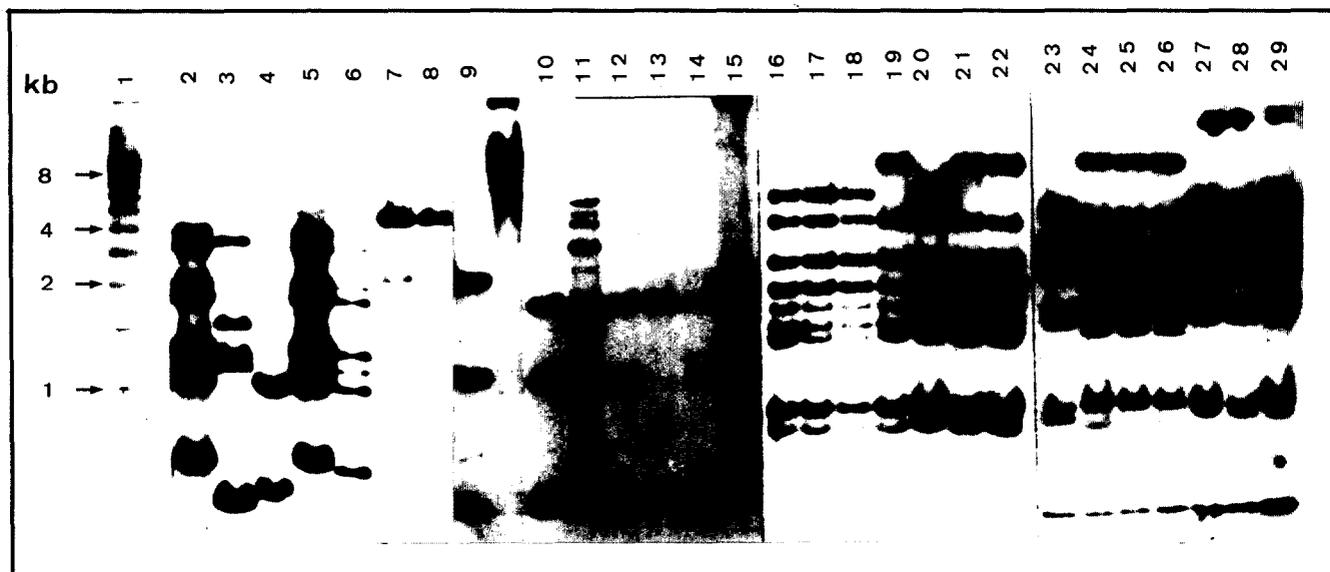


puits 1: *Acinetobacter lwoffii*; puits 2: *Pseudomonas paucimobilis*; puits 3: *Pseudomonas putida*; puits 4: *Comamonas acidovorans*; puits 5: *Xanthomonas maltophilia*; puits 6: *Alcaligenes xylooxidans*; puits 7: *Ps. fluorescens*; puits 8: *Ps. fluorescens*

2. Analyse des profils de restriction des gènes ARNr

Parmi les 460 bacilles à Gram négatif étudiés en phénotypie, 208 ont été sélectionnés pour l'étude des profils de restriction des gènes ARNr. Pour chaque source, environ 5 à 15 colonies ont été choisies au hasard dans chaque échantillon (I à VI). La figure 13 présente une photographie d'un autoradiogramme montrant différents types de profils de restriction des gènes ribosomaux obtenus à partir de souches des eaux minérales. Les figures 14 à 18 présentent, pour chaque émergence, la liste des profils de restriction des gènes ARNr de l'ensemble des souches sélectionnées, associés à leur fréquence (nombre de profils identiques obtenus). Chaque bande correspond à un fragment du génome bactérien hybridé avec la sonde radioactive. Les profils sont classés en fonction de leur degré de complexité décroissante (nombre de bandes de plus en plus faible) à l'intérieur de l'espèce ou du groupe bactérien (*Pseudomonas* sp. et groupe des souches non identifiées) définis phénotypiquement. Une souche non identifiée présentant le même ribotype qu'une souche identifiée à l'espèce a été classée dans l'espèce en question. De même, une souche du groupe *Pseudomonas* sp. présentant un profil identique à une souche de *Ps. fluorescens*, de *Ps. putida* ou de *Ps. chlororaphis* a été classée dans l'espèce correspondante.

Figure 13. Profils de restriction des gènes obtenus avec l'enzyme PvuII à partir de souches isolées des eaux minérales



puits 1: marqueur "1Kb ladder"; puits 2: profil a18 (*Ps. fluorescens*); puits 3: profil f2 (*Ps. cepacia*); puits 4: profil p39 (non identifiée); puits 5 et 6: profil a18 (*Ps. fluorescens*); puits 7 et 8: profil g3 (*Ps. vesicularis*); puits 9: profil p7 (non identifiée); puits 10: profil p6 (non identifiée); puits 11: profil p2 (non identifiée); puits 12: profil p6 (non identifiée); puits 13: profil p8 (non identifiée); puits 14 et 15: profil p6 (non identifiée); puits 16 à 18: profil a2 (*Ps. fluorescens*); puits 19: profil a1 (*Ps. fluorescens*); puits 20: profil a2 (*Ps. fluorescens*); puits 21 à 22: profil a1 (*Ps. fluorescens*); puits 23: profil b1 (*Ps. putida*); puits 24 à 26: profil a1 (*Ps. fluorescens*); puits 27 à 29: profil b1 (*Ps. putida*);

Figure 14. Représentation schématique des profils de restriction des gènes ARNr obtenus à partir de souches isolées de l'eau minérale A

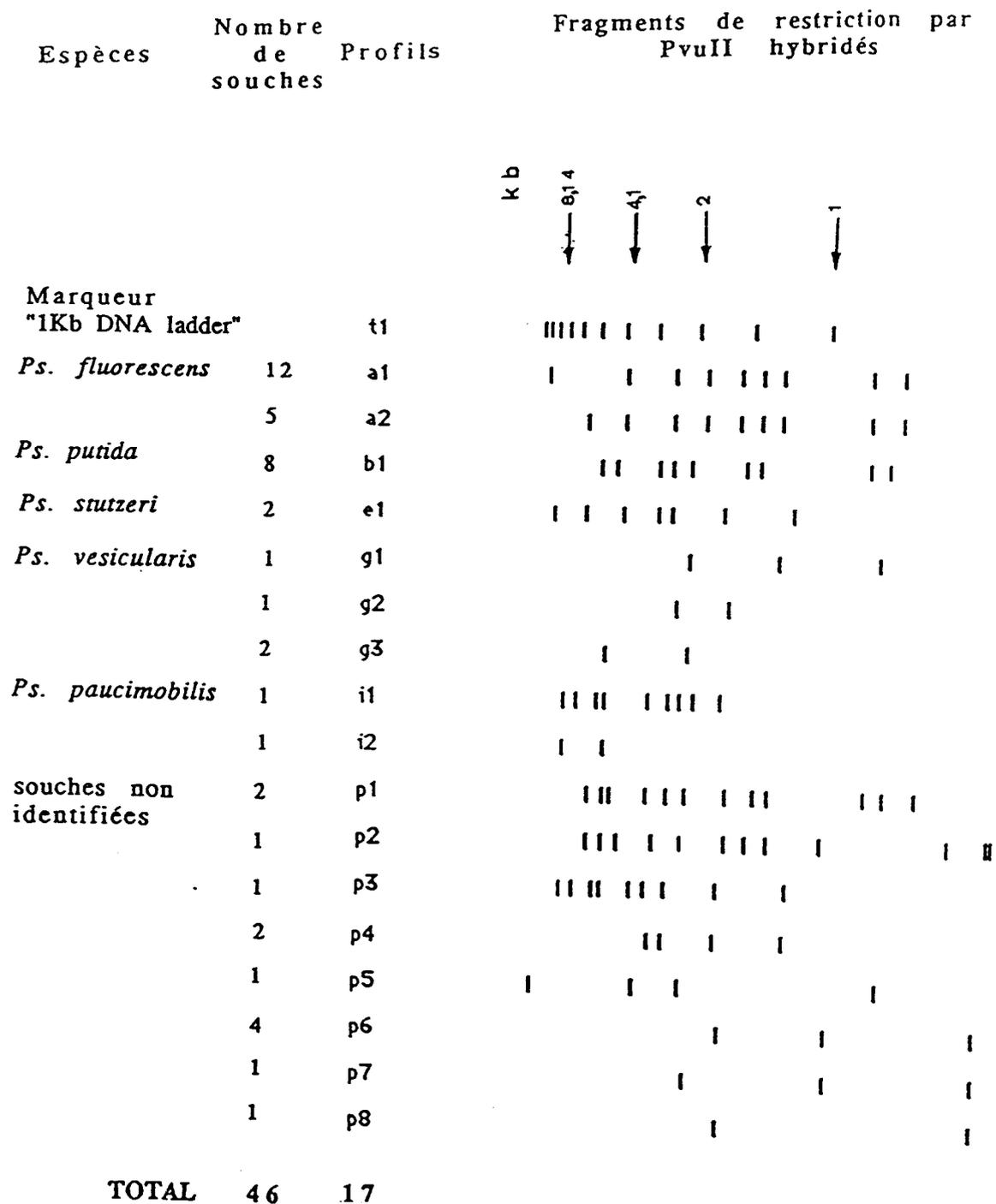


Figure 15. Représentation schématique des profils de restriction des gènes ARNr obtenus à partir de souches isolées de l'eau minérale B

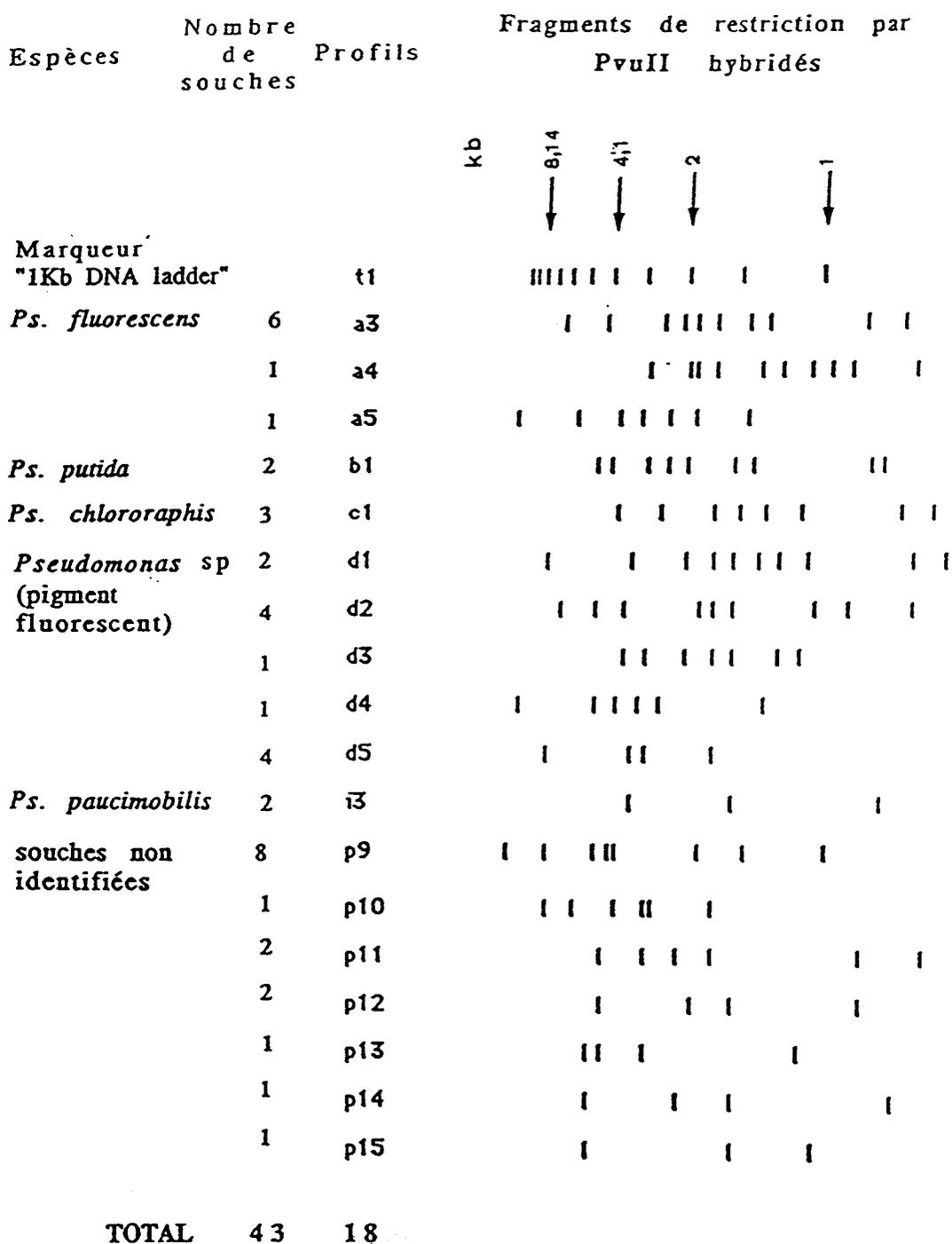


Figure 16. Représentation schématique des profils de restriction des gènes ARNr obtenus à partir de souches isolées de l'eau minérale C

