Améliorer la qualité des eaux côtières pour tous

Identification des sources de contamination fécale

Action Pilote 3
Synthèse d'entreprise

ESPANA ESPACIO ATLANTICO
FRANCE ESPACE ATLANTIQUE
IRELAND ATLANTIC AREA
PORTUGAL ESPACO ATLANTICO
UK ATLANTIC AREA

Supported by the European Union
Project co-financed by the ERDF

icrew

Table des Matieres

SECTION 1 - INTRODUCTION 4
1.1 Conception de l'étude 5
1.2 Revue bibliographique 6
1.2.1 Conclusions et recommandations concernant l'analyse bibliographique 7
1.3 L'Atelier international 8
1.4 Choix des méthodes 9

SECTION 2 - RÉSULTATS 10

SECTION 3 - CONCLUSIONS 18

SECTION 4 - RECOMMANDATIONS 20

Auteurs: Marie Paule Caprais, Michèle Gourmelon, Jean Yves Piriou (IFREMER Centre de Brest) et Alain Rincé (Universite de Caen);
Collaborateurs : Richard Casseron, Cécile Le Mennec, Raphaël Ségura, Jean Pierre Annezo (IFREMER Centre de Brest) et Sylviane Boulben (IFREMER Concarneau).

Section 1

Introduction

L'Agence pour l'Environnement d'Angleterre et du pays de Galles *(Environment Agency)* a obtenu le financement INTERREG IIIB de l'UE pour un projet intitulé 'ICREW – Amélioration de la qualité des eaux de baignade et des eaux côtières'. Le projet visait à aider cinq états membres de l'UE – le Royaume-Uni, l'Irlande, la France, le Portugal et l'Espagne – à déterminer des techniques pour améliorer la qualité de ces eaux et à se préparer à la mise en place des nouvelles législations européennes sur ces thèmes.

Le projet ICREW a été évalué à environ 8 millions d'euros et comporte sept projets ou 'actions pilotes'. Le projet ICREW a eu lieu d'avril 2003 à avril 2006.

L'une de ces actions pilotes, l'Action Pilote 3, qui comprenait les partenaires d'Irlande, de France, du Portugal et du Royaume-Uni, a abordé la question du suivi des sources microbiennes de pollution fécale, suivant une perspective réglementaire. Son objectif était de 'développer un outil fonctionnel pouvant être utilisé pour distinguer les sources de pollution fécale (humaine ou animale) dans un échantillon de l'environnement'.

La qualité des eaux de baignade et conchylicoles, exprimée en termes de concentration d'indicateurs de contamination fécale, est couramment soumise à de grandes variations quelque soit le site donné. Les variations de la qualité sont souvent influencées par des événements transitoires, qui sont souvent difficiles à expliquer par la surveillance régulière. Ceci est particulièrement vrai pour des bassins versants complexes où il peut y avoir une grande variété de sources ponctuelles et diffuses, certaines continues, d'autres intermittentes, chacune avec un temps de trajet différent jusqu'au point d'échantillonnage.

Les techniques de modélisation de la qualité de l'eau peuvent être utilisées pour résoudre certains de ces problèmes ; en effet, chaque source individuelle peut être modélisée seule ou en combinaison avec d'autres. De la même façon, des études de suivi peuvent être réalisées pour suivre un nombre limité de sources à un instant donné. Toutefois ces méthodes sont limitées et il est souvent difficile d'attribuer la non-conformité à une source précise.

Le typage microbien permet d'examiner les échantillons environnementaux de manière qualitative et quantitative, et d'attribuer les indicateurs fécaux trouvés dans les échantillons, à leurs diverses sources.

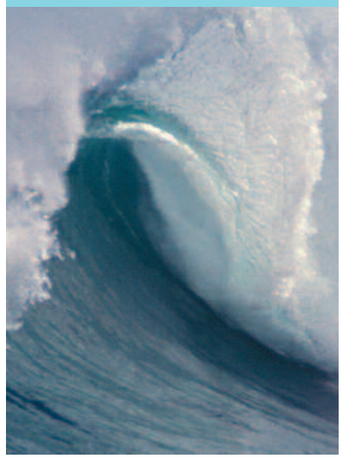
Plusieurs méthodes de typage différentes ont été publiées dans la littérature scientifique, mais aucune ne s'est révélée être un outil général permettant de résoudre les questions pratiques environnementales complexes.

Le but de cette étude est de produire un outil pratique, qui puisse être utilisé pour permettre de distinguer les sources de pollution fécale associées aux échantillons de l'environnement. Elle a pour objectif de transformer l'utilisation du suivi de la source de pollution en un outil de gestion pratique des bassins versants dans l'UE. L'un des avantages potentiels d'une méthodologie de ce type serait de permettre d'atteindre les normes rigoureuses relatives aux *E. coli* et entérocoques intestinaux, qui devront être satisfaites sur des sites désignés au moment de la mise en vigueur des révisions des directives sur les eaux de baignade et des eaux conchylicoles.

1.1 Conception de l'étude

L'étude comportait plusieurs étapes. Après chacune d'elles, la progression devait être examinée et l'orientation future du projet validée. Ces étapes étaient : -

- Revue bibliographique. L'étude a évalué l'état actuel des connaissances sur le suivi des sources de pollution fécale. Ceci a eu lieu de septembre à décembre 2003.
- Atelier international. L'atelier a rassemblé les experts internationaux représentant les différentes approches du suivi des sources de pollution, dans le but de procéder à une évaluation par ceux-ci de la revue bibliographique du projet et d'aider au choix des méthodes de l'étude. L'atelier a eu lieu en janvier 2004.
- Application des méthodes sélectionnées. Les méthodes sélectionnées lors de l'atelier ont été appliquées et leur performance a été testée par chaque partenaire. Ceci a eu lieu de mars 2004 à mars 2005.
- Essais sur les bassins versants. La performance des méthodes a été évaluée lors des études réalisées dans les bassins versants retenus par chacun des quatre pays partenaires. Ces évaluations ont eu lieu d'avril à octobre 2005.
- Rédaction du rapport final. Les partenaires se sont mis d'accord sur les conclusions et les recommandations du projet. Le rapport a été achevé en mars 2006.



1.2
Revue bibliographique

La revue bibliographique se trouve dans le document, *Développement des méthodes de suivi des sources de pollution – étape 3, Analyse documentaire consolidée.*

Informations générales

L'objectif de la revue bibliographique était d'évaluer les travaux publiés concernant le suivi des sources de pollution fécale et d'identifier les méthodes qui semblaient intéressantes à étudier. Chaque partenaire du projet a examiné un groupe spécifique de méthodes et a identifié les méthodes dans ce groupe qui méritaient d'être davantage examinées.

Les partenaires français et portugais ont examiné les méthodes génétiques dépendantes de banques de données. Les partenaires irlandais ont examiné les méthodes génétiques indépendantes de banques de données et les partenaires du Royaume-Uni ont étudié les méthodes phénotypiques et chimiques.

Chaque partenaire a utilisé les critères convenus pour évaluer les méthodes. Le système de critère et de notation utilisé pour évaluer les méthodes est indiqué dans le tableau 1.

Tableau : 1 Les critères utilisés dans le cadre de l'évaluation des méthodes indiquant les notations pour les méthodes choisies.

