



N° d'ordre : 1236



**THESE EN CO-TUTELLE**

présentée

pour obtenir le grade de **DOCTEUR**

**DE L'UNIVERSITE IBN ZOHR  
FACULTE DES SCIENCES D'AGADIR**

et

**DE L'UNIVERSITE DE STRASBOURG  
ECOLE DOCTORALE SCIENCE DE LA VIE ET DE LA SANTE**

Spécialité : Microbiologie

**PAR**

**Rkia EDDABRA**

**EVALUATION DE LA CONTAMINATION BACTERIOLOGIQUE DES  
EAUX USEES DES STATIONS D'EPURATION DU GRAND AGADIR :  
ISOLEMENT, CARACTERISATION MOLECULAIRE ET  
ANTIBIORESISTANCE DES ESPECES DU GENRE *VIBRIO***

SOUTENUE LE 29/10/2011 DEVANT LA COMMISSION D'EXAMEN

**COMPOSITION DU JURY :**

M. Abdelatif MOUKRIM	Professeur, Université Ibn Zohr, Agadir, Maroc	Président
M. El Hassane BOUDYACH	Professeur, Université Ibn Zohr, Agadir, Maroc	Rapporteur
M. Benaïssa ATTRASSI	Professeur, Université Ibn Tofaïl, Kénitra, Maroc	Rapporteur
M. Philippe ANDRE	Dr MCU-PH, Université de Strasbourg, France	Rapporteur
M. Gilles PREVOST	Dr MCU-PH, Université de Strasbourg, France	Examinateur
Mme Aïcha AIT ALLA	Professeur, Université Ibn Zohr, Agadir, Maroc	Examinateur
Mme Rachida MIMOUNI	Professeur, Université Ibn Zohr, Agadir, Maroc	Co-directeur de thèse
M. Jean-Michel SCHEFTEL	Dr MCU-PH, Université de Strasbourg, France	Co-directeur de thèse

## **AVANT PROPOS**

Les travaux présentés dans ce mémoire de thèse, ont été réalisés lors de la préparation d'une thèse en cotutelle au sein du Laboratoire : Systèmes Aquatiques, Milieu Marin et Continental de la Faculté des Sciences de l'Université Ibn Zohr d'Agadir (Maroc) sous la direction du Professeur Rachida MIMOUNI et dans le Laboratoire de Bactériologie des Hôpitaux de la Faculté de Médecine de Strasbourg (France), sous la direction du Dr. Jean-Michel SCHEFTEL.

### **PUBLICATIONS DANS DES REVUES A COMITE DE LECTURE**

1. **EDDABRA R.**, PIEMONT Y. and SCHEFTEL J.M. 2011. Evaluation of a new chromogenic medium, chromIDTM Vibrio, for the isolation and presumptive identification of *Vibrio cholerae* and *Vibrio parahaemolyticus* from human clinical specimens. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*. **30**:733–737.
2. **EDDABRA R.**, MOUSSAOUI W., PREVOST G., DELALANDE F., VAN DORSSELAER A., MEUNIER O., SCHEFTEL JM. and MIMOUNI R. 2011. Occurrence of *Vibrio cholerae* non-O1 in Three Wastewater Treatment Plants in Agadir (Morocco). *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. **27**:1099-1108.
3. MIMOUNI R., **EDDABRA R.**, BEN ZINE L. and ARAAB D. 2009. Microbiological quality of Ben Sergao wastewater purified by infiltration percolation: 15 years of experience. *Reviews in Biology and Biotechnology*. Vol 8, No 1.
4. **EDDABRA R.**, PREVOST G., MEUNIER O., SCHEFTEL JM. and MIMOUNI R. 2011. MALDI-TOF mass spectrometry analysis and molecular typing by pulsed-field gel electrophoresis of environmental *Vibrio* isolates. *Moroccan Journal of Biology*. N°08-09.
5. MIMOUNI R., YACOUBI B., **EDDABRA R.** 2011. Physicochemical quality of wastewater purified by infiltration-percolation: case of the plant of Ben Sergao (South-western morocco) after ten years of running. *Revue de Microbiologie Industrielle Sanitaire et Environnementale (REMISE)*. **5**:101-114.

### **COMMUNICATIONS ORALES**

#### *Congrès internationaux*

- **EDDABRA R.**, MIMOUNI R., MOUSSAOUI W., PREVOST G., SCHEFTEL JM. Identification des souches de *Vibrio* isolées des stations d'épuration par spectrométrie de masse MALDI-TOF. The second International Congress of Microbiology: *Water Microbial Biotechnologies and Sustainable Development*. **Fes, Morocco**, June 2d and 3d 2010.
- PREVOST G., MOUSSAOUI W., RIEGEL PH, MAIER T, **EDDABRA R.**, SCHEFTEL J-M, JAULHAC B, KOSTRZEWA M, PIEMONT Y. Application de la spectrométrie de masse en microbiologie. Colloque « Utilisation de la spectrométrie de masse en microbiologie ». Réunion de la Section de Microbiologie Médicale, Institut Pasteur. **Paris, France**, le 10 mars 2009.
- **EDDABRA R.**, YACOUBI B., MIMOUNI R. Étude physico-chimique et microbiologique de la Lagune de Khnifiss. Journées Francophones de Microbiologie des Milieux Hydriques. **Agadir, Maroc**, le 23-24 novembre 2006.
- **EDDABRA R.**, YACOUBI B., MIMOUNI R., MOUKRIM A. Evaluation de la qualité microbiologique et physico-chimique des eaux usées industrielles dans la Wilaya d'Agadir. Journées Francophones de Microbiologie des Milieux Hydriques. **Agadir, Maroc**, le 23-24 novembre 2006.