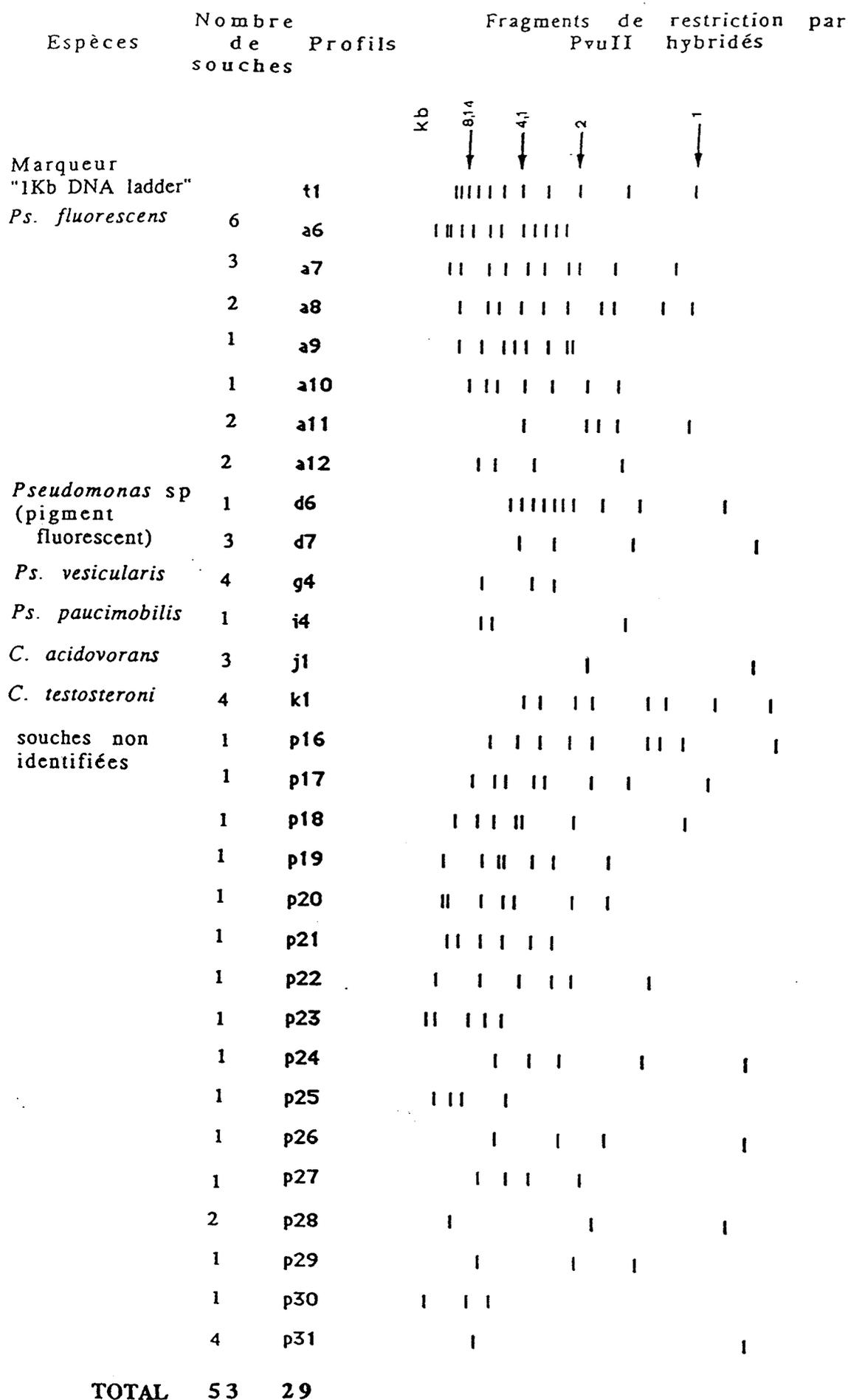


Figure 17. Représentation schématique des profils de restriction des gènes ARNr obtenus à partir de souches isolées de l'eau minérale D

Espèces	Nombre de souches	Profils	Fragments de restriction par PvuII hybridés			
Marqueur "1Kb DNA ladder"		t1				
<i>Ps. fluorescens</i>	3	a13				
	3	a14				
	2	a15				
	1	a16				
	2	a17				
	3	a18				
	1	a19				
	2	a20				
<i>Pseudomonas</i> sp (pigment fluorescent)	2	d8				
	1	d9				
<i>Ps. paucimobilis</i>	2	i5				
	2	i6				
	3	i2				
<i>A. radiobacter</i>	1	n1				
<i>F. oryzihabitans</i>	1	o1				
souches non identifiées	2	p32				
	1	p33				
	1	p34				
	1	p35				
	2	p36				
	2	p37				
	1	p38				
	2	p39				
	1	p40				
	1	p41				
	1	p42				
TOTAL	44	26				

Figure 18. Représentation schématique des profils de restriction des gènes ARNr obtenus à partir de souches isolées de l'eau minérale E

Espèces	Nombre de souches	Profils	Fragments de restriction par PvuII hybridés					
			kb	8,14	4,1	2	1	
Marqueur "1Kb DNA ladder"		t1						
<i>Ps. chlororaphis</i>	1	c2						
	4	c3						
<i>Pseudomonas</i> sp. (pigment fluorescent)	3	d10						
	1	d11						
<i>Ps. stutzeri</i>	1	e2						
<i>Ps. cepacia</i>	1	f1						
	1	f2						
<i>Ps. vesicularis</i>	1	g5						
	3	g6						
	1	g7						
<i>Ps. paucimobilis</i>	1	i2						
	1	i7						
souches non identifiées	1	p43						
	1	p44						
	1	p45						
TOTAL	22	15						

2.1. Caractérisation de chaque source par les profils de restriction des gènes

Sur l'ensemble des 208 souches sélectionnées et étudiées, 102 profils distincts sont mis en évidence, constitués de 12 à 2 bandes. L'espèce *Ps. fluorescens* est caractérisée par 20 types de profils différents (a1 à a20), *Ps. putida*, 1 type (b1), *Ps. chlororaphis*, 3 types (c1 à c3), *Pseudomonas* sp., 11 types (d1 à d11), *Ps. stutzeri*, 2 types (e1 et e2), *Ps. cepacia*, 2 types (f1 et f2), *Ps. vesicularis*, 7 types (g1 à g7), *Ps. paucimobilis*, 7 types (i1 à i7), *C. acidovorans*, *C. testosteroni*, *A. radiobacter*, *F. oryzihabitans*, 1 type respectivement (j1, k1, n1, o1), et enfin le groupe des souches non identifiées, 45 types (p1 à p45).

La source A (figure 14) comprend 17 profils pour 46 souches étudiées. Parmi les 6 souches du groupe *Pseudomonas* sp. étudiées, 3 présentaient un profil a2 de *Ps. fluorescens* et 3 un profil b1 de *Ps. putida*. La source B (figure 15) est caractérisée par 18 profils pour 43 souches ; la source C (figure 16) par 29 profils pour 53 souches ; la source D (figure 17) par 26 profils pour 44 souches ; et enfin, la source E (figure 18) par 15 profils pour 22 souches. Parmi tous les profils, 2 seulement sont communs à plusieurs sources. Il s'agit du profil b1 (*Ps. putida*) commun aux sources A et B et du profil i2 (*Ps. paucimobilis*) commun au sources A, D et E.

2.2. Distribution des différents types de profils au cours de l'échantillonnage

Les tableaux 14 à 18 représentent, pour les 5 émergences, la distribution des profils dans les 6 prélèvements, au cours de l'année d'étude.

Ils mettent en évidence dans chaque échantillon d'eau, les différents types de profils observés, associés à leur fréquence.

Il est possible de noter d'une part, le nombre d'échantillons (sur 6) dans lesquels un profil donné est observé, d'autre part, le nombre total de répétitions des profils. Ainsi dans le tableau 14 correspondant à la source A, les profils a1 et b1 se répètent dans 4 échantillons différents, 12 fois au total pour a1 et 8 fois pour b1 ; les profils a2 (5 fois), g3 (2 fois), p4 (2 fois) et p6 (4 fois) se retrouvent dans 2 échantillons. Dans le tableau 15 (source B) les profils c1 (3 fois), d1 (2 fois), d5 (4 fois), p9 (8 fois) et p11 (2 fois) apparaissent dans 2 échantillons sur 6. Dans le tableau 16 (source C), les profils a7 (3 fois), k1 (4 fois) et p31 (4 fois) se retrouvent dans 3 échantillons et les profils d7 (3 fois), j1 (3 fois) et p28 (2 fois) dans 2 échantillons. Le tableau 17 (source D) met en évidence le profil i2 (3 fois) dans 3 échantillons et les profils a13 (3 fois), a14 (3 fois), a15 (2 fois), a18 (3 fois), a20 (2 fois), i5 (2 fois), i6 (2 fois) et p39 (2 fois) dans 2 échantillons. Dans le tableau 18 (source E) le profil g6 (3 fois) est rencontré dans 3 échantillons, les profils c3 (4 fois) et d10 (3 fois) dans 2 échantillons.

**Tableau 14. Distribution des profils de restriction des gènes ARNr
en fonction de l'échantillonnage (I à VI) pour la source A**

Espèces	Echantillonnage					
	I	II	III	IV	V	VI
<i>Ps. fluorescens</i>	a1(6)	a1(2) a2(4)	a1(2) a2(1)		a1(2)	
<i>Ps. putida</i>	b1(2)		b1(2)	b1(3)	b1(1)	
<i>Ps. stutzeri</i>	e1(2)					
<i>Ps. vesicularis</i>					g3(1)	g3(1) g1(1) g2(1)
<i>Ps. paucimobilis</i>		i1(1)			i2(1)	
souches non identifiées		p4(1)	p4(1) p7(1)	p8(1)	p6(3) p2(1), p3(1)	p6(1) p1(2), p5(1)

(), nombre de profils trouvés ; les profils répétés sont en caractères gras.

**Tableau 15. Distribution des profils de restriction des gènes ARNr
en fonction de l'échantillonnage (I à VI) pour la source B**

Espèces	Echantillonnage					
	I	II	III	IV	V	VI
<i>Ps. fluorescens</i>	a5(1)					a3(6), a4(1)
<i>Ps. putida</i>						b1(2)
<i>Ps. chlororaphis</i>		c1(2)		c1(1)		
<i>Pseudomonas</i> sp. (pigment fluorescent)	d5(2) d4(1)	d5(2)	d2(4)		d1(1) d3(1)	d1(1)
<i>Ps. paucimobilis</i>					i3(2)	
souches non identifiées	p11(1) p12(2)	p11(1)		p9(6)	p9(2) p10(1), p13(1) p14(1), p15(1)	

(), nombre de profils trouvés ; les profils répétés sont en caractères gras.

Tableau 16. Distribution des profils de restriction des gènes ARNr en fonction de l'échantillonnage (I à VI) pour la source C

Espèces	Echantillonnage					
	I	II	III	IV	V	VI
<i>Ps. fluorescens</i>	a7(1) a12(2)			a10(1)	a7(1)	a7(1) a6(6), a8(2) a9(1); a11(2)
<i>Pseudomonas</i> sp. (pigment fluorescent)	d7(1)	d7(2) d6(1)				
<i>Ps. vesicularis</i>						g4(4)
<i>Ps. paucimobilis</i>						i4(1)
<i>C. acidovorans</i>		j1(2)	j1(1)			
<i>C. testosteroni</i>	k1(1)		k1(1)		k1(2)	
souches non identifiées	p16(1),p25(1)	p31(1)	p28(1) p31(2) p17(1),p18(1) p19(1),p24(1) p26(1),p29(1)	p31(1) p20(1),p21(1) p27(1)	p28(1) p22(1), p23(1) p30(1)	

(), nombre de profils trouvés ; les profils répétés sont en caractères gras.

Tableau 17. Distribution des profils de restriction des gènes ARNr en fonction de l'échantillonnage (I à VI) pour la source D

Espèces	Echantillonnage					
	I	II	III	IV	V	VI
<i>Ps. fluorescens</i>	a15(1)	a13(2) a14(2) a15(1) a18(2)	a18(1) a16(1),a17(2) a19(1)		a20(1)	a13(1) a14(1) a20(1)
<i>Pseudomonas</i> sp. (pigment fluorescent)	d9(1)					d8(2)
<i>Ps. paucimobilis</i>		i2(1)	i5(1)		i2(1) i6(1)	i2(1) i5(1) i6(1)
<i>A. radiobacter</i>		n1(1)				
<i>F. oryzihabitans</i>		o1(1)				
souches non identifiées	p37(2),p40(1)	p33(1),p34(1)	p39(1)	p39(1) p38(1),p41(1) p42(1)	p32(2),p35(1)	p36(2)

(), nombre de profils trouvés ; les profils répétés sont en caractères gras.

Tableau 18. Distribution des profils de restriction des gènes ARNr en fonction de l'échantillonnage (I à VI) pour la source E

Espèces	Echantillonnage					
	I	II	III	IV	V	VI
<i>Ps. chlororaphis</i>	c3(1)	c2(1)		c3(3)		
<i>Pseudomonas</i> sp. (pigment fluorescent)			d11(1)	d10(2)		d10(1)
<i>Ps. stutzeri</i>	e2(1)					
<i>Ps. cepacia</i>	f1(1) f2(1)					
<i>Ps. vesicularis</i>		g6(1)		g6(1)	g6(1) g5(1) g7(1)	
<i>Ps. paucimobills</i>	i2(1)		i7(1)			
souches non identifiées		p44(1)	p45(1)			p43(1)

(), nombre de profils trouvés ; les profils répétés sont en caractères gras.

DISCUSSION

Il apparaît essentiel aujourd'hui de bien connaître la flore bactérienne représentative de l'eau minérale dont la consommation est en progression constante. La connaissance de ces populations autochtones, caractéristiques de chaque source, pourra témoigner de la pureté originelle de ces eaux, et apportera une information biologique plus précise, complétant les caractéristiques physico-chimiques qui elles, sont parfaitement connues.

Les espèces biologiques, naturellement rencontrées au niveau de la source pourraient constituer autant de marqueurs ou d'indicateurs représentatifs d'une constance et donc d'une qualité qui ne varie pas dans le temps. Peu d'études scientifiques ont été publiées sur la flore bactérienne des eaux minérales. Au cours de ce travail, nous avons choisi d'analyser les caractéristiques biologiques de cinq sources françaises d'eau minérale naturelle en se basant sur l'étude de marqueurs moléculaires.