CRITERE	IMPORTANCE	METHODE	
		F+ ARN	*Bacteroidetes* PCR
Importance des utilisations précédentes	Basse (note sur 5)	3	3
Flexibilité pour débuter avec n'importe quel échantillon environnemental	Basse (note sur 5)	3	5
Coûts pour l'utilisateur final	Moyenne (note sur 10)	3	5
Aspect pratique de l'utilisation	Moyenne (note sur 10)	3	4
Vitesse et temps de réalisation en laboratoire	Moyenne (note sur 10)	4	8
Exigences d'échantillonnage	Moyenne (note sur 10)	10	10
Quantification et considérations statistiques	Elevée (note sur 15)	13	13
Lien avec l'indicateur de contamination fécale	Elevée (note sur 15)	5	5
Assurance qualité et reproductibilité	Elevée (note sur 15)	6	12
Coûts dans le cadre du projet	Très élevée (note sur 20)	10	12
Capacité et précision de discrimination	Très élevée (note sur 20)	10	17
Exigence de développement	Très élevée (note sur 20)	9	10
Note totale	**(note sur 155)**	**79**	**104**

A partir des analyses de chaque partenaire et suivant les critères d'évaluation, douze techniques, trois provenant de chacun des quatre revues, semblaient offrir un potentiel intéressant et méritaient d'être davantage étudiées. Le tableau 2 dresse la liste de ces méthodes.

1.2.1 Conclusions et Recommandations Relatives a la revue bibliographique

Informations générales

Historiquement, les coliformes totaux, coliformes fécaux et streptocoques fécaux ont été adoptés en tant qu'indicateurs de contamination fécale pour évaluer la qualité microbiologique des eaux de baignade. Le dénombrement de ces organismes, qui ne sont pas considérés comme étant de vrais agents pathogènes humains, a été utilisée pour prévenir le risque d'exposition aux virus entériques pathogènes, bactéries et protozoaires présents dans les eaux de baignade. Dans l'Union Européenne, les paramètres microbiologiques relatifs aux eaux de baignade pour la protection de l'environnement et de la santé publique sont stipulés entre autres, dans la Directive européenne 76/160/EEC. Cette directive utilise les indicateurs bactériens traditionnels pour évaluer l'état de la pollution et pour surveiller la dégradation de la qualité des eaux de baignade. Toutefois, les organismes indicateurs sont présents à la fois dans les fèces humaines et animales et les méthodes analytiques existantes ne permettent pas de distinguer les bactéries selon leur origine humaine ou non humaine. Par conséquent, les implications des données concernant les indicateurs de contamination fécale peuvent être difficiles à interpréter. La possibilité de déterminer l'origine humaine ou animale de la contamination d'origine fécale constituerait par conséquent une partie importante de la gestion de la qualité de l'eau et permettrait de mettre en place des actions correctives ciblées pour améliorer la qualité de l'eau et la protection de la santé publique.

Résultats de l'analyse

A partir des analyses individuelles de chaque partenaire, douze techniques, trois de chaque laboratoire participant, ont émergé comme méritant d'être davantage examinées suivant les critères d'évaluation. Le tableau 2 décrit les méthodes sélectionnées qui ont été jugées comme présentant les caractéristiques attendues dans le cadre de l'évaluation.

Tableau : 2 Les méthodes identifiées par la revue bibliographique méritant une évaluation supplémentaire.

MÉTHODE	TYPE
Amplification en chaîne par polymérase d'élément répétitif (rep-PCR)	Génétique, dépendant de banque de données
Typage par séquencage de sites multiples (MLST)	Génétique, dépendant de banque de données
Electrophorèse en champs pulsés (PFGE)	Génétique, dépendant de banque de données
Polymorphisme de taille des fragments de restriction (RFLP)	Génétique, dépendant de banque de données
Polymorphisme d'ADN amplifié au hasard (RAPD)	Génétique, dépendant de banque de données
Détection d'adénovirus	Génétique, indépendant de banque de données
Bifidobacterium fermentant le sorbitol	Génétique/phénotypique indépendant de banque de données
Détection d'agents fluorescents blanchissant (FWA)	Chimique, indépendant de banque de données
Biomarqueurs entérotoxines	Génétique, indépendant de banque de données
Génotypage de *Bacteroidetes*	Génétique, indépendant de banque de données
Génotypage de F+ coliphage	Génétique, indépendant de banque de données
Spectroscopie vibrationnelle	Physico-chimique, dépendant de banque de données

Ces méthodes candidates ont été analysées plus en profondeur dans le cadre de l'atelier international.

Recommandations supplémentaires
Bien qu'il soit évident que les évaluations individuelles de méthodes sont soumises à des variations d'interprétation des critères de sélection et à l'expertise des partenaires dans des domaines spécifiques, les analyses sont largement conformes à l'objectif commun déclaré. Toutefois, il est aussi clair que parmi les méthodes sélectionnées, peu sont bien établies et la plupart n'ont pas été largement utilisées dans le domaine du typage des sources fécales. Certaines méthodes nécessitent des développements supplémentaires pour confirmer leur capacité d'analyse de la source de contamination fécale. Des protocoles complets normalisés sous la forme de méthodes ISO/CEN ou méthodes semblables ne sont pas encore disponibles et bien qu'il soit possible d'analyser les échantillons à l'aide de ces méthodes dans des laboratoires spécialisés, leur utilisation dans des laboratoires non spécialisés exigerait un apport considérable de connaissances et de transfert de technologie.

Bien que des activités de R&D existent dans le cadre du projet ICREW, il est impératif qu'une approche générique réaliste et normalisée soit utilisée par tous les partenaires pour étayer toute étude de développement. Ceci évitera le développement de méthodes isolées, ce qui entraîne la possibilité de duplication et les problèmes de non transferabilité entre les pays partenaires. Ceci aura l'avantage supplémentaire de fournir des données essentielles pour l'évaluation des méthodes. Il est par conséquent recommandé, que parallèlement à toute activité de R&D dans chaque institut, qu'une/des méthode(s) commune(s) soit/soient utilisée(s) pour établir un ensemble de données équivalent dans tous les pays collaborant. Il est aussi suggéré qu'un programme d'échantillonnage bien défini et complet soit construit dans chaque pays sur une durée appropriée pour prendre en compte les variations saisonnières et temporelles. En plus des analyses en routine concernant *E. coli* et les streptocoques fécaux permettant de fournir des données générales de comparaison dans les bassins versants d'échantillonnage identifiés, une méthode unique de typage ou un nombre de techniques limité devrait/devraient être utilisé(s).

1.3 L'Atelier International

Le rapport concernant l'Atelier International se trouve dans le document *Rapport de l'atelier international sur les méthodes de suivi des sources de contamination fécale dans les eaux de baignade et conchylicoles. 12 et 13 janvier 2004.*

L'objectif de l'atelier était de rassembler les experts internationaux dans une variété d'approches de suivi des sources de pollution afin d'aider les membres de l'Action Pilote 3 à prendre les décisions concernant le choix des approches de suivi de source les plus appropriées aux besoins du projet. L'objectif était de développer les méthodes choisies, de les établir en laboratoire dans chaque pays participant et d'entreprendre les essais sur le terrain pour démontrer leur efficacité.

L'atelier a inclus des présentations par l'équipe du projet ICREW, qui a décrit les résultats des analyses bibliographiques réalisées, ainsi que des contributions d'autres experts familiers avec les méthodes, qui semblaient offrir le plus de possibilité pour l'application au sein du projet. Il était prévu d'utiliser l'atelier pour effectuer l'examen par les experts, et répondre aux conclusions tirées des analyses bibliographiques et permettre de faire un choix parmi les méthodes à utiliser pour les aspects pratiques de l'étude.