- MIMOUNI R., **EDDABRA R.**, BEN ZINE L. AARAB D., CHERRADI M-A., MOUKRIM A., Qualité microbiologique des eaux usées de Ben Sergao (Sud-ouest, Maroc), épurée par infiltration percolation à propos de quinz ans de fonctionnement de la station. Troisième congrès méditerranéen WATMED 3. **Liban**, le 1-3 novembre 2006. Avec publication de l'article de la communication.

### *Congrès nationaux*

- MIMOUNI R., AIT ALLA A., **EDDABRA R.**, SCHEFTEL JM., MONTEIL H., MOUKRIM A. Identification and susceptibility to antibiotics of Gram negative bacilli sampled in the wastewater and on the beaches from the Agadir Wilaya (Morocco). Journée scientifique Ressources Naturelles et Antibiothérapie. Faculté des Sciences **Kenitra, Maroc**, le 22 juin 2007.
- **EDDABRA R.**, YACOUBI B., MIMOUNI R. Réutilisation des eaux usées épurées en agriculture et son impact sur la qualité bactériologique des végétaux irrigués par ces eaux. Journées portes ouvertes Sensibilisation et Valorisation du Patrimoine Scientifique. **Agadir, Maroc**, le 17-18 février. 2006
- **EDDABRA R.**, YACOUBI B., N'GHIRA A., MOUKRIM A., MIMOUNI R. Contribution à l'évaluation de la qualité microbiologique et physico-chimique des rejets liquides de deux unités industrielles de traitement des produits de la mer à Agadir. Journées Marocaines des Sciences de la Mer. Ressources Biologiques Marines : Connaissance et Valorisation. **Agadir, Maroc**, le 11 et 12 novembre 2005.

### COMMUNICATIONS AFFICHEES

#### Congrès internationaux

- MANNAS H., N. E. CHAOUQY, **R. EDDABRA**, J. MARTINEZ URTAZA, R. MIMOUNI. Contribution à l'étude de prévalence des vibrons dans le milieu marin d'Agadir et d'Essaouira (Maroc). 1er Colloque International Littoraux des Pays Méditerranéens : états passés, actuels et futurs. **Larache – Maroc**, 10 au 12 novembre 2010.
- **EDDABRA R.**, MIMOUNI R., MEUNIER O., MOUSSAOUI W., PREVOST G., SCHEFTEL JM. MALDI-TOF MS analysis and molecular typing by pulsed field gel electrophoresis of environmental *Vibrio* isolates. ECCMID 20th. **Vienna, Austria**, 10 – 13 April 2010
- **EDDABRA R.**, MIMOUNI R., MOUSSAOUI W., PREVOST G., SCHEFTEL JM. Comparative analysis of *Vibrio* spp. isolated from two wastewater treatment plants of Agadir (Morocco). *Vibrio* 2009. **Rio de Janeiro City.,Brazil**, 4-6 November 2009
- **EDDABRA R.**, SCHEFTEL JM., PIEMONT Y. Evaluation of the performance of chromID™ *Vibrio*, a new chromogenic medium for isolation and presumptive identification of *Vibrio cholerae* and *Vibrio parahaemolyticus* from clinical specimens. 19th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ECCMID). **Helsinki, Finland**, le 16-19 Mai 2009.
- **EDDABRA R.**, YACOUBI B., N'GHIRA A., MOUKRIM A., MIMOUNI R. Évaluation de la qualité microbiologique et physico-chimique des rejets de la station d'épuration de Ben Sergao. Deuxième congrès méditerranéen WATMED 2. **Marrakech, Maroc**, 14- 17 novembre 2005.

## REMERCIEMENTS

*Ces quelques lignes me permettront de remercier les responsables et les personnes qui ont contribué de près ou de loin à la réalisation de ce travail tant au niveau scientifique qu'au niveau personnel, et sans leur aide, ce travail n'aurait pas pu aboutir à sa fin.*

*Je tiens tout d'abord à remercier mon Directeur de thèse, le Professeur **Rachida MIMOUNI**, qui a co-dirigé ce travail, ça ne sera jamais suffisant pour lui exprimer ma grande reconnaissance pour la confiance qu'elle m'a accordée pour faire avancer ce travail, pour sa patience, sa gentillesse, et son esprit responsable, critique et rigoureux.*