La microflore bactérienne des eaux minérales.

L'eau prélevée, au griffon des sources minérales, montre la présence dans les nappes les mieux protégées, d'une population bactérienne de faible importance numérique (1 à 10 bactéries par millilitre) mais très constante dans le temps. Après l'embouteillage, cette flore se multiplie selon un processus biologique naturel (Schmidt-Lorenz, 1976 ; Leclerc et coll., 1985) jusqu'à atteindre des taux de 10^5 bactéries par millilitre.

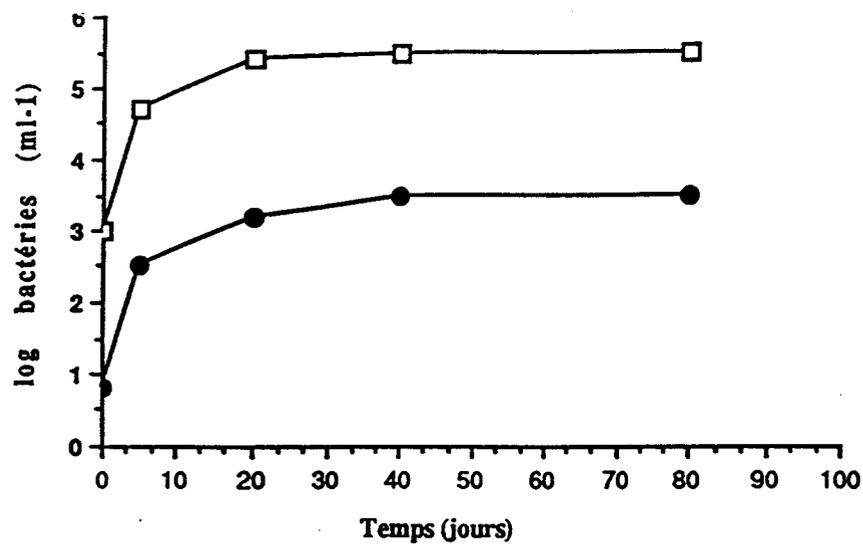
L'état de la cellule bactérienne est un état dynamique qui lui permet de s'adapter aux modifications des facteurs de l'environnement. En particulier, lorsque les nutriments sont en quantité limitée, comme c'est le cas dans les

eaux minérales, elle modifie de façon appropriée les voies métaboliques pour répondre à l'effet de carence. La privation de nutriments (starvation) est une forme de stress pour les bactéries de l'eau. Ainsi dans certaines limites de concentration en substrats, et dans le cas le plus simple, on peut observer deux stratégies de survie: celle des bactéries viables et cultivables, capables de se multiplier et qui forment des colonies sur un milieu favorable, celle des bactéries qui ne sont pas cultivables mais qui n'en sont pas moins viables, dans le sens où elles sont pourvues d'une certaine activité métabolique et d'une énergie d'entretien (Roszak et Colwell, 1987). Cette deuxième population correspond sans doute aux formes végétatives dormantes caractérisées par leur petite taille (cellules naines, minicellules, ultramicrobactéries) mises en évidence parmi les bactéries marines par Morita (1975), Sieburth (1979), et Dawson et coll. (1981).

Dans les eaux minérales naturelles, les travaux de Oger et coll. (1987) ont montré qu'en fait, au captage, une population d'environ 10^3 minibactéries par millilitre, visibles en épifluorescence après coloration par l'acridine orange, était déjà présente (figure 19). Le dénombrement en épifluorescence permet de compter les cellules présentes, vivantes ou non, viables, revivifiables ou moribondes (au sens de Daley, 1979). Au point de vue écologique, il est généralement admis que les minicellules sont des formes de survie à la raréfaction d'éléments nutritifs (Poindexter, 1979) et que cet état est réversible (Wright, 1978 ; Morita, 1982).

La multiplication qui suit l'embouteillage pourrait ainsi avoir pour point de départ une population préexistante de 10^3 minibactéries par

Figure 19. Evolution des bactéries dans l'eau de Vittel
(Grande Source)
(Oger et coll., 1987)



—●— nombre de germes viables en gélose à 30°C en 48 heures

—□— nombre total en épifluorescence

millilitre. Elle ne représenterait donc pas plus de sept ou huit générations et pourrait être déterminée par un apport nutritif minime. Ces résultats remettent totalement en cause la conception traditionnelle d'une multiplication après embouteillage des quelques bactéries cultivables (1 à 10 bactéries par millilitre) préexistant à l'émergence. Depuis quelques années, la microscopie en épifluorescence pose donc en termes nouveaux le problème de l'évolution de la flore bactérienne de l'eau minérale après embouteillage: la multiplication intervient rapidement dès l'embouteillage et de façon identique quelque soit le conditionnement, à partir d'une population de minibactéries non cultivables d'environ 10^3 bactéries par millilitre (Oger et coll. 1987).

Dès la mise en bouteille, d'un écosystème ouvert on passe à un écosystème fermé en "vase clos", une "revivification" plus ou moins lente d'une partie de la microflore totale préexistant dans l'eau apparaît, donnant naissance à des bactéries cultivables, capables de former des colonies sur milieux solides appropriés et pouvant atteindre des taux de 10^5 bactéries par millilitre. On peut donc penser, que la flore hétérotrophe cultivable que nous avons étudiée au cours de ce travail, est bien représentative de la microflore préexistant dans l'eau minérale.

Il n'en est pas moins vrai que de nombreux facteurs peuvent influencer sur le nombre de bactéries cultivables, et que celui-ci est souvent largement sous-estimé. Le plus sérieux écueil est qu'il est évidemment impossible de cultiver sur un milieu unique, la très grande variété des bactéries aquatiques. D'autres variables peuvent intervenir, elles concernent l'échantillon, son stockage, son traitement, le milieu de culture, les conditions d'incubation, etc... Les conditions dans lesquelles les bactéries sont étudiées habituellement

dans les laboratoires ne sont pas comparables avec celles du milieu naturel, aquatique en l'occurrence, dans lequel elles évoluent. Dans le premier cas, les bactéries se multiplient sur des milieux appropriés, riches en composés nutritifs (de l'ordre du gramme). Au contraire, les milieux aquatiques sont oligotrophes, c'est-à-dire pauvres en composés nutritifs (de l'ordre du milligramme ou de la dizaine de milligramme). On peut donc supposer que l'état de carence est habituellement la règle pour les bactéries de l'eau.

D'après Jannash et coll. (1967, 1969, 1979), Schwaller et Schmidt-Lorenz (1980) et Bischofberger et coll. (1990), en ayant recours à un milieu nutritif moins riche et en prolongeant le temps d'incubation, il est possible de cultiver un nombre plus élevé de bactéries. Ainsi dans notre étude, nous avons utilisé une technique d'ensemencement en surface, des temps d'incubation relativement longs (14 jours) et un milieu nutritif pauvre, le milieu Reasoner (Reasoner et Geldreich, 1985) recommandé pour l'étude de la flore hétérotrophe des eaux de boisson (Staley, 1985 ; Edberg et Smith, 1989 ; Reasoner, 1990).

Les résultats de l'analyse phénotypique et leurs limites.

Près de 7% des souches (31 au total) ayant formé des colonies sur milieu primaire d'isolement R₂A, n'ont pas été recultivables sur milieu R₃A. La raison de ces pertes n'a pas été expliquée. Il peut s'agir d'un groupe de bactéries oligotrophes ne pouvant s'adapter sur un milieu plus riche ou ayant des exigences nutritives et écologiques particulières (Kuznetsov et coll., 1979).

La flore hétérotrophe des eaux minérales naturelles, comme tous les travaux cités dans la revue bibliographique l'ont montré, est composée exclusivement de bacilles à Gram négatif, non fermentants, de type oxydatif.

L'ensemble des bactéries possède une vitesse de croissance très lente à normale à 20°C, mais jamais une croissance rapide, selon la définition proposée par Schwaller et Schmidt-Lorenz (1981) et présentée dans le tableau 2. Aucune cellule n'aurait pu former une colonie visible sur un milieu incubé pendant 24 heures. Certains auteurs soulignent également cette tendance physiologique dans le groupe des bacilles à Gram négatif isolés de l'eau (Leifson, 1962a, 1962b ; Buehlmann, 1970 ; Harder et Veldkamp, 1971 ; Yanagita, 1978).

L'analyse phénotypique est rendue difficile par la lenteur de la croissance, retardant les réactions et limitant leur interprétation. Ainsi, un des seuls groupes possédant une croissance normale, les *Pseudomonas fluorescens*, est également un des plus facilement identifiables, même si le caractère le plus spécifique, la production d'un pigment fluorescent, peut être absent selon Seleen et Stark (1943) et Rhodes (1959).

Bien que basée sur un nombre statistiquement important de souches isolées et définies, cette analyse microbiologique à l'émergence de cinq eaux minérales françaises ne prétend pas avoir ainsi dressé l'inventaire complet de tous les germes potentiellement présents et revivifiables dans les eaux.

En accord avec l'ensemble des travaux menés à l'émergence et à l'embouteillage des eaux minérales naturelles, on retrouve dans notre étude les grands groupes bactériens (*Pseudomonas*, *Flavobacterium*, *Comamonas*, *Acinetobacter*, *Xanthomonas*) dans des proportions variables selon les sources. Le genre *Alcaligenes*, bien représenté dans plusieurs études,

notamment celles de Schmidt-Lorenz (1976), Mosso Romeo et coll. (1983) et Bischofberger (1983), est ici absent comme dans les travaux des espagnols Quevedo-Sarmiento et coll. (1986), et de Gonzalez et coll. (1987a). Si des bactéries du genre *Caulobacter* ont été mises en évidence dans les eaux minérales espagnoles (Gonzalez et coll., 1987a), elles n'ont pas été isolées dans notre travail ainsi que dans l'ensemble des autres études menées sur les eaux minérales naturelles européennes.

Comme le font remarquer Quevedo-Sarmiento et coll. (1986), la flore bactérienne relativement stable d'une source à l'autre, ne semble pas dépendre des caractéristiques chimiques et physiques des émergences. Pourtant, Schwaller et Schmidt-Lorenz (1981) parlent déjà pour chaque source d'"empreinte digitale". En effet, les grands groupes bactériens sont communs à toutes les sources, mais dans des proportions variables qui caractérisent chacune d'elles.

La source E contient une flore moins typique des eaux minérales naturelles puisqu'elle ne comprend pas de *Ps. fluorescens* caractéristiques des autres émergences, mais contient en revanche différentes espèces peu ou pas représentées dans les autres sources. Ce sont le cas des espèces *C. testosteroni*, *X. maltophilia*, *A. lwoffii* et *A. radiobacter*. Il s'agit d'une source gazeuse naturelle (le gaz naturel est mélangé à l'eau au moment de l'embouteillage) présentant peut-être des conditions physico-chimiques particulières, très différentes des autres sources.

Les tableaux 9 à 13 montrent, comme on pouvait s'y attendre, que ce sont les groupes bactériens majoritaires, les plus représentatifs de chaque émergence (en général le groupe des *Pseudomonas* et celui des souches non identifiées) qui sont les plus stables dans le temps puisqu'on les retrouve tout

au long de l'échantillonnage. Ces résultats témoignent déjà d'une certaine constance bactériologique de chaque source.

Par ailleurs, le prélèvement β , laissé 20 jours à température du laboratoire, pour donner le temps à la flore lentement revivifiable de se développer, a permis de mettre en évidence une plus grande variété d'espèces. Au bout de 20 jours, la multiplication bactérienne dans la bouteille, qui apparaît plutôt comme une "revivification" plus ou moins lente d'une fraction de la microflore totale, a atteint son taux maximal pouvant aller jusqu'à 10^5 bactéries par millilitre. La constance au cours du temps de la taille de la population bactérienne autochtone montre que l'on a à faire à un écosystème bactérien stable dont l'équilibre est réglé par les conditions physico-chimiques du milieu où elle vit.

Dans notre étude, sur les 460 souches isolées au niveau des cinq sources, 258, soit 56% ne peuvent être identifiées au niveau de l'espèce. Ce pourcentage est d'ailleurs fortement sous-estimé si l'on considère l'ensemble des souches reconnues comme des *Ps. fluorescens*. Pour cette espèce, en effet, sur les 100 souches qui ont été isolées et les 59 d'entre elles qui ont été étudiées par ribotypie, nous avons mis en évidence 20 profils de restriction des gènes ARNr (a1 à a20). Cette diversité des profils à l'intérieur de l'espèce actuellement définie, suggère, comme l'a déjà fait remarquer Van der Kooij (1979), que celle-ci est beaucoup plus un regroupement hétérogène de souches qu'une véritable espèce génomique, selon la définition de Wayne (1987). Dans ces conditions, on peut admettre sans risque, que près de 80% (358/460) des souches rencontrées au cours de ce travail ne peuvent faire l'objet d'une identification spécifique.

Comme l'ont montré Balkwill et coll. (1989) et Fredrickson et coll. (1991), le système API est peu performant pour l'identification des bactéries aquatiques et de subsurfaces. En réalité, les méthodes d'identification modernes, basées sur la recherche des caractères phénotypiques, sont incapables de révéler ce que la classification n'a pas encore établi avec rigueur. En effet, la taxonomie des groupes, des genres ou des familles auxquels appartiennent les souches de l'eau, est encore balbutiante et peu concordante d'un auteur à l'autre. Reasoner et Geldreich (1985) ont rapporté la difficulté à caractériser et identifier la plupart des bactéries à Gram négatif, non fermentantes, du milieu aquatique.