Les participants de l'atelier ont été divisés en trois groupes, chargés de recommander deux méthodes, qui pouvaient être évaluées dans le cadre du projet. Les groupes ont effectué les recommandations suivantes.

Groupe un : -
Détection d'*Adénovirus* 40 / 41 ; Isolation et énumération des *Bifidobacterium* fermentant le sorbitol, génotypage des *Bacteroidetes* à l'aide de PCR, génotypage des bactériophages F+ ARN par hybridation.

Groupe deux : -
Génotypage des *Bacteroidetes* à l'aide de la méthode PCR, génotypage des bactériophages F+ ARN par hybridation.

Groupe trois : -
Génotypage des bactériophages F+ ARN par hybridation, rep-PCR en utilisant *Escherichia coli*.

1.4 Choix des méthodes

Les membres de l'équipe du projet se sont réunis le 14 janvier 2004, afin de discuter les résultats de l'atelier et pour convenir des méthodes à utiliser dans le cadre du projet.

Les trois groupes de l'atelier ont recommandé le génotypage des bactériophages F+ ARN par hybridation et deux des groupes ont recommandé le génotypage des *Bacteroidetes* à l'aide de la méthode PCR.

Le groupe du projet a convenu d'évaluer ces deux méthodes dans la phase d'étude des bassins versants du projet.

Des exemples types de résultats obtenus pour chacune des deux méthodes sont présentés ci-dessous :

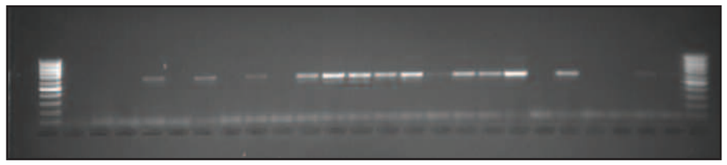


Figure : 1 Exemple de gel d'électrophorèse d'analyse de fragments de PCR indiquant des résultats obtenus pour le marqueur *Bacteroidetes* CF128f

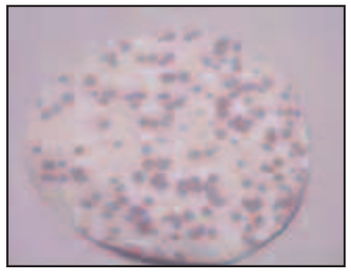
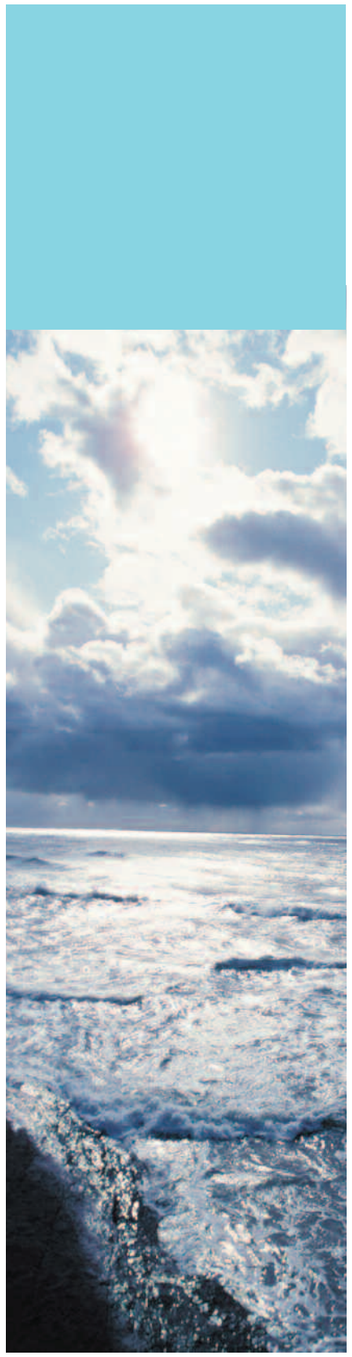


Figure : 2 Exemple de résultat d'hybridation de plages de lyse de bactériophages F+ ARN



Section 2

Résultats

Les résultats obtenus par pays sont résumés ci-dessous dans le tableau 3, les données analytiques complètes se trouvent dans l'Annexe IV de l'*Action Pilote 3 : Développement d'un rapport technique de suivi de source de pollution*.

Pendant la première phase de l'étude française sur l'Aber Benoît, l'échantillonnage de 3 eaux de surface urbaines des ruisseaux de Plouguin, Saint Pabu et Tréglonou ont eu lieu deux fois par jour lors de deux dates d'échantillonnage différentes : 30/11/04 et 06/12/04.

Pour les bactériophages F+ ARN, le génotype II et, en moindre mesure, le génotype III étaient principalement présents sur ces trois sites d'échantillonnage. Ces résultats indiquent une contamination humaine et s'accordent avec la caractérisation précédente de ces eaux. Toutefois, dans un échantillon de Plouguin, les bactériophages de génotype I ont été isolés en petit nombre (Groupe I 1.4% et Groupes II/III 65%) et dans un échantillon de Tréglonou (Groupe I 0.9% et Groupes II/III 75.7%) ce qui révèle un faible niveau de pollution d'origine animale. Ceci pourrait être expliqué par la présence de bovins près des eaux urbaines étudiées. Pour les *Bacteroidetes*, les 2 séries d'amorces sélectionnées pour identifier les origines bovines et humaines (CF128f-Bac708r et HF183f-Bac708r) ont été appliquées avec la série générale (Bac32f-Bac708r). Les résultats avec la série d'amorces spécifiques de l'origine humaine ont confirmé les résultats de bactériophages F+ ARN. En fait, toutes les eaux ont donné des résultats positifs avec la série générale, ce qui indique une contamination fécale et avec la série humaine ce qui indique une contamination par des sources urbaines.

A partir des échantillons d'eaux des bassins versants agricoles (Carpont, Kerilien, Keredern) prélevés en janvier 2005, un nombre insuffisant de bactériophages (‹ 100 bactériophages F+ ARN / 100 ml) a été détecté pour réaliser une hybridation (génotypage). Ces échantillons d'eau ont aussi été testés avec les deux séries d'amorces sélectionnés spécifiques à un hôte et avec la série générale. Hormis l'un des deux échantillons de Keredern analysés en janvier 2005, tous les échantillons testés ont donné un résultat positif avec la série générale ce qui souligne la présence du gène codant l'ARN 16S des *Bacteroidetes*. Les échantillons de Keredern n'ont pas donné de signal positif avec les amorces spécifiques de l'origine bovine ou humaine. Ce résultat pourrait être attribué à une faible pollution fécale ou à une source de pollution fécale autre que bovine ou humaine. Les échantillons de Kerillien ont donné un signal positif avec les amorces spécifiques de l'origine bovine et un signal négatif avec les amorces spécifiques de l'origine humaine, ce qui indique une source de pollution bovine.

Les échantillons de Carpont – classé précédemment en zone rurale – ont donné un signal positif avec les marqueurs spécifiques de l'origine humaine, ce qui indique une source urbaine de pollution. Le bassin de Carpont est d'une taille importante et il reçoit les écoulements de divers habitats, ce qui signifie qu'un apport de sources de pollutions urbaines, ne peut pas être exclu. Par ailleurs, le débit de cette rivière était assez important par rapport à deux autres effluents ruraux analysés (Keredern et Kerillien).