*J'adresse également ma reconnaissance à mon Co-directeur de thèse, le Docteur **Jean Michel SCHÉFTEL** pour avoir accepté de co-diriger mes travaux de recherche. Malgré ses innombrables occupations au laboratoire comme ailleurs, il m'a consacré énormément de temps, il m'a transmis une partie de son savoir de biologiste avec beaucoup de patience et de rigueur. Je lui adresse tous mes remerciements pour sa compréhension, son respect et son humanité. De plus, il n'a pas cessé de m'encourager et de faciliter mes déplacements pour la participation à de nombreuses manifestations internationales, chose qui a enrichie mes connaissances dans le domaine de la microbiologie et qui m'a donné de l'assurance.*

*Je tiens à remercier **Mr MOUKRIM A.** pour avoir accepté de présider le Jury de ma thèse. Je remercie vivement **Mr ANDRE Ph.**, **Mr ATTRASSI B.** et **Mr BOUDYACH E.H.** de bien vouloir accepter de juger mon travail. Merci également à **Mme AIT ALLA A.**, **PREVOST G.** et **Mme QUILICI M-L.** d'avoir accepté d'examiner ce travail et de faire partie de ce jury.*

*Je tiens à remercier l'ensemble du personnel du laboratoire d'hygiène hospitalière de Strasbourg **Mr MEUNIER O.**, et **Mmes HERRMANN F.** et **NAPOLITANO D.** Merci à **Mme HEATH-HERVIO D.** de l'Ifremer de Brest. Merci à **Mr. Monteil H.** ancien directeur de l'Institut de Bactériologie de la Faculté de Médecine de Strasbourg.*

*Merci aux Professeures **YACOUBI B.**, **KAYAA A.** et **BERGAYOU H.**, aux Messieurs **AARAB D.** (de la Délégation Médicale d'Agadir), **N'GHIRA A.***

(de l'Agence du Bassin Hydraulique), et **BEN ZINE L.** (RAMSA), au personnel du laboratoire d'enseignement de microbiologie de la Faculté des Sciences d'Agadir. Merci au Pr. **MADIDI S.** pour les analyses statistiques.

Je remercie tous mes collègues et ami(e)s de près ou de loin (voire de vraiment loin !), clin d'œil à **EL KADRY K.** et à ses réflexions philosophiques («c'est comme ça la vie!... »), aux ex-docotorants **AZDI M.**, **ANAJJAR E.M.** et **BANAOUI A.** maintenant partis vers d'autres horizons !!, aux filles **IDARDARE Z.**, **LEFRERE L.**, finalement, on finira en même temps !!, à **MAALAINAINE M.** et aux derniers venus, bonne chance !

Aux collègues de Strasbourg : **AKADDAR A.** et **MOUSSAOUI W.**, je vous dis merci et bonne chance pour la suite !

Je remercie chaleureusement l'ensemble des familles **SCHÉFTÉL**, **MISBAH**, **BOEHLER** et **CHAKRI**.

A la mémoire du Professeur **PIEMONT Y.** qui m'a acceptée au sein du Laboratoire de Bactériologie, Que dieu ait son âme en sa sainte miséricorde.

Je voudrai remercier le réseau **REMER**, l'Egide pour les bourses de stage, la société bioMérieux et l'association **ADERBA**, pour la subvention qu'elles m'ont attribué lors du 19 et 20ème congrès de l'**ECCMID** qui s'est déroulé à Helsinki et à Vienne.

En outre, la réalisation de ce travail n'aurait pas été possible sans le soutien moral et affectif et financier de **mes parents**. Je remercie ainsi tous les membres de **ma famille**. Je les remercie pour leur appui et leur dévotion durant toutes ces années.

A toutes les personnes citées et les autres que j'aurais pu oublier, **MERCI !!!**

## RESUME

Les eaux usées urbaines sont susceptibles de renfermer et de véhiculer une grande variété d'agents pathogènes pour l'homme (virus, bactéries et parasites). Les organismes pathogènes présents dans les eaux usées d'une collectivité, en reflètent l'état sanitaire. Au Maroc et principalement dans la Wilaya d'Agadir trois stations d'épuration des eaux usées fonctionnant selon la technique d'infiltration-percolation sur sable ont été mises en place. L'objectif de cette étude est de déterminer les caractéristiques physico-chimiques (pH, conductivité, température et salinité), et bactériologiques par dénombrement des indicateurs de contamination fécale, ainsi que l'étude des souches de *Vibrio* isolées tout au long du procédé du traitement des eaux usées (eaux usées brutes, décantées et épurées) pour les trois stations d'épuration (Ben Sergao, Drarga et L'Mzar).

Les résultats d'abattement des bactéries indicatrices de contamination fécale entre l'entrée et la sortie des stations d'épuration est de l'ordre de : i) 99,96% ; 99,97% ; 99,96% pour les spores de bactéries sulfito-réductrices, ii) 99,98% ; 99,97% ; 99,87% pour les entérocoques et iii) 99,99% ; 99,99% ; 99,95% pour les coliformes fécaux, respectivement à Ben Sergao, Drarga et L'Mzar. La qualité des eaux épurées issues des trois STEPs échantillonnées Ben Sergao, Drarga et L'Mzar, est de type A selon les recommandations de l'OMS (1989), mais pour que ces eaux épurées soient réutilisées en irrigation de façon non restrictive, le nombre des œufs d'helminthes doit être de moins de 1/L d'eau épurée.