De plus si l'on considère le genre *Pseudomonas*, majoritairement représenté dans les eaux, il constitue un groupe très vaste et très hétérogène encore bien méconnu malgré les nombreux travaux de Stanier et coll. (1966), de Palleroni (1984), de Palleroni et coll. (1971, 1972, 1973), de Van der Kooij (1979), et de Johnson et Palleroni (1989). Plus récemment une étude taxonomique réalisée sur des *Pseudomonas* de l'environnement aquatique par Aznar et coll. (1992) confirme la très grande variété d'espèces et de sous-espèces appartenant au même genre. Il est probable que de nombreuses années d'étude, basées sur les techniques d'hybridation moléculaire (ADN-ADN, ADN-rARN) ou de séquençage moléculaire, seront encore nécessaires, avant que ne soit élaborée une classification acceptable.

Il faut en conséquence, tenir compte du caractère relatif de l'identification des espèces bactériennes appartenant à des groupements exigeant encore pour être mieux connus de gros progrès taxonomiques. C'est le cas ici, avec les bacilles à Gram négatif, non fermentants, abondamment représentés dans l'environnement aquatique.

Application des profils de restriction des gènes ARNr à l'étude de la flore bactérienne des eaux minérales.

Cette impossibilité momentanée, que l'on a d'identifier les souches représentatives des eaux minérales naturelles en leur donnant un nom d'espèce à l'aide de caractères phénotypiques, peut être heureusement contournée. Il est possible même préférable (mais plus complexe) de mettre en évidence les caractères génomiques de ces souches, caractères liés à la structure de leur ADN. Puisque les acides nucléiques portent l'information caractérisant les individus, des méthodes d'étude du génome devraient pouvoir individualiser les souches bactériennes. Depuis quelques années, l'épidémiologie moléculaire basée sur l'analyse du génome bactérien, a pris un essor considérable (Audurier et Gallou, 1988 ; Tenover, 1988 ; De Barbeyrac et Bebear, 1990 ; Piemont et coll., 1990 ; Wachsmuth et coll., 1991) ; récemment Richardson et coll. (1991) ont montré l'intérêt des sondes génomiques appliquées à l'industrie de l'eau.

Grimont et Grimont (1986) ont proposé l'utilisation d'une sonde unique ARNr 16S + 23S d'*E. coli*, pour visualiser les fragments de restriction portant des séquences complémentaires de ces ARN, et en faire un outil d'identification et de typage moléculaire universel. Sans connaissance préalable d'un groupe bactérien, il est maintenant possible, grâce au profil de restriction des gènes ARNr, de caractériser et de comparer des souches appartenant à n'importe quelle espèce. Cette méthode d'identification, basée sur le polymorphisme des fragments de restriction des gènes ribosomiaux, a l'avantage de permettre le typage de bactéries difficiles à identifier par les méthodes traditionnelles. Le profil de restriction des gènes ARNr exprime une gamme d'informations propres à l'espèce, à la sous-espèce ou à la souche, selon le degré d'hétérogénéité génomique à l'intérieur de l'espèce. Il est à la

fois un outil taxonomique et un marqueur épidémiologique moléculaire de grande précision, et de haute comparabilité dans le temps et dans l'espace.

Pour caractériser la flore bactérienne des eaux minérales, il fallait choisir une sonde nucléique unique, capable de reconnaître des séquences génomiques spécifiques chez des bactéries appartenant à un grand nombre d'espèces différentes, encore bien mal définies taxonomiquement. Les séquences ribosomales étant très conservées au cours de l'évolution, elles peuvent être mises en évidence par une sonde unique, chez l'ensemble des procaryotes. Ainsi, les profils de restriction des gènes ribosomiaux constituaient les marqueurs moléculaires les mieux adaptés à l'étude de la flore bactérienne des eaux minérales.

Le choix de l'enzyme de restriction était important. Il fallait choisir une enzyme unique pour l'ensemble de l'étude. L'enzyme PvuII a été sélectionnée parmi une vingtaine d'enzymes, testées sur huit souches appartenant à des espèces bactériennes les plus communément trouvées dans les eaux minérales. Après digestion totale des huit ADN génomiques, on obtenait huit profils de restriction différents, parfaitement interprétables, composés de deux à neuf bandes.

Analyse des résultats basés sur les ribotypes.

Alors que les moyens traditionnels d'identification basée sur des caractères phénotypiques ne révèlent pas de différences majeures entre les sources, l'analyse par les profils de restriction des gènes ARNr est très discriminante. Les 208 souches étudiées se sont réparties en 102 ribotypes distincts. Chaque émergence est caractérisée par un ensemble de profils qui

lui est propre, à quelques exceptions près. En effet, 2 types de profils sont communs à plusieurs sources: le profil b1 (*Ps. putida*) est commun aux sources A et B ; le profil i2 (*Ps. paucimobilis*) est commun aux sources A, D et E.

La source A est riche de 17 profils qui la spécifient totalement par rapport à la source C ; 16 de ces profils la différencient de la source B (b1 commun avec B), et 16 des sources D et E (i2 commun avec D et E). La source B comprend 18 profils qui lui sont tous propres par rapport à C et D ; 17 de ces profils la distinguent de A. La source C est caractérisée par le maximum de profils (29 au total) qu'aucune des autres sources ne partagent pour aucun d'entre eux. La source D est forte de 26 profils qui lui sont tous spécifiques par rapport à B et C ; 1 seul de ceux-ci (i2) est commun avec les sources A et E. Enfin, la source E révèle 15 profils dont un seul (i2) est commun avec A et D.

La spécificité biologique des eaux minérales, mise en évidence au cours de l'année 1989-1990, grâce aux marqueurs moléculaires que sont les profils de restriction des gènes, avait déjà été entrevue par Schwaller et Schmidt-Lorenz en 1981. En effet, à l'issue de leur étude sur la composition de la flore bactérienne de cinq eaux minérales françaises, ces auteurs parlaient déjà "d'empreinte digitale" de chaque source donnée d'un point de vue qualitatif (espèces représentatives) et quantitatif (proportions respectives des espèces).

Cette spécificité biologique de chaque source est mise en évidence à partir d'un lot de souches relativement faible (208). On peut supposer qu'elle doit être encore plus forte, c'est-à-dire que le nombre de profils aurait été considérablement plus élevé si le nombre d'échantillons soumis à l'étude et donc le nombre de souches avait été également plus élevé.

Dans le cas des eaux minérales naturelles, la présence de cellules bactériennes à l'émergence est probablement la résultante d'un long processus d'évolution (mutations et sélections). Les clones, c'est-à-dire les populations bactériennes obtenues à partir de ces cellules initiales, forgées à travers les siècles dans les strates géologiques, doivent être très spécifiques de chaque gisement et de son émergence. Elles sont à la base des qualités originelles et naturelles de l'eau minérale. Leur caractérisation au niveau de l'espèce, même lorsque la classification aura été mieux élaborée, ne peut être que faiblement discriminante. Les profils de restriction de gènes ARNr, au contraire, ont un pouvoir d'information et de discrimination élevé.

Un autre aspect des ribotypes a été étudié: c'est celui de leur distribution dans le temps. Les six échantillons successifs (I à VI) ont été réalisés tous les 2 mois au cours d'une année d'étude. Les tableaux 14 à 18 représentent à cet effet, pour chaque source, la distribution des profils en fonction de l'échantillonnage. Pour chaque émergence, un nombre notable d'entre eux se retrouve dans plusieurs échantillons successifs (de 2 à 4) avec une fréquence globale de 2 à 12 (nombre de profils identiques répétés).

Pour la source A, les profils a1 et b1 apparaissent dans quatre échantillons différents et les profils a2, g3, p4 et p6 dans deux échantillons. Pour la source B, les profils c1, d1, d5, p9 et p11 se retrouvent dans deux échantillons. Pour la source C, les profils a7, k1 et p31 se répètent dans trois échantillons et d7, j1 et p28 dans deux échantillons. Pour la source D, le profil i2 se retrouve dans trois échantillons et les profils a13, a14, a15, a18, a20, i5, i6 et p39 dans deux échantillons. Enfin, pour la source E, le profil g6 est mis en évidence dans trois échantillons et c3 et d10 dans deux échantillons.

Il est sûr que les souches isolées à partir du même prélèvement, et b présentant le même aspect morphologique, le même profil API, ainsi que le même profil de restriction des gènes sont issues du même clone initial et n'apportent guère d'information sur la constance biologique de la source. C'est par exemple le cas des six souches de *Ps. fluorescens* de type a1 de l'échantillon I (source A). Par contre, le fait de retrouver le même profil a1 dans les échantillons successifs I, II, III et V et donc à 2, 4, 6 et 8 mois d'intervalle témoigne d'une certaine constance biologique de la source A.

Le tableau 19 dresse la liste des profils retrouvés dans au moins deux échantillons différents, associés à leur fréquence. Il montre que 29 ribotypes sur les 102 distincts au total, sont observés dans au moins deux échantillons. Sept d'entre eux se retrouvent dans trois ou quatre échantillons successifs. Cependant, il faut tenir compte du nombre de fois où un même profil se répète, soit 103 répétitions sur un total de 208 profils. Cette continuité biologique s'exprime à travers un nombre moyen (5 à 6) de profils conservés au cours de l'échantillonnage dans les cas des sources A, B et C, plus faible dans le cas de la source E (3 profils), et élevé pour la source D (9 profils), mais ceux-ci ne se répètent que 2 ou 3 fois au maximum.

L'ensemble de ces résultats laissent entrevoir une certaine continuité biologique propre à chaque source, caractérisée par une série de ribotypes spécifiques. Certes, l'étude n'a été réalisée que sur une année, or pour parler de véritable stabilité biologique, il faudrait étudier un plus grand nombre de souches sur une durée beaucoup plus longue. Il faut cependant rappeler que la technique des profils de restriction de gènes est une technique lourde et donc difficilement applicable en routine. Nos résultats, s'ils restent à approfondir, témoignent déjà d'une spécificité et d'une certaine constance

biologique des eaux minérales naturelles, observées au cours de l'année 1989-1990.

Cependant, plusieurs facteurs peuvent modifier l'expression statistique de ces profils (nombre, répétition). (1) Le choix des 10 souches représentatives de chaque échantillon a été effectué sur la base de quelques caractères morphologiques (mobilité, gram, morphologie cellulaire) et cultureux (type de colonie, pigmentation, taille, etc...) ; cette sélection est nécessairement faite dans les laboratoires de chacune des marques d'eau minérale et par des personnes différentes. (2) 208 souches ont été choisies au hasard parmi les 460 au total, ce qui constitue un nombre relativement faible. (3) Il faut aussi tenir compte de l'échantillonnage opéré au cours de l'année d'étude ; 6 séries de prélèvements ont été effectuées, ce qui peut paraître, à priori, faiblement représentatif de l'état biologique d'une source qui peut varier plus ou moins fortement dans l'année. Il est possible de penser, qu'en standardisant davantage la sélection des souches soumises à l'étude, en augmentant leur nombre et en améliorant la stratégie d'échantillonnage, on tendrait à obtenir des résultats plus significatifs.

Tableau 19. Stabilité des profils de restriction des gènes ARNr
des eaux minérales A, B, C, D et E

	A	B	C	D	E
Type de	12 (a1)	3 (c1)	3 (a7)	3 (a13)	4(c3)
profils et	5 (a2)	2 (d1)	3 (d7)	3 (a14)	3(d10)
fréquence	8 (b1)	4 (d5)	3 (j1)	2 (a15)	3(g6)
	2 (g3)	8 (p9)	4 (k1)	3 (a18)	
	2 (p4)	2 (p11)	2 (p28)	2 (a20)	
	4 (p6)		4 (p31)	3 (i2)	
				2 (i5)	
				2 (i6)	
				2 (p39)	

CONCLUSION

Nous avons mené une étude sur la flore bactérienne de cinq eaux minérales naturelles françaises, dans le but de mieux connaître les caractéristiques biologiques de chaque source et d'étudier leur évolution dans le temps, au cours de l'année 1989-1990. Dès la mise en bouteille, une fraction de la microflore totale de l'eau, non cultivable, est "revivifiée" plus ou moins lentement et devient capable de former des colonies sur milieux de culture appropriés. La flore bactérienne hétérotrophe et cultivable que nous avons étudiée est donc représentative de la microflore de l'eau préexistant au captage. Néanmoins, de manière à obtenir le plus grand nombre de bactéries potentiellement cultivables, nous avons essayé de travailler dans les conditions les mieux adaptées à l'étude de la flore autochtone de l'eau minérale, qui se développe naturellement dans des milieux oligotrophes, pauvres en nutriments. L'analyse de la flore bactérienne basée sur les caractères phénotypiques des souches s'est révélée peu performante: 43,9% des souches seulement ont pu être identifiées à l'espèce. Il s'agit d'espèces appartenant aux grands groupes bactériens (*Pseudomonas*, *Flavobacterium*, *Comamonas*, *Acinetobacter*, *Xanthomonas*) communément trouvés dans les eaux minérales naturelles mais bien peu connus taxonomiquement. Par contre, l'application des profils de restriction des gènes codant pour les ARN ribosomiaux à l'étude de la flore bactérienne des eaux minérales s'est révélée particulièrement fructueuse. Il a été possible de caractériser des souches difficilement identifiables par les moyens traditionnels. Les résultats de l'analyse ribotypique ont permis de mettre en évidence une spécificité biologique de chaque source, chacune étant caractérisée par un ensemble de profils qui lui est propre. Pour les cinq émergences, un nombre notable de profils a été retrouvé périodiquement au cours de l'année étudiée. Ces résultats témoignent d'une certaine constance biologique de chaque source, qui, si elle n'est pas totale reste cependant digne d'intérêt. Les ribotypes,

caractéristiques de chaque émergence, se retrouvant tout au long de l'échantillonnage, sont les témoins des qualités originelles et naturelles des sources étudiées.