Six campagnes supplémentaires de prélèvement d'échantillons ont été effectuées après mars 2005 et à nouveau pour ce type d'eau, la concentration des bactériophages F+ ARN n'était pas suffisante pour réaliser un génotypage. A la place, des isolats individuels (un minimum de 20 plages) de bactériophages ont été obtenus et génotypés. Ces résultats peuvent uniquement donner une tendance permettant de caractériser les eaux et des études supplémentaires sur ces types d'eau seront réalisées.

Pendant la dernière phase d'échantillonnage (octobre 2005), des échantillons supplémentaires d'eau ont été analysés. Ceux-ci étaient plus représentatifs de l'estuaire de l'Aber Benoît que les effluents urbains ou agricoles ; certains de ces échantillons ont été extraits des eaux de baignade et d'autres des eaux situées près de zone d'élevages conchylicoles.

Les échantillons étaient des eaux salines et dans le cas des eaux de baignade, peu ou pas de contamination par des bactériophages F+ ARN ou par des marqueurs de *Bacteroidetes* n'a été révélée. Pour le rejet urbain (Saint Pabu) se jetant dans l'estuaire, nous avons constaté que plus la salinité augmentait, plus la contamination fécale baissait du fait de la dilution. Les bactériophages F+ ARN ont été plus difficiles à énumérer et à hybrider : présence de petites plages de bactériophages avec moins de réussite d'hybridation.

Pour les apports ruraux, dans le cas de Carpont, l'eau n'était pas bien mélangée avec les eaux de l'estuaire et elle n'a pas présenté une contamination suffisante qui aurait pu permettre de la classer. La sortie de Keredern, a indiqué une valeur de salinité de 24% et était faiblement contaminée.

En Irlande, les échantillons d'eau ont été recueillis à des emplacements sélectionnés (stations) dans le bassin versant de Dargle dans des conditions de faible débit (temps sec) et de débit élevé (temps humide). Des essais d'identification de la présence de marqueurs de *Bacteroidetes* humains et ruminants ont été réalisés. Il avait été indiqué lors d'une étude précédente du bassin versant de Dargle (Bruen et al., 2001) que les augmentations d'un 'ordre de grandeur' dans les concentrations d'indicateurs de contamination fécale avaient lieu à certaines stations d'échantillonnage de sous-bassin versant après des précipitations, mais pas à d'autres.

Tableau 3 : Synthèse des résultats pour chacun des 4 bassins versants

Pays	Site	Pré classification	F+ Phage Grpe I	F+ Phage Grpe II/III	F+ Phage Grpe IV	*Bacteroidetes* HF183f	*Bacteroidetes* CF128f	Post-classification
France	Plouguin	Urbain	+(4/11)	+(9/11)	-(0/11)	+(5/12)	-(0/12)	Mixte/Urbain
	St Pabu	Urbain	-(0/10)	+(10/10)	-(0/10)	+(6/12)	-(0/12)	Urbain
	Tréglonou	Urbain	-(0/11)	+(9/11)	-(0/11)	+(6/12)	-(0/12)	Urbain
	Carpont	Rural	+(4/8)	+(3/8)	+(3/8)	-(0/12)	+(2/12)	Mixte / Rural
	Keredern	Rural	+(4/8)	+(1/8)	+(1/8)	-(0/12)	+(2/12)	Mixte / Rural
	Kerilien	Rural	+(4/6)	+(1/6)	+(1/6)	-(0/12)	+(3/12)	Mixte / Rural
Irlande	Kilmacanogue	Urbain	ND	ND	ND	+(4/4)	-(1/4)	Urbain
	Swan	Urbain	ND	ND	ND	+(4/4)	-(0/4)	Urbain
	Kilruddery	Urbain	ND	ND	ND	+(3/4)	-(0/4)	Urbain
	Killough	Rural	ND	ND	ND	+(2/4)	-(1/4)	Urbain
	Glensoulan	Rural	ND	ND	ND	-(0/4)	+(3/4)	Rural
	County Brook	Rural	ND	ND	ND	+(2/4)	+(3/4)	Mixte
	Enniskerry CSO	Urbain	ND	ND	ND	+(1/1)	-(0/1)	Urbain
Portugal	Pintados	Mixte	-(0/10)	-(0/10)	-(0/10)	-(0/10)	-(0/10)	Inconnu
	R2	Mixte	ND	+(4/10)	-(0/10)	+(4/10)	+(4/10)	Mixte
	Moinho Novo	Mixte	ND	+(10/10)	-(0/10)	+(8/10)	+(9/10)	Mixte
	perto D. Leonor	Mixte	ND	ND	ND	+(2/10)	+(1/10)	Mixte
	courela D. Leonor	Rural	ND	ND	ND	+(3/4)	+(1/4)	Mixte
	Pontinha	Rural	+(2/2)	+(10/10)	-(0/8)	+(10/10)	+(10/10)	Mixte
	ETAR Ponte Sôr	Urbain	ND	+(1/1)	+(1/1)	+(3/4)	+(2/4)	Mixte
	ETAR Pinhal do Domingão	Urbain	+(2/4)	+(4/4)	ND	+(10/10)	+(8/10)	Mixte
	ETAR de Tramaga	Urbain	ND	ND	ND	+(5/6)	+(6/6)	Mixte
Royaume-Uni	Affluent de Penpoll	Rural	+(2/12)	+(2/12)	+(1/12)	-(0/12)	+(7/12)	Mixte / Rural
	Trenarth Bridge	Rural	+(2/8)	+(2/8)	-(0/8)	+(4/8)	+(1/8)	Mixte
	Port Navas	Mixte	+(2/11)	+(3/11)	+(1/11)	+(4/11)	+(3/11)	Mixte
	Entré d'égout de Port Navas	Mixte	-(0/5)	+(2/5)	-(1/5)	-(1/5)	-(1/5)	Urbain/inconnu
	U/S Constantine STW	Mixte	+(2/9)	+(3/9)	-(0/9)	+(1/9)	+(1/9)	Mixte
	D/S Const STW	Mixte	+(0/9)	+(2/9)	-(0/9)	+(1/9)	+(2/9)	Mixte
	Nancenoy	Rural	+(4/8)	+(5/8)	-(0/8)	-(4/8)	-(3/8)	Inconnu
	Bonallack Creek	Rural	-(0/8)	-(0/8)	-(0/8)	-(0/8)	+(1/8)	Rural
	Gweek Stream U/S Village	Mixte	-(0/1)	-(0/1)	-(0/1)	-(0/1)	+(1/1)	Rural
	Gweek Stream South	Mixte	-(0/12)	+(3/12)	-(0/12)	+(1/12)	+(2/12)	Mixte / Rural
	Affluent nord de Mellangoose	Mixte	-(0/6)	+(2/6)	+(1/6)	+(1/6)	+(2/6)	Mixte
	Affluent sud de Pemboa	Mixte	-(0/6)	+(1/6)	+(2/6)	-(0/6)	+(2/6)	Mixte / Rural
	Affluent de Rosevaer	Rural	+(1/10)	+(3/10)	-(0/10)	-(0/10)	+(3/10)	Mixte / Rural
	Mawgan Creek @ Trelowarren Mill bridge	Rural	-(0/10)	+(9/10)	-(0/10)	-(0/10)	+(1/10)	Urbain / Rural
	Affluent de Caervallack	Rural	-(0/10)	-(0/10)	-(0/10)	-(0/10)	+(1/10)	Rural
	Landrivick	Rural	-(0/8)	+(2/8)	-(0/8)	-(0/8)	+(5/8)	Urbain / Rural
	Helford slipway	Rural	-(0/4)	-(0/4)	-(0/4)	+(4/6)	+(2/6)	Inconnu /mixte
	Lanarth	Rural	+(2/10)	+(4/10)	+(1/10)	+(1/10)	+(3/10)	Inconnu /mixte
	Carne	Rural	+(3/6)	+(3/6)	+(2/6)	+(2/6)	+(1/6)	Mixte