Au cours de cette étude et après identification par le système Vitek 2 et/ou par PCR, sérotypage, 58 souches de *Vibrio* ont été isolées et analysées. Cette population est représentée par quatre espèces : 31 souches de *V. cholerae* non-O1, 17 souches de *V. alginolyticus*, 9 souches de *V. fluvialis* et une souche de *V. metschnikovii*.

Nous avons observé que: i) 53,44% des souches de *Vibrio* isolées ont un phénotype sauvage (résistance naturelle), ii) 46,56% des souches possèdent une résistance acquise caractérisée essentiellement par la production de pénicillinase à bas niveau ou par la production de céphalosporinase à bas niveau. Toutes les souches de *V. fluvialis* présentent le phénotype céphalosporinase à bas niveau.

L'étude des profils de migration électrophorétique de l'ADN total après macro-restriction enzymatique (pulsotypes) par *NotI*, a révélé un degré important d'hétérogénéité des souches de *Vibrio*.

Au cours de ce travail nous avons, également, utilisé la spectrométrie de masse MALDI TOF pour l'identification et la classification des souches de *Vibrio*. Cette technique est efficace et rapide pour l'identification et la classification des bactéries ; cependant la qualité de l'identification est fonction de la richesse de la banque de spectres enregistrés, nécessitant ainsi l'enrichissement de la base de données du logiciel BioTyper pour une meilleure interprétation. Le développement de cette base avec des spectres de référence permettra d'atteindre une plus grande spécificité.

**Mots clés :** Eaux usées, Station d'épuration, Bactéries fécales, *Vibrio*, Résistance aux antibiotiques, Spectrométrie de masse, Physico-chimie, Electrophorèse en champ pulsé.

## ABSTRACT

Municipal wastewater contains a variety of pathogenic microorganisms of human origin and high content of organic matter; therefore, it poses a number of potential risks for public health and the environment. Diseases caused by these pathogens can occur as a result of ingestion of untreated or improperly treated water, ingestion of infected aquatic food species, and skin contact with contaminated water and with improperly disinfected wastewater effluent reuse application. Such diseases are more likely in countries such as Morocco, characterized by scarce rainfall, lack of freshwater resources and high groundwater salinity where agriculture reuse of municipal wastewater is becoming a compulsory choice for water resources management.

This study evaluated the efficiency of the three wastewater treatment plants for the removal of physico-chemical and microbiological contaminants. To this end, three wastewater treatment plants in the region, Ben Sergao (750 m<sup>3</sup>/day), Drarga (1000 m<sup>3</sup>/day) and Mzar (54000 m<sup>3</sup>/day) were investigated. Wastewater samples were taken twice a month, from the individual plants and at different stages of the treatment process. Wastewater samples were characterized as follows: bacteriological parameters (fecal coliforms, fecal streptococci, and spores of sulphite reducing anaerobic bacteria), physical parameters (salinity, conductivity, pH, temperature) and in order to determine the efficiency of the WWTPs in removing pathogenic microorganisms, *Vibrio* strains were isolated. Standard methods were applied in all aspects of the analyses for the isolation and detection of this microorganism. Resistance to antibiotics and pulsed field gel electrophoresis were used to characterize *Vibrio* isolates, another purpose of this study, we examined the potential of MALDI-TOF mass spectrometry based bacterial fingerprinting to characterize *Vibrio* isolates.

Mean values were used to determine treatment performances of the three wastewater treatment plants. for the three wastewater treatment plants, electric conductivity didn't showed any difference between raw and treated wastewater and the mean values varying from 2900 µS/cm to 3300, the pH varying from 6,66 to 8,6, and the temperature varying between 16°C and 26.4°C. Removal efficiencies of fecal coliforms, *enterococci* and spores of sulphite reducing anaerobic bacteria were between 3 and 4 log unit for all the wastewater treatment plants.

Four species of *Vibrio* were identified, among the 58 *Vibrio sp.* isolated, 53,44% were identified as *V. cholerae*, 29,31% as *V. alginolyticus*, 17,78% as *V. fluvialis* and 1,74% as *V. metschnikovii*. Of the total 58 *Vibrio* isolates, 53,44% were susceptible to all antibiotics. Of the resistant (46,56%) *Vibrio* strains, 39,83% were resistant against one to three antibiotics, 22,44% were resistant against 4-5 antibiotics. PFGE with *NotI* digestion produced patterns with higher level of heterogeneity, and about 31% of *Vibrio* isolates were untypeable by the present PFGE method. MALDI-TOF-MS-based fingerprinting of *Vibrio* isolates has potential as a rapid for identification and finest differences between strains can readily be evaluated by the dendrogram based on percentage identity of MALDI-TOF mass spectra of *Vibrio* isolates, but requires further development for database of BioTyper2.