Il serait intéressant, dans l'avenir, de réaliser une étude comparable, basée sur l'utilisation de marqueurs moléculaires, entre l'émergence et l'eau embouteillée. En effet, certains facteurs de modifications biologiques sont susceptibles d'intervenir entre le captage et l'embouteillage et peuvent modifier le microbisme de l'eau. Les espèces biologiques naturellement rencontrées au niveau de la source peuvent constituer autant d'indicateurs ou de marqueurs de spécificité, invariables dans le temps, pouvant être conservés et mis en évidence dans l'eau embouteillée. Au contraire, l'apparition d'espèces nouvelles au cours de l'embouteillage, serait significative d'une modification plus ou moins importante, sans pour autant qu'elle traduise un quelconque risque sanitaire. Cette étude n'est évidemment qu'une piste possible parmi beaucoup d'autres dans le champ de recherche très vaste que constituent les eaux minérales naturelles.

ANNEXE

Composition des milieux de culture et réactifs utilisés

I. MILIEUX DE CULTURE

Composition des milieux R₂A et R₃A (milieux de Reasoner et Geldreich, 1989)

Ingrédient	Concentration (g/litre)	
	R ₂ A	R ₃ A
Yeast extract difco	0,5	1,0
Proteose peptone n°3, difco	0,5	1,0
Casamino acids, difco	0,5	1,0
Glucose	0,5	1,0
Amidon	0,5	1,0
Pyruvate de sodium	0,3	0,5
K ₂ HPO ₄	0,3	0,6
MgSO ₄ - 7 H ₂ O	0,05	0,1
Agar	15,0	15,0

Le pH final du milieu est ajusté à 7,2 avec une solution de KH₂PO₄ avant l'ajout de l'agar. Puis l'agar est ajouté et dissous en portant le milieu à ébullition. Le milieu est alors autoclavé pendant 15 minutes à 121°C.

II. REACTIFS

1. Réactifs utilisés pour l'extraction de l'ADN bactérien

1.1. Solution saline d'éthylène diaminotétra-acétate (EDTA)

EDTA 0,1M -----> 29,225g

NaCl 0,15M -----> 8,766g

eau distillée qsp 1000ml

Ajuster à pH = 8 ou pH = 7 avec une solution aqueuse de NaOH (5N)

selon le pH désiré.

1.2. Solution de NaOH 0,03M

Préparer à partir d'une solution stock de NaOH 5M

1.3. Dodecyl sulfate de sodium 25%

Dodecyl sulfate de sodium -----> 25g

Eau distillée -----> 100ml

Verser très lentement le SDS dans l'eau distillée légèrement chauffée.

Conserver à 37°C.

1.4. Solution NaCl 5M

NaCl -----> 29,22g

Eau distillée -----> 100ml

1.5. Mélange chloroforme - alcool isoamylique

Chloroforme (Prolabo)-----> 24 volumes

Alcool isoamylique (Prolabo)----> 1 volume

1.6. Alcool éthylique à 95%

Conserver à -20°C

1.7. Isopropanol (RP Prolabo)**1.8. Solution saline citratée (= SSC)**

NaCl-----> 8,766g

Citrate trisodique-----> 4,411g/l

Eau distillée qsp -----> 1000ml

Ajuster à pH = 7 avec une solution d'acide chlorhydrique (N/10).

Conserver à +4°C.

Remarques : 0,1 SSC : diluer au 1/10 la solution précédente

10 SSC : multiplier les quantités de NaCl et de citrate trisodique par 10

1.9. Solution de Pronase E (Serva) 0,2%

Pronase -----> 10 mg

SSC (1X) -----> 5 ml

Laisser 2 heures à 37°C puis conserver à +4°C.

1.10. Solution de Ribonucléase RNase (Serva) 0,2%

Ribonucléase -----> 10 mg

SSC (1X) -----> 5 ml

Après dissolution chauffer 10 minutes au bain-marie à 100°C
puis conserver à -20°C.

2. Tampons d'électrophorèse**2.1. Solution Tris Borate EDTA (5X) (TBE (5X))**

Tris -----> 53,9 g

Acide borique -----> 27,5 g

EDTA -----> 2,9 g

Eau distillée qsp -----> 1000ml

le pH est ajusté à 8 avec de l'HCl (N).

2.2. Colorant de dépôt

Bleu de bromophenol -----> 25 mg

Glycérol -----> 5 ml

eau distillée -----> 5 ml

3. Solutions de transfert**3.1. Solution de dépurination**

solution de HCl 0,25 N

3.2. Solution de dénaturation

NaCl -----> 87,6 g

NaOH -----> 20,0 g

eau distillée qsp -----> 1 l

3.3. Solution de neutralisation

Tris (1 M) -----> 121,1 g

NaCl (1,5 M) -----> 87 g

eau distillée qsp -----> 1 l

3.4. Solution de transfert

solution de SSC (X20)

4. Solutions d'hybridation

La préhybridation et l'hybridation sont réalisées avec la solution "Rapid Hybridation buffer" commercialisée par Amersham.

Les réactifs de marquage sont vendus avec le kit de marquage "random priming" (Multiprime DNA labelling system - Amersham Little Chalfort United Kingdom).

Le ($\alpha^{32}\text{P}$) dCTP est fourni également par Amersham.

BIBLIOGRAPHIE

- Altwegg, M., et Mayer, L.W. 1989. Bacterial molecular epidemiology based on a non-radioactive probe complementary to ribosomal RNA. *Res. Microbiol.* 140, 325-333.
- Altwegg, M., Hickman-Brenner, F.W., et Farmer, J.J.III. 1989. Ribosomal RNA gene restriction patterns provide increased sensitivity for typing *Salmonella typhi* strains. *J. Infect. Dis.* 160, 145-149.
- Amikan, D., Glaser, G., et Razin, S. 1984. Mycoplasmas (Mollicutes) have a low number of rRNA genes. *J. Bacteriol.* 158, 376-378.
- Anderson, D.J., Kuhns, J.S., Vasil, M.L., Gerding, D.N., et Janoff, E.D. 1991. DNA fingerprinting by pulsed field gel electrophoresis and ribotyping to distinguish *Pseudomonas cepacia* isolates from a nosocomial outbreak. *J. Clin. Microbiol.* 29, 648-649.
- Anon. 1980. Directive du Conseil du 15 juillet 1980 relative au rapprochement des législations des états membres concernant l'exploitation et la mise dans le commerce des eaux minérales naturelles (80/777/CEE). *Journal Officiel des communautés européennes.* No L229/1-10.
- Anon. 1982. Food and Agriculture Organization/World Health Organization (F.A.O./W.H.O.). Report of the thirteenth session of the coordinating committee for Europe 1992. Codex Alimentarius Commission. Alinorm 83/19, FAO, 1983, Rome.
- Anon. 1985. Standard methods for the examination of water and wastewater, 16th. edn. pp. 827-917. Washington, D.C.: American Public Health Association.
- Audurier, A., et Gallou, G. 1988. Bactéries responsables des infections nosocomiales et leur typisation. *Rev. Fr. des Lab.* 170, 33-36.
- Aznar, R., Alcaide, E., et Garay, E. 1992. Numerical taxonomy of *Pseudomonads* isolated from water, sediments et eels. *System. Appl. Microbiol.* 14, 235-246.
- Baldini, I., Current, E., et Scandelari, E. 1973. Rilievi e osservazioni sulle modificazioni, nel tempo, della flora microbica naturale di un' acqua minerale imbottigliata in relazione al giudizio igienico. *Ann. San. Publ.* 33, 1009-1021.
- Balkwill, D.L., Fredrickson, J.K., et Thomas, J.M. 1989. Vertical and horizontal variations in the physiological diversity of the aerobic chemoheterotrophic bacterial microflora in deep southeast coastal plain subsurface sediments. *Appl. Environ. Microbiol.* 55, 1058-1065.
- Barbesier, J. 1970. Aspects microbiologiques et physico-chimiques du conditionnement de l'eau et des boissons hygiéniques en emballages plastiques. S.A. des Eaux Minérales d'Evian. Compte rendu des journées d'étude: 3-4 juin.
- Beji, A., Izard, D., Gavini, F., Leclerc, H., Leseine-Delstanche, M., et Krembel, J. 1987. A rapid chemical procedure for isolation and purification of chromosomal DNA from Gram-negative bacilli. *Anal. Biochem.* 161, 18-23.

- Bercovier, H., Kafri, O., et Sela, S. 1986. Mycobacteria possess a surprisingly small number of ribosomal RNA genes in relation to the size of their genome. *Biochem. Bioph. Res. Com.* 136, 1136-1141.
- Bialkowska-Hobrzanska, V.H., Jaskot, D., et Hammerberg, O. 1990. Typing of coagulase-negative *staphylococci* by southern hybridization of chromosomal DNA fingerprints using a ribosomal RNA probe. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 9, 588-594.
- Bischofberger, T. 1983. Oligotrophe bakterien im natürlichen mineral wasser und ihre spezifischen Eigenschaften. Diss. ETH-Zürich, N° 7230.
- Bischofberger, T., CHA, S.K., Schmitt, R., Bärbelkonig, et Schmidt-Lorenz, W. 1990. The bacterial flora of non-carbonated, natural mineral water from the springs to reservoir and glass and plastic bottles. *Int. J. Food Microbiol.* 11, 51-72.
- Blake, P.A., Rosenberg, M.L., Costa, J.B., Ferreira, P.S., Guimaraes, C.L., et Gangarosa, E.J. 1977. Cholera in Portugal, 1974. I. Modes of transmission. *Am. J. Epid.* 105, 337-348.
- Bornstein, N., Marmet, D., Surgot, M., Nowidki, M., Arslan, A., Esteve, J., et Fleurette, J. 1987. Surveillance prospective clinique et sérologique des sujets exposés à des contacts fréquents avec une eau thermale contenant des *Legionella*. Colloque Legionella, Lyon.
- Brenner, D.J. 1984. *Enterobacteriaceae*. In Bergey's manual of Systematic Bacteriology. vol. 1. ed. krieg, N.R. & Holt, J.G. pp 408-420. Baltimore: Williams & Wilkins.
- Brosius, J., Dull, T.J., Sleeter, D.D., et Noller, H.F. 1981. Gene organization and primary structure of a ribosomal RNA operon from *Escherichia coli*. *J. Mol. Biol.* 148, 107-127.
- Brown, M.P.W. 1968. Survival of *Pseudomonas aeruginosa* in fluorescens solution preservative action of PMN and EDTA. *J. Pharmac. Sci.* 57, 389-392.
- Buehlmann, X. 1970. Psychrophile keime in wasser: Verhalten und praktische bedeutung, *Alimenta.* 9, 22-29.
- Buttiaux, R. 1960. La surveillance bactériologique des eaux minérales embouteillées et en boîtes. *Ann. Inst. Pasteur, Lille,* 11, 23-38.
- Buttiaux, R., Beerens, H., et Tacquet, A. 1974. Manuel de techniques bactériologiques. Flammarion ed. Médecine. Sciences.
- Buttiaux, R., et Boudier, A. 1960. Comportements des bactéries autotrophes dans les eaux minérales conservées en récipients hermétiquement clos. *Ann. Inst. Pasteur, Lille,* II, 43-83.
- Caroli, G., Eglelevre, Armani, G., Biffi-Gentili, S., et Molinari, G. 1985. Search for acid-fast bacilli in bottled mineral waters. *J. Appl. Bacteriol.* 58, 461-464.
- Collins, V.G., et Willoughby, L.G. 1962. The distribution of bacteria and fungal spores in blelham tarn with particular reference to an experimental overturn. *Arch. Mikrobiol.* 43, 294-307.

- Colwell, R.R., Brayton, P.P., Grimes, D.J., Roszak, D.B., Huq, S.A., et Palmer, L.M. 1985. Viable but non-culturable *Vibrio cholerae* and related pathogens in the environment: implications for release of genetically engineered microorganisms. *Biotechnology*, 3, 817-820.
- Craun, G.F. 1986. *Waterborne diseases*. CRC Press.
- Daley, R.J. 1979. "Direct epifluorescence enumeration of native aquatic bacteria: enumeration, activity and ecology". American Society for testing and materials, Philadelphia. J.W. Costerton et R.R. Colwell, Ed. 20-45.
- Dawson, H.P., Humphrey, B.A., et Marshall, K.C. 1981. Adhesion : a tactic in the survival strategy of a marine *vibrio* during starvation. *Curr. Microbiol.*, 6, 195-199.
- De Buyser, M.L., Morvan, A., Grimont, F., et El Solh, N. 1989. Characterization of *Staphylococcus* species by ribosomal RNA gene restriction patterns. *J. Gen. Microbiol.* 135, 989-999.
- De Felip, G., Toti, L., et Iannicelli, P. 1976. Osservazioni comparative sull' andamento della flora microbica della acque minerali naturali confezionate in vetro "PVC" et "tetrabrik". *Ann. Inst. Super. Sanita.* 12, 203-209.
- Delabroise, A.M., et Ducluzeau, R. 1974. Le microbisme naturel de l'eau minérale, son développement, son innocuité sur l'organisme. *Ann. Hyg. Méd. Nutr.* 10, 189-192.
- De La Rosa Jorge, M.C., Diaz Alonzo, F., Mosso Romeo, M.A., et Gaston de Iriarte, E. 1983. Microbiologia de las aguas minero-medicales de Alhama de Aragon. *Ann. Real. Acad. Farm.* 49, 381-388.
- de Barbeyrac, B., et Bebear, C. 1990. Application de la biologie moléculaire en bactériologie médicale. *Rev. Fr. des Lab.* 209, 111-126.
- Del Vecchio, V.E., et Fischetti, M. 1972. Andamento nel tempo della flora saprofitica presente in acque minerali: confronto fra contenitori di vetro e contenitori di plastica. *Nuovi Ann. Ig. Microbiol.* 23: 259-277.
- Dive, D., Picard, J.P., et Leclerc, H. 1979. Les amibes dans les eaux d'alimentation: évaluation des risques. *Ann. Inst. Pasteur/Microbiol.* 130A, 487-498.
- Dow, C.S., et Lawrence, A. 1980. Microbial growth and survival in oligotrophic freshwater environments. *Soc. Appl. Bacteriol. Tech. Ser. GBR.* 15, 1-20.
- Ducluzeau, R. 1976. La signification du nombre et de la nature des microorganismes telluriques présents dans l'eau minérale à l'émergence. *Ann. Inst. Super. Sanita.* 12, 170-176.
- Ducluzeau, R., Bochand, J.M., et Dufresne, S. 1976a. La microflore autochtone de l'eau minérale: nature, caractères physiologiques, signification hygiénique. *Med. Nutr.* XII, n°2, 115-119.