+ = Marqueur détecté, - = Marqueur non détecté, ND = non réalisé/ bactériophage pas détecté / sous le seuil d'hybridation de 20 plages. Bactériophages F+ ARN : génotypes I et IV, origine animale, génotypes II et III, origine humaine ; *Bacteroidetes* : HF183f : origine humaine et CF128f : origine bovine. Les chiffres entre parenthèses correspondent au nombre d'échantillons donnant des résultats positifs par rapport au nombre total d'échantillons.

Comme il avait été anticipé à partir des études microbiologiques précédentes et de l'utilisation des terres du bassin versant, quelles que soient les conditions météorologiques, les échantillons d'eau des sous-bassins versants 'urbains' de Kilmacanogue, Swann et Kilruddery ont indiqué la présence du marqueur humain, contrairement au sous-bassin versant de Glensoulan. Le sous-bassin versant de Glensoulan a très peu d'habitations et très peu de zones agricoles. Le marqueur humain a été trouvé dans les échantillons des sous-bassins versants 'ruraux' de Killough et County Brook. Dans ces sous-bassins versants, les zones construites sont de petite taille, mais elles sont manifestement importantes en ce qui concerne la pollution microbienne humaine. Le marqueur humain a été trouvé à chaque fois dans les échantillons CSO d'Enniskerry.

Le marqueur ruminant était toujours absent dans les échantillons des sous-bassins versants de Swan et de Kilruddery; il y a peu d'activités agricoles sur ces terres. Toutefois, il était présent après de fortes chutes de pluie, le 24 juillet 2005, dans les échantillons du sous-bassin versant de Kilmacanogue, mais pas après des précipitations supplémentaires le 29 juillet 2005 ; la proportion d'utilisation agricole des terres dans ce sous-bassin versant est manifestement suffisante pour donner lieu parfois à une pollution microbienne détectable provenant de sources agricoles.

Le marqueur ruminant a été trouvé la plupart du temps dans les échantillons des sous-bassins versants de Glensoulan et County Brook : le premier est dominé par les forêts et les pâturages pour moutons, le second par les pâturages pour vaches laitières et les cultures ; mais pour le sous-bassins versant de Killough, qui a la plus grande quantité et proportion de pâturages intensifs pour moutons et bovins, le marqueur a été trouvé uniquement après de fortes pluies.

Dans tous les échantillons, le nombre de bactériophages F+ ARN détectés était inférieur à 20 plages et donc aucune hybridation n'a été réalisée sur ces échantillons.

Dans le bassin versant portugais, il a été supposé qu'il y avait 4 sites 'mixtes', 2 'ruraux' et 3 'urbains' avant la fin de l'étude. Huit des neuf sites ont donné des résultats positifs pour les marqueurs humains et bovins de *Bacteroidetes*. Les marqueurs n'ont pas été détectés à chaque campagne de prélèvement d'échantillon et certains sites n'ont donné qu'une faible réaction positive. Pintados sur le réservoir de Montargil a été le seul site négatif pour les deux marqueurs, à chaque campagne de prélèvement d'échantillon. Lorsque les marqueurs *Bacteroidetes* ont été identifiés, il a été noté qu'au Portugal le marqueur CF128f-Bac708r avait une faible spécificité et conduisait à des résultats positifs à partir de sources humaines. Ceci pourrait expliquer les résultats positifs observés avec les marqueurs CF128f-Bac708r sur tous les sites y compris ceux désignés comme 'urbains'. Les bactériophages F+ARN ont été à nouveau détectés en petit nombre, ceux correspondant au génotype II étant le plus couramment détectés.

Au Royaume-Uni, tous les sites n'ont pas été échantillonnés à chaque période de prélèvement d'échantillons et de nouveaux sites ont été ajoutés lors de la période d'échantillonnage. Le bassin versant d'Helford décrit comme étant de nature rurale a de nombreuses habitations isolées disposant de fosses septiques, en raison de l'absence de réseau d'égouts dans le bassin versant. Par conséquent, même une petite habitation peut avoir un impact important sur la qualité de l'eau.

A partir des résultats obtenus, beaucoup des zones considérées comme étant de nature rurale, subissent un niveau d'apports humains, venant probablement des fosses septiques. Un fait a émergé des résultats : le bassin versant a une charge très basse de bactériophage F+ ARN. Même après avoir concentré les échantillons des analyses de bactériophage F+ ARN, les nombres isolés étaient bas ou sous la limite de détection permettant à la méthode de fonctionner. Les marqueurs génétiques *Bacteroidetes* – HF183f, CF128f – ont aussi présenté cette caractéristique, avec seulement 14.7% (42/285) d'échantillons donnant un résultat positif pour un marqueur. Etant donné qu'aucun marqueur général *Bacteroidetes* PCR n'a été utilisé en parallèle avec les échantillons au Royaume-Uni, on ne sait pas si l'absence de marqueur était due à l'apport de pollution provenant d'une source différente - pas humaine ou bovine – ou s'il n'y avait pas d'ADN de *Bacteroidetes* présent.

Lorsque le bactériophage F+ ARN a été isolé, c'était en petits nombres, avec moins de trente plages disponibles pour l'hybridation. Lorsque ceci a eu

lieu, les plages ont été isolées individuellement et congelées jusqu'à ce qu'il y en ait assez pour réaliser une hybridation. Bien que des résultats aient été obtenus à partir de ces plages, en raison du bas niveau présent dans l'échantillon d'origine aucune conclusion n'a pu être faite pour tracer la source de pollution à ce moment, même si les résultats d'hybridation peuvent donner une indication.

Les niveaux de bactériophages F+ ARN isolés et le nombre de marqueurs de *Bacteroidetes* détectés semblent indiquer un niveau général bas de pollution dans le bassin versant. Ceci expliquerait aussi certaines des différences trouvées entre des analyses doubles du même échantillon. Les faibles précipitations ayant eu lieu lors de la période d'échantillonnage ont aussi eu un impact. Deux campagnes supplémentaires d'échantillonnage ont eu lieu en septembre et en octobre après ou pendant de fortes chutes de pluie. Ces échantillonnages ont indiqué une augmentation du nombre d'*E.coli* et d'entérocoques intestinaux isolés mais les niveaux de bactériophages F+ ARN détectés demeurent assez stables pendant toute la période d'étude. Un second bassin versant plus grand dans le nord-ouest de l'Angleterre a aussi été étudié dans des conditions sèches et humides. Celui-ci a indiqué des niveaux élevés de bactériophages F+ ARN après / pendant des chutes de pluie. L'augmentation des concentrations en bactériophages F+ ARN a conduit à une augmentation de la présence de signaux de sources animales. Ceci indiquerait que le bassin versant d'Helford a peu d'apport de bactériophages F+ ARN en raison de sa taille.