**Key words:** Effluent quality, Mass spectrometry, Pulsed field gel electrophoresis, Resistance to antibiotics, *Vibrio*, Wastewater, Wastewater treatment plant

# SOMMAIRE

<b>REMERCIEMENTS</b> .....	I
<b>RESUME</b> .....	III
<b>ABSTRACT</b> .....	IV
<b>ملخص</b> .....	V
<b>SOMMAIRE</b> .....	VI
<b>Liste des tableaux</b> .....	X
<b>Liste des figures</b> .....	XI
<b>Liste des annexes</b> .....	XIII
<b>Liste des abréviations</b> .....	XIV
<b>INTRODUCTION GENERALE</b> .....	1

## PREMIERE PARTIE: SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

<b>I. Les stations d'épuration des eaux usées</b> .....	5
I.1. Les différents types de stations d'épuration .....	6
I.2. Les stations d'épuration au Maroc.....	9
I.3. Situation du traitement des eaux usées au Maroc .....	9
I.4. Assainissement des eaux usées de la Wilaya d'Agadir .....	9
I.4.1 Avant la mise en service du réseau d'évacuation des eaux usées et les ouvrages de prétraitement de L'MZar .....	10
I.4.2. Après la mise en service du réseau d'évacuation des eaux usées et les ouvrages de prétraitement des eaux usées urbaines et industrielles.....	12
I.5. Réutilisation des eaux usées en agriculture.....	13
<b>II. Revue bibliographique sur le genre <i>Vibrio</i></b> .....	16
II.1. Morphologie.....	16
II.2. Ecologie .....	16



II.3. Taxonomie .....	17
II.4. Epidémiologie .....	18
II.5. Caractères bactériologiques des <i>Vibrio</i> pathogènes pour l'homme.....	19
II.5.1 <i>Vibrio cholerae</i> .....	19
II.5.2. <i>Vibrio alginolyticus</i> .....	21
II.5.3 <i>Vibrio fluvialis</i> .....	22
II.5.4. <i>Vibrio vulnificus</i> .....	22
II.5.5 <i>Vibrio parahaemolyticus</i> .....	22
<b>III. Méthodes d'identification: Des méthodes conventionnelles aux méthodes moléculaires</b> .....	23
II.1. Electrophorèse en champ pulsé.....	24
II.2. Spectrométrie de masse MALDI-TOF.....	25

## DEUXIEME PARTIE: MATERIEL ET METHODES

<b>I. Introduction</b> .....	27
<b>II. Description des stations d'épuration des eaux usées de la Wilaya d'Agadir</b> .....	28
II.1. Station de Ben Sergao .....	28
II.2. Station de Drarga .....	28
II.3. Station de L'Mzar .....	30
<b>III. Prélèvements et suivi des paramètres</b> .....	33
III.1. Rythme des prélèvements .....	33
III.2. Paramètres physico-chimiques.....	33
III.2.1. pH.....	33
III.2.2. Température .....	33
III.2.3 Conductivité.....	34
III.3. Paramètres bactériologiques .....	34
III.3.1 Dénombrement des coliformes fécaux.....	35
III.3.2. Dénombrement des entérocoques .....	35
III.3.3. Dénombrement des spores d'anaérobies sulfito-réducteurs .....	36
III.3.4. Abattement des bactéries fécales dans les trois STEP .....	37
<b>IV. Traitement statistique et analyse des données</b> .....	37
<b>V. Isolement et caractérisation des vibrions isolés</b> .....	38
V.1. Recherche des <i>Vibrio</i> .....	38

V.2. Identification phénotypique et sérotypage des souches de <i>Vibrio</i> .....	39
V.2.1. Identification des <i>Vibrio</i> .....	39
V.2.2. Sérotypage .....	40
V.2.2.1. Principe .....	40
V.2.2.1. Mode opératoire .....	40
V.3. Recherche de la toxine cholérique .....	40
V.3.1. Principe du RPLA .....	41
V.3.2. Mode opératoire .....	41
V.4. Détermination des profils de résistance aux antibiotiques.....	43
V.2.1. Antibiogramme par la technique de diffusion sur gélose .....	43
V.2.2. Antibiogramme par le système Vitek 2 .....	45
<b>VI. Analyse des profils génomiques et protéomiques des vibrions isolés .....</b>	<b>46</b>
VI.1. Typage moléculaire par électrophorèse en champ pulsé .....	46
VI.1.1. Principe .....	46
VI.1.2. Mode opératoire .....	47
VI.2. Spectrométrie de masse MALDI-TOF.....	49
VI.2.1. Principe .....	49
VI.2.2. Mode opératoire .....	50
VI.2.2.1 Dépôt direct de la colonie bactérienne.....	50
VI.2.2.2 Extraction des protéines bactériennes .....	50

## **TROISIEME PARTIE: RESULTATS ET DISCUSSION**

### **Chapitre I : *Dynamique de certains indicateurs de pollution au cours du traitement des eaux usées par infiltration-percolation***