- Ducluzeau, R., Dufresne, S., et Bochand, J.M. 1976b. Inoculation of the digestive tract of axenic mice with the autochthonous bacteria of mineral water. *Eur. J. Appl. Microbiol.* 2, 127-134.
- Ducluzeau, R., Hudault, S., et Galpin, J.V. 1976c. Longevity of various bacterial strains of intestinal origin in Gas-Free mineral water. *Eur. J. Appl. Microbiol.* 3, 227-236.
- Ducluzeau, R., Hudault, S., et Galpin, J.V. 1977. Influence du conditionnement sur la croissance d'une souche autochtone de *Pseudomonas fluorescens* dans l'eau minérale de la Grande Source Vittel. *Ann. Inst. Hydrol. Clin.*, XLVII, n° spécial, Journées d'Hydrologie de Nancy, 77-90.
- Ducluzeau, R., Nicolas, J.L., Galpin, J.V., et Raibaud, P. 1984. Influence of autochthonous bacteria of the longevity of *Escherichia coli* in bottled mineral water. *Sciences des Aliments.* 4, 585-594.
- Ducluzeau, R., et Raibaud, P. 1979. *Ecologie microbienne du tube digestif.* Masson ed., Paris.
- Duquino, H.H., et Rosenberg, F.A. 1986. Antibiotic-resistant *Pseudomonas* in bottled drinking water. *Can. J. Microbiol.* 33, 286-289.
- Edberg, S.C., et Smith, D.B. 1989. Absence of association between total heterotrophic and total coliform bacteria from a public water supply. *Appl. Environ. Microbiol.* 55, 380-384.
- Edling, T.D., et Bassel, A.R. 1980. Electron microscopic mapping of secondary structures in bacterial 16S and 23S ribosomal ribonucleic acid and 30S precursor ribosomal ribonucleic acid. *J. Bacteriol.* 141, 365-373.
- Falcao, D.P. 1972. Nursery outbreak of severe diarrhea due to multiple strains of *Pseudomonas aeruginosa*. *Lancet* II, 38-42.
- Ferguson, R.L., et Rublee, P. 1976. Contribution of bacteria to standing crop of coastal plankton. *Limnol. Oceanogr.* 21, 141-145.
- Ferley, J.P., Zmirou, D., Collin, J.F., et Charrel, M. 1986. Etude longitudinale des risques liés à la consommation d'eaux non conformes aux normes bactériologiques. *Rev. Epidem. et Santé Publ.* 34, 89-99.
- Fijksdal, L., Vik, E.A., Mills, A., et Stanley, J.T. 1982. Non standard methods for enumerating bacteria in drinking water. *Ann. Water Works Assoc.* 7, 313-315.
- Florman, A.L., et Schifrin, H. 1950. Observations on a small outbreak of infantile diarrhea with *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Pediatr.* 36, 758-762.
- Fouassin, A., et Liebens-Bisqueret. 1977. Influence de la composition des eaux de boisson sur la migration des constituants du matériau de conditionnement. *Méd. et Nut.* XIII, 1, 35-39.

- Fox, G.E., Stackebrandt, E., Hespell, R.B., Gibson, J., Maniloff, J., Dyer, T.A., Wolfe, R.S., Balch, W.E., Tanner, R.S., Magrum, L.J., Zablen, L.B., Blakemore, R., Gupta, R., Bonen, L., Lewis, B.J., Stahl, D.A., Luehrsen, K.R., Chen, K.N., et Woese, C.R. 1980. The phylogeny of prokaryotes. *Science*. 209, 457-463.
- Fredrickson, J.K., Balkwill, D.L., Zachara, J.M., Li, S.W., Brockman, F.J., et Simmons, M.A. 1991. Physiological diversity and distributions of heterotrophic bacteria in deep cretaceous sediments of the atlantic coastal plain. *Appl. Environ. Microbiol.* 57, 402-411.
- Gadberry, J.L., Clemmons, K., et Drumm, K. 1980. Evaluation of methods to detect oxidase activity in the genus *Pasteurella*. *J. Clin. Microbiol.* 12, 220-225.
- Geiss, H.K., Piotrowski, H.D., et Hingst, V. 1985. Evaluation of API 20 NE in routine diagnostics of non fermenting Gram-negative rod-shaped bacteria. *Zbl. Bakt. Mikrobiol. Hyg. A. Med.* 259, 35-42.
- Geldreich, E.E., et Clark, H.F. 1965. Distilled water suitability for microbiological applications. *J. Milk and Food Technol.* 28, 351-355.
- Geldreich, E.E., Nash, H.D., Reasoner, D.J., et Taylor, R.H. 1975. The necessity of controlling bacterial populations in potable waters-bottled and emergency water supplies. *J. Am. Water Works Assoc.* 67, 117-124.
- Ginsburg, D., et Steitz J.A. 1975. The 30S ribosomal precursor RNA from *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* 250, 5647-5654.
- Gonzalez, C., Gutierrez, C., et Grande, T. 1987a. Bacterial flora in bottled uncarbonated mineral drinking water. *Can. J. Microbiol.* 33, 1120-1125.
- Gonzalez, C., Ramirez, C., et Pereda, M. 1987b. Multiplication and survival of *Pseudomonas aeruginosa* in uncarbonated natural mineral water. *Microbiol. Alim. Nutr.* 4, 111-115.
- Gottlieb, P., et Rudner, R. 1985. Restriction site polymorphism of ribosomal ribonucleic acid gene sets in members of the genus *Bacillus*. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 35, 244-252.
- Goulet, P., et Picard, B. 1984. Distinctive electrophoretic and isoelectric focusing patterns of esterases from *Yersinia enterocolitica* and *Yersinia pseudotuberculosis*. *J. Gen. Microbiol.* 130, 1471-1480.
- Grimont, F., Chevrier, D., Grimont, P.A.D., Lefevre, M., et Guesdon, J.L. 1989a. Acetylaminofluorene-labelled ribosomal RNA for use in molecular epidemiology and taxonomy. *Res. Microbiol.* 140, 447-454.
- Grimont, F., et Grimont, P.A.D. 1986. Ribosomal ribonucleic acid gene restriction patterns as potential taxonomic tools. *Ann. Inst. Pasteur/Microbiol.* 137B, 165-175.
- Grimont, F., et Grimont, P.A.D. 1991. La carte d'identité moléculaire des bactéries. *Bull. Soc. Fr. Microbiol.* 6, 9-12.

- Grimont, F., Lefevre, M., Ageron, E., et Grimont, P.A.D. 1989b. rRNA gene restriction patterns of *Legionella* species: a molecular identification system. Res. Microbiol. 140, 615-626.
- Gustafarro, C.A., et Persing, D.H. 1992. Chemiluminescent universal probe for bacterial ribotyping. J. Clin. Microbiol. 30, 1039-1041.
- Harder, W., et Veldkamp, H. 1971. Competition of marine psychrophilic bacteria at low temperatures. Antonie V. Leeuwenhoek. 37, 51-63.
- Hobbie, J.E., Daley, R.J., et Jasper, S. 1977. Use of nucleopore filters for counting bacteria by fluorescence microscopy. Appl. Envir. Microbiol. 33, 1225-1228.
- Hugh, R., et Leifson, E. 1953. The taxonomic significance of fermentative versus oxidative metabolism of carbohydrate by various Gram-negative bacteria. J. Clin. Microbiol. 26, 1535-1538.
- Hunter, P.R., et Burge, S.H. 1987. The bacteriological quality of bottled natural mineral waters. Epidem. Inf. 99, 439-443.
- Irino, K., Grimont, F., Casin, I., Grimont, P.A.D., et The Brazilian Purpuric fever study group. 1988. rRNA gene restriction patterns of *Haemophilus influenzae* biogroup *Aegyptius* strains associated with Brazilian Purpuric fever. J. Clin. Microbiol. 26, 1535-1538.
- Izard, N.C., Hachler, H., Grehn, M., et Kayser, F.H. 1992. Ribotyping of coagulase-negative staphylococci with special emphasis on intraspecific typing of *Staphylococcus epidermidis*. J. Clin. Microbiol. 30, 817-823.
- Jannasch, H.W. 1967. Growth of marine bacteria at limiting concentrations of organic carbon in seawater. Limnol. Oceanogr. 12, 264-271.
- Jannasch, H.W. 1969. Estimations of bacterial growth rates in natural waters. J. Bacteriol. 99, 156-160.
- Jannasch, H.W. 1979. Microbial ecology of aquatic low nutrient habitats. p243-260. In : M. Shilo Ed. Strategies of microbial life in extreme environments. Verlag Chemie, Weinheim.
- Jannasch, H.W., et Jones, G.E. 1959. Bacterial populations in seawater as determined by different methods of enumeration. Limnol. Oceanogr. 4, 128-139.
- Johnson, J.L., et Palleroni, N.J. 1989. Deoxyribonucleic acid similarities among *Pseudomonas* species. Int. J. Syst. Bacteriol. 39, 230-235.
- Jones, J.G. 1970. Studies on freshwater bacteria: effect of medium composition and method on estimates of bacterial population. J. Appl. Bacteriol. 33, 679-686.
- King, E.O., Ward, M.K., et Raney, D.E. 1954. Two simple media for the demonstration of pyocyanin and fluorescein. J. Lab. Clin. Medic. 44, 301-307.
- Kiss, A., Sain, B., et Venetianer, P. 1977. The number of rRNA genes in *Escherichia coli*. FEBS Letters 79, 77-79.

- Koblavi, S., Grimont, F., et Grimont, P.A.D. 1990. Clonal diversity of *Vibrio cholerae* O1 evidenced by rRNA gene restriction patterns. Res. Microbiol. 141, 645-657.
- Korsholm, E., et Sogaard, H. 1987. Colony counts in drinking water bacteriology. Importance of media and methods. Zbl. Hyg. Bakt. Orig. B. 185, 112-120.
- Kovacs, N. 1956. Identification of *Pseudomonas pyocyanea* by the oxidase reaction. Nature. 178, 703.
- Krambeck, C. 1978. Changes in planktonic microbial populations. an analysis by scanning electron microscopy. Verh. Int. Verein. Limnol. 20, 2255-2259.
- Kuznetsov, S.I., Dubinia, G.A., et Laptera, N.A. 1979. Biology of oligotrophic bacteria. Ann. Rev. Microbiol. 33, 377-387.
- Lake, A.J. 1985. Evolving ribosome structure: domains in archaeobacteria, eubacteria, coxycytes and eukaryotes. 54, 507-530.
- Lazo, G.R., Roffey, R., et Gabriel, D.W. 1987. Pathovars of *Xanthomonas campestris* are distinguishable by restriction fragment-length polymorphism. Int. J. Syst. Bacteriol. 37, 214-221.
- Leclerc, H. 1976. Critères d'évaluation des caractéristiques hygiéniques et microbiologiques des eaux minérales. Ann. Inst. Super. Sanita. 12, 210-217.
- Leclerc, H. 1986. Contrôle des microorganismes de la maladie des climatiseurs. In: "Maladies des climatiseurs et des humidificateurs". Colloque Inserm. 135, 137-154.
- Leclerc, H. 1989. A particularly safe biotope Evian et la recherche scientifique.
- Leclerc, H. 1990a. Le microbisme des eaux minérales naturelles. Hydrogéologie. 4, 279-285.
- Leclerc, H. 1990b. Indicateurs bactériens et contrôle de qualité des eaux minérales naturelles. Riv. Italiana d'Ig. 2, 311-343.
- Leclerc, H. 1991. Qualité microbiologique des eaux minérales naturelles. C.R. Acad. Agric. Fr., séance du 13 novembre 1991. 77, n°7, 37-50.
- Leclerc, H., et Mizon, F. 1978. Eaux d'alimentation et bactéries résistantes aux antibiotiques. Incidences sur les normes. Rev. Epidem. et Santé Publ. 26, 137-146.
- Leclerc, H., Mizon, F., Boniface, B., et Boniface, M. 1977. Eau et bactéries. Résistance aux antibiotiques: étude écologique. Ann. Microbiol. Inst. Pasteur. 128B, 253-269.
- Leclerc, H., et Mossel, D.A.A. 1989. Microbiologie: le tube digestif, l'eau et les aliments. Doin ed. Paris.