Résumé

Les travaux réalisés dans les bassins versants de l'Aber Benoît (France), Dargle (Irlande), Montargil (Portugal) et Helford (Royaume-Uni) l'ont été pendant la période d'avril à octobre 2005.

Un total de 321 échantillons a été analysé, la distribution des échantillons par partenaire et par type est indiquée dans le tableau 4.

Bien que des précipitations aient eu lieu dans les bassins versants de Dargle et Helford pendant le mois d'octobre, la plupart des prélèvements ont été réalisés durant une période de peu ou pas de précipitation. Par conséquent, il y a eu peu de possibilité de tester de manière approfondie les méthodes durant les périodes de ruissellement agricole important.

La majorité des échantillons a donné des colimétries inférieures à 2000 cfu par 100 ml comme indiqué dans le tableau 5.

53.9% des échantillons indiquaient une concentration en *E.coli* inférieure à 2000 cfu /100 ml. Ceci était dû au temps sec et au manque ultérieur de ruissellement agricole dans les 4 bassins versants.

La méthode de *Bacteroidetes* par PCR a été évaluée en utilisant les règles suivantes : -

Une source positive de pollution humaine a été indiquée si le marqueur HF183f était positif et le marqueur CF128f était négatif.

Une source de pollution bovine positive a été indiquée si le marqueur HF183f était négatif et le marqueur CF128f était positif.

Tableau 4 : Distribution des échantillons par partenaire et type de zone.

	Type de zone			
	Rurale	Urbaine	Mixte	**Total**
France	38	38	3	**79**
Irlande	12	14	8	**34**
Portugal	14	22	40	**76**
R-U	84	0	48	**132**
Total	**148**	**74**	**99**	**321**

Table 5 : Distribution par partenaire et concentration en *E.coli*.

	Concentration en E.coli pour 100 ml				
	‹500	500 - 2000	2000 - 15000	›15000	**Total**
France	10	20	27	22	**79**
Irlande	4	2	10	18	**34**
Portugal	23	9	20	15	**67**
R-U	46	59	24	3	**132**
Total	**83**	**90**	**81**	**58**	**321**

Tableau 6a : Le typage des échantillons utilisant la méthode *Bacteroidetes* comparé à la classification des échantillons (tous les pays).

		Classification d'échantillon *Bacteroidetes* PCR			
		Human	Non human	Mixed	**Total**
Rural	Nb. d'échantillons	12	22	14	**48**
	% classé	25%	45.8%	29.2%	**100%**
Urbain	Nb. d'échantillons	33	3	16	**52**
	% classé	63.5%	5.7%	30.8%	**100%**
Mixte	Nb. d'échantillons	11	4	15	**30**
	% classé	36.7%	13.3%	50.0%	**100%**
Total	**Nb. d'échantillons**	**56**	**29**	**45**	130
	% classé	**43.1%**	**22.3%**	**34.6%**	**100%**

Tableau 6b : Le typage des échantillons en utilisant la méthode *Bacteroidetes* comparée à la classification des échantillons (France, Irlande et Royaume-Uni uniquement).

		Classification d'échantillon *Bacteroidetes* PCR			
		Human	Non human	Mixed	**Total**
Rural	Nb. d'échantillons	10	22	3	**35**
	% classé	28.6%	62.9%	8.6%	**100%**
Urbain	Nb. d'échantillons	30	2	1	**33**
	% classé	90.9%	6.1%	3.0%	**100%**
Mixte	Nb. d'échantillons	8	1	4	**13**
	% classé	61.5%	7.7%	30.8%	**100%**
Total	**Nb. d'échantillons**	**48**	**25**	**8**	**81**
	% classé	**59.3%**	**30.9%**	**34.6%**	**100%**

Tandis qu'une source positive mixte était indiquée si HF183f et CF128f étaient positifs.

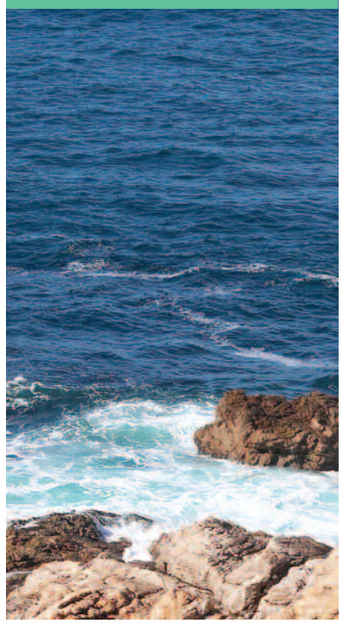
Les résultats pour la méthode *Bacteroidetes* sont indiqués dans le tableau 6.

Le nombre d'échantillons classés a augmenté avec la concentration en *E. coli*.

Parmi les échantillons avec des colimétries ‹500 cfu /100ml, seuls 15.7% ont été identifiés. Au contraire, 81% des échantillons avec des colimétries ›15000 cfu /100 ml ont été identifiés.

Il a été noté que le marqueur *Bacteroidetes* général devrait être utilisé en conjonction avec les deux autres marqueurs, hôte-spécifiques. Ceci servirait de contrôle analytique interne et renforcerait la véracité d'un résultat spécifique relatif à un marqueur négatif. Le marqueur général permettrait aussi d'attribuer une contamination fécale additionnelle à une source autre qu' humaine ou ruminante.

Les données combinées pour nos quatre bassins versants ont donné un résultat de 45.8% d'échantillons ruraux contaminés par une source animale. Ce chiffre est monté à 62.9% quand on exclut les données du Portugal, en raison de la faible spécificité du marqueur CF128f au Portugal. Parmi les échantillons urbains testés, 63.5% ont indiqué une contamination de source humaine et parmi les échantillons mixtes, 50% ont indiqué une contamination provenant de



sources animales et humaines. Ces chiffres passent à 90.9% pour les échantillons urbains et 30.8% pour les sources mixtes lorsque les données du Portugal sont exclues.

Tous les typages des échantillons ruraux du bassin versant de l'Aber Benoît en Bretagne ont indiqué une contamination par une source animale, tandis que 89.5% des échantillons urbains ont indiqué une contamination provenant de sources humaines.

Le typage du bassin versant de Dargle en Irlande a indiqué que 55.6% des échantillons ruraux sont contaminés par des sources animales, 92.9% des échantillons urbains indiquent une contamination humaine et 66.7% des échantillons mixtes ont indiqué des marqueurs animaux et humains.

Le bassin versant de Montargil au Portugal a indiqué que la majorité des échantillons qu'ils soient classés dans les catégories rurales, humaines ou mixtes, ont indiqué les deux marqueurs humains et animaux.

Le bassin versant d'Helford dans le sud-est de l'Angleterre est un bassin versant rural sans zones urbaines. 52.6% des échantillons ruraux ont indiqué une contamination provenant de sources animales uniquement et parmi les échantillons mixtes 85.7% ont uniquement indiqué le marqueur humain.

Dans la littérature scientifique et dans les laboratoires français, portugais et britanniques, il a été montré que les génotypes I et II étaient les plus fréquemment isolés (Brion et *al*, 2002).

Dans les eaux usées et les boues de station d'épuration analysées (données françaises), il a été trouvé que les génotypes II et III étaient prédominants (environ 75%) et dans les lisiers de porc, les génotypes I et IV se trouvaient dans les mêmes proportions.