<b>I. Caractéristiques physico-chimiques et bactériologiques des eaux usées brutes et traitées des stations d'épuration des eaux usées de la Wilaya d'Agadir .....</b>	<b>53</b>
I.1. Paramètres électrochimiques.....	53
I.1.1. Température .....	53
I.1.2. pH.....	53
I.1.3. Conductivité et salinité.....	55
I.2. Paramètres bactériologiques .....	57
I.2.1. Présence des bactéries fécales dans les eaux usées des trois STEPs.....	57
I.2.2. Abattement des bactéries fécales dans les trois STEPs.....	57
I.3. Analyse statistique .....	60

<b>II. Discussion</b> .....	63
-----------------------------	----

**Chapitre II : Recherche, isolement, identification et résistance aux antibiotiques des souches de *Vibrio* prélevés des eaux usées des stations d'épuration de la Wilaya d'Agadir**

<b>I. Isolement identification et résistance aux antibiotiques des vibrions</b> .....	66
I.1. Identification des souches, sérotypage et recherche de la toxine cholérique .....	66
I.1.1. Identification .....	66
I.1.2. Test d'agglutination à l'aide du sérum anti - O1et recherche de la production de la toxine cholérique.....	68
I.2. Résistance des vibrions aux antibiotiques.....	68
I.2.1. Résistance des souches isolées de la station d'épuration L'Mzar .....	70
I.2.2. Résistance des souches isolées de la station d'épuration de Drarga.....	70
I.2.3. Résistance des souches isolées de la station d'épuration de Ben Sergao ...	72
<b>II. Discussion</b> .....	74

**Chapitre III : Analyse génomique par électrophorèse en champ pulsé et évaluation de la spectrométrie de masse MALDI-TOF pour l'identification et la classification des souches de *Vibrio***

<b>I. Analyse phylogénétique des profils de l'électrophorèse en champ pulsé</b> .....	77
<b>II Etude des souches de <i>Vibrio</i> isolées par spectrométrie de masse MALDI-TOF</b> .....	81
II.1. Identification des souches de <i>Vibrio</i> par MALDI-TOF .....	83
II.1.1. Extraction protéique .....	83
II.1.2. Technique de dépôt direct "smear" .....	83
II.2. Classification des souches de <i>Vibrio</i> par MALDI-TOF.....	86
<b>III. Discussion</b> .....	88

<b>CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES</b> .....	92
--	----

<b>BIBLIOGRAPHIE</b> .....	94
----------------------------	----

<b>ANNEXES</b> .....	108
----------------------	-----

## LISTE DES TABLEAUX

<b>Tableau I</b> : Quelques agents pathogènes responsables d'infections d'origine hydrique .....	7
<b>Tableau II</b> : Situation des stations de traitement des eaux usées au Maroc.....	11
<b>Tableau III</b> : Caractéristiques dimensionnelles des composantes de la station d'épuration L'Mzar.....	30
<b>Tableau IV</b> : Représentation schématique de la technique d'agglutination RPLA pour la détection de la toxine cholérique.....	42
<b>Tableau V</b> : Liste des antibiotiques utilisés dans l'étude de l'antibiorésistance des souches de <i>Vibrio</i> .....	44
<b>Tableau VI</b> : Valeurs moyennes, écarts type et taux d'abattement des paramètres bactériologiques et physico-chimiques des eaux usées des 3 STEPs du Grand Agadir.....	59
<b>Tableau VII</b> : Matrice de corrélation obtenue à partir de l'analyse en composantes principales normées des paramètres physico-chimiques et bactériologiques des échantillons d'eaux usées prélevées <i>in situ</i> dans les trois stations d'épuration de la Wilaya d'Agadir.....	62
<b>Tableau VIII</b> : Répartition des souches de <i>Vibrio</i> dans les différents types d'eaux usées des stations d'épuration de la Wilaya d'Agadir .....	67
<b>Tableau IX</b> : Confirmation de l'identification de certains souches de <i>Vibrio</i> par la technique de polymérase chain reaction (PCR) .....	69
<b>Tableau X</b> : Souches de <i>Vibrio</i> non typés par l'électrophorèse en champ pulsé.....	79
<b>Tableau XI</b> : Scores de fiabilité de l'identification de certains souches de <i>Vibrio</i> déterminé par les techniques d'extraction protéiques et de dépôt direct comparées par le système MALDI TOF MS- BioTyper™ 2.0.....	85
<b>Tableau XII</b> : Identification des souches de <i>Vibrio</i> par le logiciel BioTyper™ 2.....	85