- Leclerc, H., Mossel, D.A.A., et Savage, C. 1985. Monitoring non-carbonated ("still") mineral waters for aerobic colonization. *Int. J. Food Microbiol.* 2, 341-347.
- Leifson, E. 1962a. The bacterial flora of distilled and stored water: I. General observations, techniques and ecology. *Int. Bull. Bact. Nomencl.* 12, 133-153.
- Leifson, E. 1962b. The bacterial flora of distilled water: III. New species of the genera *Corynebacterium*, *Flavobacterium*, *Spirillum* and *Pseudomonas*. *Int. Bull. Bact. Nomencl.* 12, 161-170.
- Lipuma, J.J., Fisher, M.C., Dasen, S.E., Mortensen, J.E., et Stull, T.L. 1991. Ribotype stability of serial pulmonary isolates of *Pseudomonas cepacia*. *J. Infect. Dis.* 164, 133-136.
- Lipuma, J.J., Mortensen, J.E., Dasen, S.E., Edling, T.D., Schidlow, D.V., Burns, J.L., et Stull, T.L. 1988. Ribotype analysis of *Pseudomonas cepacia* from cystic fibrosis treatment centers. *J. Pediat.* 164, 859-863.
- Lipuma, J.J., Stull, T.L., Dasen, S.E., Pidcock, K.A., Kaye, D. et Korzeniowski, O.M. 1989. DNA polymorphisms among *Escherichia coli* isolated from bacteriuric women. *J. Infect. Dis.* 159, 526-532.
- Lewin, B. 1988. Genes. "Le ribosome usine de la traduction". chp. 7. Ed. Flammarion Medecine. Sciences.
- Mac Donell, M.T., et Hood, M.A. 1982. Isolation and characterization of ultra microbacteria from a gulf coast estuary. *Appl. Environ. Microbiol.* 43, 566-571.
- Machtelinckx, P. 1975. Etude bactériologique sur les germe totaux et leur évolution dans les eaux minérales naturelles. Centre Belge d'étude et de documentation des eaux. 384, 406-409.
- Magee, B.B., D'souza, T.M., et Magee, P.T. 1987. Strain and species identification by restriction fragment length polymorphisms in the ribosomal DNA repeat of *Candida* species. *J. Bacteriol.* 169, 1639-1643.
- Manaia, C.M., Nunes, O.C., Morais, P.V., et Da Costa, M.S. 1990. Heterotrophic plate counts and the isolation of bacteria from mineral waters on selective and enrichment media. *J. Appl. Bacteriol.* 69, 871-876.
- Maniatis, T., Fritsch, E.F., et Sambrook, J. 1982. Molecular cloning. A laboratory manual. Cold spring Harbor Laboratory, Cold spring Harbor.
- Marmur, J. 1961. A procedure for the isolation of DNA from microorganisms. *J. Mol. Biol.* 3, 208-218.
- Martin, A., et Veldkamp, H. 1978. Physiological basis of the selective advantage of a *spirillum* sp in a carbon limited environment. *J. Gen. Microbiol.*, 105, 187-197.
- Martin, P., et MacLeod, R.A. 1984. Observations on the distinction between oligotrophic and eutrophic marine bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 47, 1017-1022.

- Martinetti, G., et Altwegg, M. 1990. rRNA gene restriction patterns and plasmid analysis as a tool for typing *Salmonella enteritidis*. Res. Microbiol. 141, 1151-1162.
- Masson, A., et Chavin, D. 1973. Etude de quelques phénomènes pouvant influencer la charge microbienne des eaux minérales en bouteilles plastique et verre. Laboratoire cantonal de Lausanne.
- Masson, A., et Michel, R. 1978. Bactériologie des eaux minérales. Influence du PVC sur la croissance de *Pseudomonas aeruginosa* et *Pseudomonas fluorescens*. Ind. Alim. Agr. 503-507.
- Means, E.G., Hanami, L., Ridgeway, H.F., et Olson, B.H. 1981. Evaluating media and plating techniques for enumerating bacteria in water distribution systems. Ann. Water Works Assoc. 73, 585-590.
- Morais, P.V., et Da Costa, M.S. 1990. Alterations in the major heterotrophic bacteria populations isolated from a still bottled mineral waters. J. Appl. Bacteriol. 69, 750-757.
- Morgan, E.A. 1982. Ribosomal RNA genes in *Escherichia coli*. In: Busch H., Rothblum L., eds. The cell nucleus. Vol. 10, 1-29. New-York: Academic Press.
- Morgan, P., et Dow, C.S. 1986. Bacterial adaptations for growth in low nutrient environments. In: R.A. Herbert and G.A. Codd (Eds). Microbes in extreme environments. Academic Press, London, pp. 187-214.
- Morgan, E.A., Ikemura, T., Lindahl, L., Fallon, A.M., et Nomura, M. 1978. Some rRNA operons in *Escherichia coli* have tRNA genes at their distal end. Cell. 13, 335-344.
- Morgan, E.A., Ikemura, T., et Nomura, M. 1977. Identification of spacer tRNA genes in individual ribosomal RNA transcription units of *E. coli*. Cell, 7, 165-177.
- Morita, R.Y. 1975. Psychrophilic bacteria. Bacterial Rev. 39, 144-167.
- Morita, R.Y. 1982. Starvation-survival of heterotrophs in the marine environment. In: Advances in Microbial Ecology (Edited by Marshall K.C.), Vol. 6, chap. 5, Plenum Press, New-York.
- Mosso Romeo, M.A., De La Rosa Jorge, M.C., Diaz Alonzo, F., et Gaston De Iriarte, E. 1983. Microbiologia del agua de Carabana. Ann. Real. Acad. Farm. 47, 327-334.
- Moureau, P., Derclaye, I., Gregoire, D., Janssen, M., et Cornelis, G.R. 1989. *Campylobacter* species identification based on polymorphism of DNA encoding rRNA. J. Clin. Microbiol. 27, 1514-1517.
- Moutoussis, C., Papavassilion, J., et Samaraki, V. 1960. L'examen bactériologique des eaux. Ann. Inst. Pasteur, Lille. 11, 3-10.
- Nastasi, A., Villafrate, M.R., Mammina, C., Pontello, M., et Ricci, M. 1990. Molecular analysis of strains of *Shigella boydii* isolated in Northern and Southern Italy. Res. Microbiol. 141, 1163-1172.

- Noller, P.M. 1984. Structure of ribosomal RNA. *Ann. Rev. Biochem.* 53, 119-162.
- Nomura, M., et Post. L.E. 1980. Organization of ribosomal genes and regulation of their expression in *Escherichia coli*, in "Ribosomes: structure, function and genetics" (G. Chambliss, G.R. Graven, K. Davis, L. Cachan et M. Nomura) pp 671-691. University Park Press, Baltimore.
- Ogan, T. 1992. Microbiological quality of bottled water sold in retail outlets in Nigeria. *J. Appl. Bacteriol.* 73, 175-181.
- Oger, C., Hernandez, J.F., Delattre, J.M., Delabroise, A.H., et Krupsky, S. 1987. Etude par épifluorescence de l'évolution de la microflore totale dans une eau minérale embouteillée. *Wat. Res.* 21, 469-474.
- Olsen, G.J., Lane, D.J., Giovannoni, S.J., et Pace, N.R. 1986. Microbial ecology and evolution: a ribosomal RNA approach. *Ann. Rev. Microbiol.* 40, 337-365.
- Overbeck, J. 1974. Microbiology and biochemistry. Internationale Vereinigung für Theoretische und Angewandte Limnologie, Mitteilungen. 20, 198-228.
- Owen, R.J., Beck, A., Dayal, P.A., et Dawson, C. 1988. Detection of genomic variation in *Providencia stuartii* clinical isolates by analysis of DNA restriction fragment length polymorphisms containing rRNA cistrons. *J. Clin. Microbiol.* 26, 10, 2161-2166.
- Pace, N.R. 1973. Structure and synthesis of the ribosomal ribonucleic acid of prokaryotes. *Bacteriol. Rev.* 37, 562-603.
- Pace, N.R., Olsen, G.J., et Woese, C.R. 1986. Ribosomal RNA phylogeny and the primary lines of evolutionary descent. *Cell.* 45, 325-326.
- Palleroni, N.J. 1984. Genus I. *Pseudomonas* Migula 1894 p. 141-199. In: N.R. Krieg & J.G. Holt (ed.) *Bergey's manual of systematic bacteriology*. Vol. 1. The Williams & Wilkins Co. Baltimore.
- Palleroni, N.J., Ballard, R.W., Ralston, E., et Doudoroff, M. 1972. Deoxyribonucleic acid homologies among some *Pseudomonas* species. *J. Bacteriol.* 110, 1-11.
- Palleroni, N.J., et Doudoroff, M. 1971. Phenotypic characterization and deoxyribonucleic acid homologies of *Pseudomonas solanacearum*. *J. Bacteriol.* 107, 690-696.
- Palleroni, N.J., Kunisawa, R., Contopoulou, R., et Doudoroff, M. 1973. Nucleic acid homologie in the genus *Pseudomonas*. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 23, 333-339.
- Peladan, F., et Monteil, H. 1988. Identification of *Pseudomonas*, *Flavobacterium* and *Alcaligenes* with API 20 NE system. *Path. Biol.* 36, 187-192.
- Perolat, P., Grimont, F., Regnault, B., Grimont, P.A.D., Fournie, E., Thevenet, H., et Baranton, G. 1990. rRNA gene restriction patterns of *Leptospira*: a molecular typing system. *Res. Microbiol.* 141, 159-171.

- Picard, B., Picard-Pasquier, N., Krishnamoorthy, R., et Goullet, P. 1991. Correlation between DNA polymorphism and enzyme polymorphism argues in favour of the delineation of two species within *Providencia alcalifaciens*. Res. Microbiol. 142, 965-969.
- Picard-Pasquier, N., Ouagued, M., Picard, B., Goullet, P., et Krishnamoorthy, R. 1989. A simple, sensitive method of analyzing bacterial ribosomal DNA polymorphism. Electrophoresis. 10, 186-189.
- Picard-Pasquier, N., Picard, B., Heeralal, S., Krishnamoorthy, R., et Goullet, P. 1990. Correlation between ribosomal DNA polymorphism and electrophoretic enzyme polymorphism in *Yersinia*. J. Gen. Microbiol. 136, 1655-1666.
- Piemont, Y., Prevost, G., et Monteil, H. 1990. Sondes d'acides nucléiques et diagnostic bactériologique. Méd. Mal. Infect. 20, 182-190.
- Pitcher, D.G., Owen, R.J., Dyal, P., Beck, A. 1987. Synthesis of biotinylated DNA probe to detect ribosomal RNA cistrons in *Providencia stuartii*. F.E.M.S. Microbiol. Letters. 48, 283-287.
- Poindexter, J.S. 1981a. The *Caulobacters*: ubiquitous unusual bacteria. Microbiol. Rev. 45, 123-179.
- Poindexter, J.S. 1981b. Oligotrophy: fast and famine existence. In: Advances in microbial ecology (edited by Alexander, M.) Vol. 5., chap. 2. Plenum Press, New-York.
- Pollack, M. 1984. The virulence of *Pseudomonas aeruginosa*. Rev. Infect. Dis. 6, 617-626.
- Postic, D., Edlinger, C., Richaud, C., Grimont, F., Dufresne, Y., Perolat, P., Baranton, G., et Grimont, P.A.D. 1990. Two genomic species in *Borrelia burgdorferi*. Res. Microbiol. 141, 465-475.
- Prevost, G., Jaulhac, B, et Piemont, Y. 1992. DNA fingerprinting by pulsed-field gel electrophoresis is more effective than ribotyping in distinguishing among methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates. J. Clin. Microbiol. 30, 967-973.
- Quevedo-Sarmiento, J., Ramos-Cormenzana, A., et Gonzalez-Lopez, J. 1986. Isolation and characterization of aerobic heterotrophic bacteria from natural spring waters in the Lanjaron area (Spain). J. Appl. Bacteriol. 61, 365-372.
- Rabkin, C.S., Jarvis, W.R., Anderson, R.L., Govan, J., Klinger, J., Lipuma, J., Martone, W.J., Monteil, H., Richard, C., Shigeta, S., Sosa, A., Stull, T., Swenson, J., et Woods, D. 1989. *Pseudomonas cepacia* typing systems: collaborative study to assess their potential in epidemiologic investigations. Rev. Infect. Dis. 11, 600-607.
- Ramos-Cormenzana, A., Nieto-Sanchez, M.C., et Olivares-Pascual, J. 1980. Estudio microbiológico de aguas de Lanjaron. Ann. Real. Acad. Farm. 2, 59-65.

- Rasumov, A.S. 1932. Die direkte methode der zählung der bakterien im wasser und ihre vergleichung mit der koch'shen plattenkultur-methode. *Microbiol.* 1, 145.
- Reasoner, D.J. 1990. Monitoring heterotrophic bacteria in potable water. P 452-477. In: Gordon A. Mc Feters (ed.). *Drinking water microbiology*. Springer-Verlag New-York.
- Reasoner, D.J., et Geldreich, E.E. 1985. A new medium for the enumeration and subculture of bacteria from potable water. *Appl. Environ. Microbiol.* 49, 1-7.
- Rheinheimer, G. 1980. *Aquatic microbiology*. 2nd edition. Wiley, New-York.
- Rhodes, M.E. 1959. The characterization of *Pseudomonas fluorescens*. *J. Gen. Microbiol.* 21, 221-263.
- Richard, Y., et Morita. 1975. Psychrophilic bacteria. *Bacteriol. Rev.* 39, 144-167.
- Richardson, K.J., Stewart, M.H., et Wolfe, R.L. 1991. Application of gene probe technology to the water industry. *J. Am. Water Works Assoc. sep.*, 71-81.
- Rivilla, R., et Gonzalez, C. 1988. Simplified methods for the microbiological evaluation of bottled natural mineral waters. *J. Appl. Bacteriol.* 64, 273-278.
- Romaniuk, P.J., et Trust, T.J. 1987. Identification of *Campylobacter* species by Southern hybridization of genomic DNA using an oligonucleotide probe for 16S rRNA genes. *F.E.M.S. Microbiology Letters.* 43, 331-335.
- Roszak, D.B., et Colwell, R.R. 1987. Survival strategies of bacteria in the natural environment. *Microbiol. Rev.* 51, 365-379.
- Rosenberg, F.A., et Duquino, H.H. 1989. Antibiotic resistance of *Pseudomonas* from German mineral waters. *Toxicity Assessment.* 4, 281-294.
- Ruschke, R., et Koehn, K. 1970. Keimzahlbestimmungen aus wasserproben nach der plattenmethode bei besonderer berücksichtigung des pH-wertes der verwendeten Nährboden. *Zbl. Bakt. Paras. Infektionskrankh.* 124, 68-80.
- Saunders, N.A., Harrison, T.G., Kachwalla, N., et Taylor, A.G. 1988. Identification of species of the genus *Legionella* using a cloned rRNA gene from *Legionella pneumophila*. *J. Gen. Microbiol.* 134, 2363-2374.
- Schmidt-Lorenz, W. 1976. Microbiological characteristics of natural mineral water. *Ann. Inst. Super. Sanita.* 12, 863-869.
- Schmidt-Lorenz, W., Bischofberger, T., et Cha, S.K. 1990. A simple nutrient-tolerance (NT) test for the characterization of the different types of oligocarbotoleant and oligocarbophile water bacteria from non-carbonated mineral water. *Int. J. Food Microbiol.* 10, 157-176.