Les caractéristiques de survie des bactériophages F+ ARN semblent varier avec les génotypes : le groupe I présente la survie plus longue, suivi par le génotype II. Les génotypes III et IV présentent des durées de survie semblables et les plus courtes des bactériophages F+ RNA (Long and Sobsey, 2004; Brion et *al*.,).

Les données de la méthode bactériophage F+ ARN ont subi les mêmes analyses que les résultats des analyses de *Bacteroidetes*. Pour les analyses statistiques, les échantillons indiquant ≥ 1 bactériophage génotypé dans la catégorie humaine (Groupes II ou III), l'origine de la contamination de l'échantillon a été considérée comme provenant d'une origine humaine. Pour les échantillons indiquant ≥ 1 bactériophage génotypé dans la catégorie animale (Groupe I ou IV), l'origine de la contamination de l'échantillon a été considérée comme provenant d'une origine animale. Les échantillons ont été classés dans la catégorie mixte si les deux génotypes I ou IV et II ou III étaient positifs.

Comme le tableau 8 l'indique, lorsqu'au moins 20 plages de bactériophages F+ ARN ont été isolées et ont subi une hybridation, plus de 83.6% des échantillons ont été classés tandis qu'en dessous de 20 plages, seuls 27.1% des échantillons étaient classés.

Les résultats des quatre études de bassin versant indiquent que les deux méthodes sont capables d'identifier la source humaine ou animale d'une contamination fécale. En prenant en compte le manque de pluie lors de la période d'étude, les résultats donnés par les deux méthodes indiquent des niveaux bas de contamination fécale, une absence d'apport agricole provenant des ruissellements et un niveau bas de contamination à partir de sources humaines.

Aucune des méthodes ne fonctionne lorsque les niveaux de pollution fécale sont bas, par exemple dans les échantillons contenant des concentrations en *E. coli* de ‹500 cfu /100ml. Au fur et à mesure que le niveau de pollution augmente, comme indiqué par la colimétrie, les méthodes deviennent plus efficaces.

L'une des limitations de la méthode de génotypage des bactériophages F+ ARN est d'isoler assez de plages de bactériophage pour effectuer un typage. Pour avoir confiance dans le résultat, un minimum de 20 plages doit être hybridé.

Le marqueur humain *Bacteroidetes* HF183f a fonctionné dans les quatre études de bassin versant et constitue un indicateur solide de pollution humaine fécale.

Le marqueur *Bacteroidetes* (CF128f) bovin était spécifique des bovins dans le bassin versant irlandais, il a eu une réaction croisée avec de porcs en France et au Royaume-Uni. Il était bien moins spécifique au Portugal. Par conséquent c'était un bon marqueur animal en France, en Irlande et au Royaume-Uni, mais n'avait pas assez de spécificité pour être utilisé au Portugal. Les résultats de l'étude du bassin versant au Portugal, qui ont conduit à des indicateurs mixtes dans la majorité des échantillons testés pourraient indiquer une différence dans les pratiques agricoles et l'élimination des eaux usées comparée à celles des autres pays participants.

Le tableau 9 illustre la concordance entre les deux méthodes de classification des échantillons. Les deux méthodes indiquent que la pollution provenait de la même source dans 73.9% des échantillons. 47.8% provenait de source humaine et 26.1% de source mixte.

Tableau 7 : Le typage des échantillons utilisant la méthode bactériophage F+ ARN comparé à la classification d'échantillon.

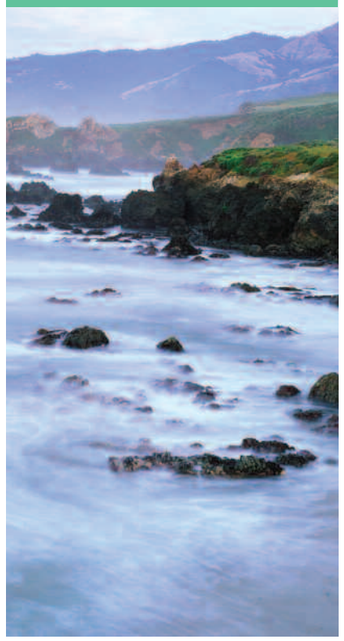
		Classification d'échantillon bactériophage ARN+F			
		Humain	Non humain	Mixte	**Total**
Rural	Nb. d'échantillons	10	1	8	**19**
	% classé	52.6%	5.3%	42.1%	**10.0%**
Urbain	Nb. d'échantillons	26	2	5	**33**
	% classé	78.8%	6.1%	15.2%	**100.0%**
Mixte	Nb. d'échantillons	1	0	8	9
	% classé	11.1%	0%	88.9%	**100.0%**
Total	**Nb. d'échantillons**	**37**	**3**	**21**	**61**
	% classé	**60.7%**	**4.9%**	**34.4%**	**100.0%**

Tableau 8 : Classification des échantillons lorsque le nombre de plages est fixé à 20

			Classé ARN+F		
			Pas classé	Classé	**Total**
ARN+F Plages 20	‹20	Nombre	148	55	**203**
		% dans les plages de 20 F+	72.9%	27.1%	**100%**
	›=20	Nombre	12	61	**73**
		% dans les plages de 20 F+	16.4%	83.6%	**100%**
Total		**Nombre**	**160**	**116**	**276**
		% dans les plages de 20 F+	**58.0%**	**42.0%**	**100%**

Tableau 9 : Classification des échantillons par *Bacteroidetes* et bactériophages F+ ARN

			Classe_F+			**Total**
			Humain	Non Humain	Mixte	
Classe_Bact	Humain	Nombre	11	2	2	**15**
		% du Total	47.8%	8.7%	8.7%	**65.25**
	Non Human	Nombre	1	0	1	**2**
		% du Total	4.3%	0%	4.3%	**8.7%**
	Mixed	Nombre	0	0	6	**6**
		% du Total	0%	0%	26.1%	**26.1%**
Total		**Nombre**	**12**	**2**	**9**	**23**
		% du Total	**52.2%**	**8.7%**	**39.1%**	**100%**



Section 3

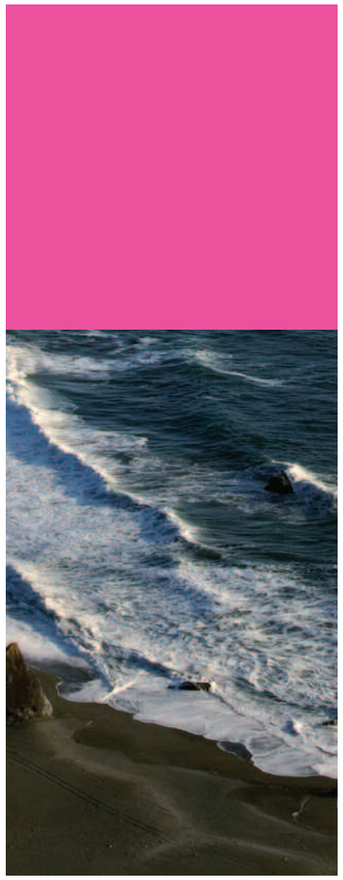
Conclusions

Les objectifs de l'Action Pilote 3 d'ICREW étaient d'évaluer l'état actuel des connaissances relatives au suivi des sources de pollution fécale et de tester ces méthodes, qui ont été suffisamment développées pour permettre de réaliser des essais sur le terrain.