## **LISTE DES FIGURES**

<b>Figure 1</b> : Evolution du volume des rejets des eaux usées urbaines au Maroc entre 1960 et 1999 et la projection vers 2020 .....	11
<b>Figure 2</b> : Plan d'assainissement liquide du Grand Agadir.....	15
<b>Figure 3</b> : Phylogénie des vibrions (selon Thompson <i>et al.</i> , 2004) .....	20
<b>Figure 4</b> : Représentation schématique du principe de la spectrométrie de masse MALDI-TOF .....	26
<b>Figure 5</b> : Schéma de la filière épuratoire de la station d'épuration des eaux usées de Ben Sergao.....	29
<b>Figure 6</b> : Schéma de la filière épuratoire de la station d'épuration des eaux usées de Drarga.....	29
<b>Figure 7</b> : Localisation de la station d'épuration des eaux usées de L'Mzar .....	32
<b>Figure 8</b> : Principe de l'électrophorèse en champ pulsé .....	48
<b>Figure 9</b> : Schéma des différents constituants d'un spectromètre de masse .....	50
<b>Figure 10</b> : Schéma des différentes étapes d'identification bactérienne par MALDI-TOF/MS associé à un logiciel de classification dans un laboratoire d'analyses .....	52
<b>Figure 11</b> : Valeurs moyennes des paramètres physico-chimiques (pH, température) caractérisant les eaux usées brutes, décantées et épurées des stations d'épuration des eaux usées de la Wilaya d'Agadir.....	54
<b>Figure 12</b> : Valeurs moyennes des paramètres physico-chimiques (conductivité, salinité) caractérisant les eaux usées brutes, décantées et épurées des stations d'épuration des eaux usées de la Wilaya d'Agadir.....	56
<b>Figure 13</b> : Taux moyen des coliformes fécaux, des entérocoques et des spores sulfite réducteurs dans les eaux usées de la station d'épuration de L'Mzar (A), Drarga (B) et Ben Sergao (C).....	58
<b>Figure 14</b> : Analyse en composantes principales des paramètres physico-chimiques et bactériologique étudiés au niveau des stations d'épuration des eaux usées de la Wilaya d'Agadir .....	61
<b>Figure 15</b> : Identification des souches de <i>Vibrio</i> identifiés par le système Vitek2.....	67
<b>Figure 16</b> : Test d'agglutination RPLA pour la détection de la toxine cholérique .....	69
<b>Figure 17</b> : Profils de résistance aux antibiotiques des souches de <i>Vibrio</i> isolées des eaux usées (EB, ED, EE) des trois stations d'épuration de la Wilaya d'Agadir.....	71
<b>Figure 18</b> : Profils de résistance aux antibiotiques des souches de <i>Vibrio</i> isolées des eaux usées des trois stations d'épuration d'Agadir.....	73
<b>Figure 19</b> : Profils de certains souches de <i>Vibrio</i> , obtenus par électrophorèse en champ pulsé en utilisant l'enzyme <i>Sfi</i> et l'enzyme <i>NotI</i> .....	78

<b>Figure 20</b> : Profil de la souche <i>V. cholerae</i> n°5, obtenu par électrophorèse en champ pulsé en utilisant l'enzyme <i>Sfi</i> suivant le protocole PulseNet .....	78
<b>Figure 21</b> : Dendrogramme des profils d'ADN obtenus par électrophorèse en champ pulsé, indiquant la similarité des profils des souches de <i>Vibrio</i> prélevés des eaux usées des stations d'épuration de la Wilaya d'Agadir .....	80
<b>Figure 22</b> : Spectres de masse MALDI TOF représentant les souches de <i>Vibrio</i> prélevés des eaux usées des stations d'épurations de la Wilaya d'Agadir .....	82
<b>Figure 23</b> : Dendrogramme de classification des souches de <i>Vibrio</i> prélevés des eaux usées des stations d'épuration de la Wilaya d'Agadir (L'Mzar, Ben Sergao et Drarga).....	87

## **LISTE DES ANNEXES**

<b>Annexe 1 :</b>	Station type pour le traitement des eaux usées par infiltration-percoaltion .....	107
<b>Annexe 2 :</b>	Principe de fonctionnement des bassins d'infiltration percolation .....	107
<b>Annexe 3</b>	Pouvoir discriminant de certaines techniques pouvant être utilisées dans une approche taxonomique mixte et consensuelle .....	108
<b>Annexe4 :</b>	Protocole expérimental suivi pour le dénombrement de coliformes fécaux et des entérocoques dans les eaux usées (brutes, décantées et épurées) des trois stations d'épuration du grand Agadir .....	109
<b>Annexe 5 :</b>	les différents constituants d'un système Vitek® 2 .....	110
<b>Annexe 6 :</b>	Normes de qualité des eaux destinées à l'irrigation et normes de rejet dans le milieu naturel.....	111
<b>Annexe 7 :</b>	Sensibilité des <i>Vibrio</i> à l'agent vibriostatique O/129.....	112
<b>Annexe 8 :</b>	La recherche de <i>V. cholerae</i> O1 par agglutination sur lame avec un antisérum polyvalent anti-O1 .....	112
<b>Annexe 9 :</b>	Profils de résistance des souches de <i>Vibrio</i> prélevés des eaux usées de la station d'épuration des eaux usées de L'Mzar .....	113
<b>Annexe 10 :</b>	Profils de résistance des souches de <i>Vibrio</i> prélevés des eaux usées de la station d'épuration des eaux usées de Drarga .....	114
<b>Annexe 11 :</b>	Profils de résistance des souches de <i>Vibrio</i> prélevés des eaux usées de la station 116d'épuration des eaux usées de Ben Sergao .....	115
<b>Annexe 12 :</b>	Dendrogramme des profils d'ADN obtenus par électrophorèse en champ pulsé, indiquant la similarité des profils des différents souches. (A) : STEP de L'Mzar, B : STEP de Ben Sergao, C : STEP de Drarga .....	115
<b>Annexe 13 :</b>	Dendrogramme de classification des souches de <i>Vibrio</i> prélevés des eaux usées des stations d'épuration de la Wilaya d'Agadir (L'Mzar, Ben Sergao et Drarga).....	116
<b>Annexe 14 :</b>	A et B : Rejet des eaux usées au niveau de la plage Bouadisse (lors de la période de prélèvements de nos échantillons d'eaux usées), C : Travaux de construction de l'émissaire sud .....	117
<b>Annexe 15 :</b>	Composition des milieux de culture.....	118