- Schmidt-Lorenz, W., Bischofberger, T., Cha, S.K., et Schmitt, R. 1987. The bacterial flora and the value of elevated temperature (42°C) count in detecting pollution in bottled natural non-carbonated mineral waters. 13th International Symposium of the International Union of Microbiological Societies. Halkidiki, Greece.
- Schmidt-Lorenz, W., et Jaeggi, N. 1983. Colony counts at 42°C for the evaluation of hygienic quality of bottled natural uncarbonated mineral water. *Microbiol. Alim. Nutr.* 1, 377-391.
- Schoonmaker, D., Heimberger, T., et Birkhead, G. 1992. Comparison of ribotyping and restriction enzyme analysis using pulsed-field gel electrophoresis for distinguishing *Legionella pneumophila* isolates obtained during a nosocomial outbreak. *J. Clin. Microbiol.* 30, 1491-1498.
- Schwaller, P., et Schmidt-Lorenz, W. 1980. Flore microbienne de quatre aux minérales non gazéifiées et mises en bouteilles. I. Dénombrement de colonies, composition grossière de la flore et caractères du groupe des bactéries Gram-négatives pigmentées en jaune. *Zbl. Bakt. Hyg. I. Abt. Orig. C.I.*, 330-347.
- Schwaller, P., et Schmidt-Lorenz, W. 1981. La flore microbienne de quatre eaux minérales non gazéifiées et mises en bouteilles. II. Les *Pseudomonas* et autres bactéries à Gram-négatif. Composition fine de la flore. *Zbl. Bakt. Hyg. I. Abt. Orig. C2*, 179-196.
- Schwaller, P., et Schmidt-Lorenz, W. 1982. Températures maximales de croissance chez les bactéries oligocarbotolérantes isolées d'eaux minérales naturelles et non gazéifiées. *Brauerei-Rundschau* 93, 53-58.
- Seleen, W.A., et Stark, C.N. 1943. Some characteristics of green fluorescent pigment-producing bacteria. *J. Bact.* 46, 491-499.
- Sieburth, J. 1979. *Sea microbes*. Oxford University Press, New-York.
- Smith, C. J. et Callihan, D.R. 1992. Analysis of rRNA Restriction fragment length polymorphisms from *bacteroides* spp. and *Bacteroides fragilis* isolates associated with diarrhea in Humans and Animals. *J. Clin. Microbiol.* 30, 806-812.
- Snipes, K.P., Hirsh, D.C., Kasten, R.W., Hansen, L.M., Hird, D.W., Carpenter, T.E., et Mc Capes, R.H. 1989. Use of an rRNA probe and restriction endonuclease analysis to fingerprint *Pasteurella multocida* isolated from Turkeys and Wildlife. *J. Clin. Microbiol.* 27, 1847-1853.
- Southern, E.M. 1975. Detection of specific sequences among DNA fragments separated by electrophoresis. *J. Mol. Biol.* 98, 503-517.
- Spino, D.F. 1985. Characterization of dysgonic, heterotrophic bacteria from drinking water. *Appl. Environ. Microbiol.* 50, 1213-1218.
- Staley, J.T. 1985. Enumeration and identification of heterotrophic bacteria from drinking water. Cincinnati: Environmental Protection Agency Report n° EPA/600/2-85/061.

- Stackebrandt, E., et Woese, C.R. 1984. The phylogeny of prokaryotes. *Microbiol. Sci.* 1, 117-122.
- Stanier, R.Y., Palleroni, N.J., et Doudoroff, M. 1966. The aerobic pseudomonads, a taxonomic study. *J. Gen. Microbiol.* 43, 159-271.
- Stolp, H., et Starr, M.P. 1981. Principles of isolation, cultivation and conservation of bacteria. pp. 135-175 in Starr M.P., Stolp H., Trüper H.F., Balows A. and Schlegel H.G. (editors), *Identification of bacteria*, vol. 1, Springer Verlag, Heidelberg.
- Strzelczyk, E., Rzemieniewski, F., et Wierzbicki, K. 1967. Comparison of different media for enumeration of bacteria in water. *Zess. nauk. Univ. Mikoloja. Kopernika Torun.* 18,44.
- Stull, T.L., Lipuma, J.J., et Edling, T.D. 1988. A broad spectrum probe for molecular epidemiology of bacteria: ribosomal RNA. *J. Infect. Dis.* 157, 280-286.
- Tabor, P.S., Ohwada, K., et Colwell, R.R. 1981. Filterable marine bacteria found in the deep sea: distribution taxonomy and response to starvation. *Microb. Ecol.* 7, 67-83.
- Tchen, P., Fuchs, R.P.P., Sage, E., et Leng, M. 1984. Chemically modified nucleic acid as immunodetectable probes in hybridization experiments. *Proc. Nat. Acad. Sci. (Wash).* 81, 3466-3470.
- Tenover, F.C. 1988. Diagnostic deoxyribonucleic acid probes for infectious diseases. *Clin. Microbiol. Rev.* 1, 82-101.
- Thompson III, L.M., Smibert, R.M., Johnson, J.L., et Krieg, N.R. 1988. Phylogenetic study of the genus *Campylobacter*. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 38, 190-200.
- Thomson Carter, F.M., Carter, P.E., et Pennington, T.H. 1989. Differentiation of staphylococcal species and strains by ribosomal RNA gene restriction patterns. *J. Gen. Microbiol.* 135, 2093-2097.
- Torella, F., et Morita, R.Y. 1981. Microstructural study of bacterial size changes and microcolony and ultra microcolony formation by heterotrophic bacteria in sea water. *Appl. Environ. Microbiol.* 77, 227-229.
- Tram, C., Simonet, M., Nicolas, M.H., Offredo, C., Grimont, F., Lefevre, M., Ageron, E., Debure, A., et Grimont, P.A.D. 1990. Molecular typing of nosocomial isolates of *Legionella pneumophila* serogroup 3. *J. Clin. Microbiol.* 28, 242-245.
- Tronova, T.M. 1984. Microflora of different types of mineral waters of south east region of west Siberia. *Microbiologija.* 43, 129-132.
- Van der Kooij, D. 1979. Characterization and classification of fluorescent pseudomonads isolated from tap water and surface water. *Antonie van Leeuwenhoek.*

- Van der Kooij, D.. 1990. Growth measurements with *Pseudomonas aeruginosa*, *Aeromonas hydrophila* and autochthonous bacteria to determine the biological stability of drinking water. Riv. Italiana Ig. 5-6, 375-382.
- Van Ketel, R.J., et de Wever, B. 1989. Genetic typing in a cluster of *Legionella pneumophila* infections. J. Clin. Microbiol. 27, 1105-1107.
- Verger, J.M., Grimont, F., Grimont, P.A.D., et Grayon, M. 1987. Taxonomy of the genus *Brucella*. Ann. Inst. Pasteur/Microbiol. 138, 235-238.
- Veron, M. 1989. *Pseudomonas aeruginosa*. In: Bactériologie Médicale, Le Minor L. et Veron M., Flammarion Ed.
- Wachsmuth, I.K., Kiehlbauch, J.A., Bopp, C.A., Cameron, D.N., Strockbine, N.A., Wells, J.G., et Blake, P.A. 1991. The use of plasmid profiles and nucleic acid probes in epidemiologic investigations of food borne, diarrheal diseases. Int. J. Food Microbiol. 12, 77-90.
- Warburton, D.W., Peterkin, P.I., Weiss, K.F., et Johnston, M.A. 1986. Microbiological quality of bottled water sold in Canada. Can. J. Microbiol. 32, 891-893.
- Ward, N.R., Wolfe, R.L., Justice, C.A., et Olson, B.H. 1986. The identification of Gram-negative non-fermentative bacteria from water: Problems and alternative approaches to identification. Adv. Appl. Microbiol. 31, 293-365.
- Wayne, L.G., Brenner, D.J., Colwell, R.R., Grimont, P.A.D., Kandler, O., Kricheusky, M.L., Moore, L.H., Moore, W.E.C., Murray, R.G.E., Stackebrandt, E., Starr, M.P., et Trupper, H.G. 1987. Report of the Ad Hoc Committee on reconciliation of approaches to bacterial systematics. Int. J. Syst. Bact. 37, 463-464.
- Williams, S.T., Goodfellow, M., et Vickers, J.C. 1984. New microbes from old habitats. pp. 219-256. In: Kelly D.P., and Can N.G. (eds.) The Microbe 1984, II: Procarvates and Eucaryotes. Cambridge University Press, Cambridge.
- Witzel, K.P., Moaledj, K., et Overbeck, H.J. 1982. A numerical taxonomic comparison of oligocarbophilic and saprophytic bacteria isolated from lake plubsee. Archiv. für Hydrobiologie. 95, 507-520.
- Woese, C.R. 1987. Bacterial evolution. Microbiol. Rev. 51, 221-271.
- Woese, C.R., Gutell, R., Gupta, R., et Noller, H.F. 1983. Detailed analysis of the higher-order structure of 16S like ribosomal ribonucleic acids. Microbiol. Rev. 47, 621-669.
- Wright, R.T. 1978. Measurement and significance of specific activity in the heterotrophic bacteria of natural waters. Appl. Envir. Microbiol. 36, 297-305.

- Yanagita, T., Ichikawa, T., Tsuji, T., Kamata, Y., Ito, K., et Sasaki, M.** 1978. Two trophic groups of bacteria, oligotrophs and eutrophs: their distributions in fresh and sea water areas in the Central Northern Japan. *J. Gen. Microbiol.* 24, 59-98.
- Yogev, D., Halachmi, D., Kenny, G.E., et Razin, S.** 1988. Distinction of species and strains of mycoplasmas (Mollicutes) by genomic DNA fingerprints with an rRNA gene probe. *J. Clin. Microbiol.* 26, 1198-1201.
- Young, R.A. et Steitz, J.A.** 1979. Tandem promoters direct *Escherichia coli* ribosomal RNA synthesis. *Cell.* 17, 225-234.
- Zimmermann, R.** 1977. Estimation of bacterial number and biomass by epifluorescence microscopy and scanning electron microscopy. In: *Microbial Ecology of a Brackish Water Environment* (edited by Rheinheimer G.), Ecological studies 25, chap. 10, Springer, Berlin
- Zimmermann, R., Iturriaga, R., et Becker-Birck, J.** 1978. Simultaneous determination of the total number of aquatic bacteria and the number thereof involved in respiration. *Appl. Envir. Microbiol.* 36, 926-935.

TABLE DES MATIERES

	Page
INTRODUCTION	1
REVUE BIBLIOGRAPHIQUE	6
I. Le microbisme des eaux minérales naturelles	7
1. Aspect épidémiologique	7
2. La flore bactérienne autochtone	11
2.1. Croissance bactérienne et caractéristiques	12
2.2. Aspect taxonomique	18
2.3. Effet antagoniste	21
2.4. Pouvoir pathogène	22
3. Aspect réglementaire	25
3.1. Réglementation	25
3.2. Critères et indicateurs microbiologiques	29
II. Le profil de restriction des gènes codant pour les ARN ribosomiaux: nouvelle méthode d'identification et de typage universels des souches bactériennes	33
1. L'identification bactérienne traditionnelle	33
2. Approche moléculaire de l'identification bactérienne	34
2.1. Les ARN ribosomiaux chez la bactérie	34
2.1.1. Rôle dans la structure du ribosome	34
2.1.2. Organisation des gènes codant pour les ARN ribosomiaux	39
2.2. Les ARN ribosomiaux comme sonde universelle	40
3. Obtention des profils de restriction des gènes codant pour les ARNr	43
4. Applications des profils de restriction des gènes ARNr	44
4.1. Applications à l'identification d'espèces	46
4.2. Applications en épidémiologie	48

	Page
MATERIEL ET METHODES	57
I. Matériel	58
1. Souches bactériennes	58
2. Milieu de culture et réactifs	58
II. Méthodes	59
1. Echantillonnage	59
2. Recueil des souches	59
3. Culture bactérienne	60
4. Identification basée sur des caractères phénotypiques	60
5. Technique des profils de restriction des gènes codant pour les ARN ribosomiaux	62
5.1. Extraction et purification de l'ADN bactérien	62
5.2. Digestion des ADN chromosomiques	64
5.3. Electrophorèse en gel d'agarose	64
5.4. Transfert	66
5.5. Marquage des ARN risbosomiaux 16S + 23S d' <i>Escherichia coli</i>	68
5.6. Hybridation	71
5.6.1. Préhybridation	71
5.6.2. Hybridation	71
5.6.3. Lavages	71
5.6.4. Autoradiographie	72
5.6.5. Interprétation des profils de restriction des gènes ARNr	72

	Page
RESULTATS	74
I. Identification basée sur des caractères phénotypiques	75
1. Bacilles à Gram négatif	75
2. Le groupe des bacilles et cocci à Gram positif	84
II. Les profils de restriction des gènes codant pour les ARN ribosomaux	84
1. Choix de l'enzyme de restriction	84
2. Analyse des profils de restriction des gènes ARNr	92
2.1. Caractérisation de chaque source par les profils de restriction des gènes	99
2.2. Distribution des différents types de profils de restriction des gènes au cours de l'échantillonnage	99
DISCUSSION	106
CONCLUSION	123
ANNEXE	126
BIBLIOGRAPHIE	132