Les deux méthodes jugées comme convenant aux essais sur le terrain sont la méthode *Bacteroidetes* par PCR pour les marqueurs humains et bovins et le génotypage des bactériophages F+ ARN. Ces méthodes ont été testées sur des bassins versants en France, en Irlande, au Portugal et au Royaume-Uni, pendant la période d'avril à octobre 2005.

La période d'étude a eu lieu durant des précipitations très faibles sur toutes les zones étudiées, avec peu de possibilités de ruissellement agricole dans les bassins versants étudiés. Les résultats des études sur le terrain ont été cohérents avec les résultats escomptés, étant donné la connaissance des bassins versants et les conditions météorologiques dominantes. Les résultats ont indiqué des niveaux bas de pollution par des sources principalement humaines, même dans les bassins versants ruraux. Il y avait peu de pollution de source animale en raison de l'absence de précipitations importantes et de ruissellement agricole.

Le marqueur *Bacteroidetes* HF183f s'est révélé être un indicateur fiable de la pollution de source humaine, dans les quatre zones d'étude. On a constaté que le marqueur bovin CF128f donnait des résultats positifs avec les fèces provenant de porcs au Royaume-Uni et en France et qu'il n'était pas fiable au Portugal.



Toutefois, dans les études de bassin versant, il s'est révélé être un indicateur fiable de pollution de source animale en France, en Irlande et au Royaume-Uni, mais pas au Portugal. Ce manque de spécificité du marqueur CF128f dans le bassin versant portugais pourrait refléter les différences des pratiques d'élevage ou d'élimination des eaux usées par rapport aux autres pays participants.

La méthode de génotypage des bactériophages F+ ARN a semblé bien fonctionner en France et au Royaume-Uni, mais s'est révélée moins cohérente en Irlande et au Portugal. Ceci pourrait être dû aux niveaux bas de pollution et par conséquent au faible nombre de bactériophages présents dans les échantillons analysés.

L'une des questions autour de la méthode basée sur les bactériophages F+ ARN était le nombre de bactériophages isolés et par conséquent pouvant être classé. Il a été montré que pour assurer un résultat, un minimum de 20 plages de bactériophage était nécessaire pour réaliser un typage.

Les niveaux de pollution relevés lors des études des bassins versants étaient bas. Aucune méthode n'a bien fonctionné lorsque les niveaux de pollution étaient faibles , c.-à-d. lorsque les concentrations en coliformes étaient inférieures à 500 cfu par 100 ml. Au fur et à mesure que le niveau de pollution augmente, ce qui est reflété par l'augmentation de la colimétrie, les deux méthodes ont donné de meilleurs résultats.

La sensibilité des deux méthodes pourrait être améliorée en augmentant le volume de l'échantillon analysé à un litre ou plus.

La méthode *Bacteroidetes* par PCR a semblé plus facile à réaliser que la méthode de génotypage des bactériophages F+ ARN.

Le travail de l'Action Pilote 3 a montré que les deux méthodes pouvaient être utilisées pour déterminer la source de la pollution fécale des eaux de l'environnement. Les méthodes nécessiteraient des développements supplémentaires, en termes de sensibilité et de capacité à quantifier le rapport des différentes sources de pollution dans un échantillon.

L'un des avantages du projet ICREW est la façon dont il permet aux scientifiques de plusieurs pays européens d'unir leurs connaissances et leurs expertises afin d'aborder des problèmes communs. En participant à l'Action Pilote 3, les scientifiques impliqués ont développé des rapports professionnels, qui seront utiles au-delà de la durée du projet.

Section 4

Recommandations

Des travaux supplémentaires dans les bassins versants pendant des périodes de précipitations apporteraient des informations supplémentaires relatives à la performance des méthodes.

Le marqueur humain *Bacteroidetes* PCR HF183f peut être utilisé avec efficacité dans les bassins versants en France, en Irlande, au Portugal et au Royaume-Uni.

Le marqueur bovin *Bacteroidetes* PCR CF128f peut être utilisé avec efficacité comme marqueur animal dans les bassins versants en France, en Irlande et au Royaume-Uni.

La méthode de génotypage des bactériophages F+ ARN peut être utilisée pour différentier les sources de pollution fécale humaine et animale. Toutefois, pour être efficace, au moins 20 plages doivent être utilisées pour réaliser un génotypage.

Une optimisation supplémentaire des méthodes améliorerait leur performance.

Des travaux supplémentaires sont nécessaires afin d'identifier et de développer d'autres marqueurs pour des groupes spécifiques d'animaux, par exemple oiseaux et porcs.

Il faudrait développer des méthodes de PCR en temps réel en utilisant les amorces HF183f et CF128f afin de donner des résultats quantitatifs.

Contributors

CONTRIBUTORS	ORGANISATION
France	
Jean-Yves Piriou Marie-Paule Caprais Michèle Gourmelon Cécile Le Mennec Richard Casseron Raphaël Ségura	IFREMER Centre de Brest Laboratoire de Microbiologie-EMP/MIC BP 70 29280 PLOUZANE
Alain Rince	Laboratoire de Microbiologie de l'Environnement, USC INRA 2017, EA 956 Université de Caen Basse Normandie, France
Ireland	
Bart Masterson Martin Thorp Wim Meijer Nora Carroll Brian Graham Sarah Fraser	UCD Conway Institute of Biomolecular and Biomedical Research University College Dublin Belfield Dublin 4 Ireland
Portugal	
Maria Leonor Falcao Joao Brandao Jorge Machado Baltazar Nunes Raquel Rodrigues Rita Mendonca	Instituto Nacional De Saude Dr. Ricardo Jorge Avenida Padre Cruz 1649-016 Lisboa Portugal
United Kingdom	
Andy Gawler Martin Walters Jonathan Porter Robert Bonsor	National Laboratory Service Starcross Laboratory Starcross Exeter Devon EX6 8PE
Jean Beecher	The University of Exeter, The Queen's Drive, Exeter, Devon, UK EX4 4QJ

General and Mersey Basin photography supplied by kind permission of David Willis

contacts

UK
Environment Agency
Richard Fairclough House
Knutsford Road
Warrington
WA4 1HG
T +44 8708 506 506
F +44 1925 234 762
W www.environment-agency.gov.uk

France
Conseil regional de Bretagne
283 Avenue du General PATTON
RENNES
35830
T +33 299271219
F +33299271400
W www.icrew.info

Spain
Instituto technologico de Canarias SA (ITC)
Playa de Pozo Izquierdo s/n
POZO IZQUIERDO
E-35119 - Santa Lucía
Gran Canaria
T +34 928 727522
F +34 928 727517
W www.icrew.info

Portugal
Instituto Superior Técnico
Secção de Ambiente e Energia
Av. Rovisco Pais 1049-001
Lisboa
T +351 21 841 9433
F +351 21 841 9423
W www.icrew.info

Ireland
University College Dublin
Dept of Biochemistry
University College Dublin
Belfield
Dublin 4
T +353 1 716 1539
F +353 1283 7211
W www.icrew.info

Pour de plus amples informations sur le projet ICREW, veuillez visiter notre site Internet à :
www.icrew.info

ESPANA ESPACIO ATLANTICO
FRANCE ESPACE ATLANTIQUE
IRELAND ATLANTIC AREA
PORTUGAL ESPACO ATLANTICO
UK ATLANTIC AREA

Supported by the European Union
Project co-financed by the ERDF

icrew