## ***LISTE DES ABREVIATIONS***

$\alpha$ -HCCA	acide $\alpha$ -cyano-4-hydroxycinnamique
ACP	Analyse en Composante Principale
ADN	Acide désoxyribonucléique
AFNOR	Agence française de normalisation
Ag/Ac	Antigènes-Anticorps
ATB	Antibiotique
CF	Coliformes fécaux
CMI	Concentration minimale inhibitrice
UFC	Unité Formant Colonie
EB	Eaux usées brutes
ECP	Electrophorèse en champ pulsé
ED	Eaux usées décantées
EE	Eaux usées épurées
IFREMER	Institut Français de Recherche pour l'Exploitation de la Mer
kpb	kilopaires de bases
MALDI-TOF	Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time Of Flight Désorption-ionisation laser assistée par matrice
Moy	Moyenne
Mpb	Méga paires de bases
m/z	Rapport masse sur nombre de charge
NPP	Nombre le Plus Probable
OMS	Organisation Mondiale de la Santé
PCR	Polymerase chain reaction
RAMSA	Régie Autonome Multi-Service d'Agadir
SF	Entérocoques (Streptocoques fécaux)
SSR	spores de bactéries anaérobies sulfito-réductrices
STEPS	Stations d'épuration des eaux usées
T.A	Taux d'abattement
TFA	Acide trifluoroacétique
TCBS	Thiosulfate, Citrate de sodium, Bile de bœuf, Saccharose
TSA	Tryptic Soja Agar
TTC	Chlorure de 2, 3,5 triphényl tétrazolium
USAID	United States Agency for International Development
Ulog	Unité logarithmique



# ***INTRODUCTION GÉNÉRALE***

Face au déficit hydrique, à la croissance démographique élevée, à l'urbanisation effrénée et aux taux de croissance économique élevés que connaissent certains pays à climat aride tel le Maroc, les eaux usées peuvent être considérées comme une source non négligeable en eau et en éléments fertilisants. La réutilisation des eaux usées en agriculture peut soulager l'exploitation des ressources en eaux traditionnelles qui ne peuvent plus répondre aux besoins d'une agriculture intensive et réduire le déficit hydrique (Nigim *et al.*, 2002 ; Dadi, 2010). Cependant le rejet de ces eaux usées et leur réutilisation sans traitement préalable, posent de sérieux problèmes d'ordre sanitaire liés d'une part, au rejet de substances chimiques (détergents, métaux lourds,...) et d'autre part, au rejet de micro-organismes pathogènes tels que les protozoaires ou métazoaires parasites (œufs de *Giardia*, œufs d'helminthes...) et les bactéries pathogènes (*Salmonella sp*, *Shigella sp*, *Aeromonas sp*, *Vibrio cholerae*,...) ou pathogènes opportunistes (*Pseudomonas sp*, ...) Ces différentes espèces bactériennes pathogènes pour l'homme, véhiculées par les eaux usées représentent un danger potentiel pour la santé publique.

Les espèces du genre *Vibrio* sont des hôtes naturels des milieux aquatiques marins (Chakraborty *et al.*, 1997). L'eau joue un rôle important dans la transmission du germe de *Vibrio* à l'homme, soit par contact direct avec les eaux usées, ou indirectement par consommation des aliments contaminés dont les produits de la mer ou lors de baignades. Etant donné que les vibrions sont omniprésents dans le milieu aquatique, il est impossible de les éliminer par des mesures d'hygiène telles que le traitement et la désinfection des eaux usées (OMS, 2004). En ce qui concerne *V. cholerae*, il faut généralement au moins  $10^6$  bactéries pour provoquer le choléra ; or il est peu probable que les personnes qui se baignent ingèrent des vibrions en nombre suffisant pour contracter une gastro-entérite. Toutefois, le risque d'infections extra-intestinales associées aux vibrions pathogènes pour l'homme lors d'activités de loisir en milieu aquatique, en particulier l'infection des plaies et les otites, n'est pas négligeable, même si on ignore la dose infectieuse nécessaire à leur déclenchement (OMS, 2004).

Au Maroc, plusieurs cas de gastroentérites liées à la consommation des produits de la pêche sont répertoriés chaque année. Le diagnostic étiologique n'étant pas connu pour de nombreuses gastroentérites, elles peuvent vraisemblablement être liées aux vibrions. D'un autre côté, il a été reporté que les toxi-infections alimentaires collectives (TIAC) à *Vibrio* au Maroc sont toutes dues à la consommation des mollusques bivalves récoltés de manière

clandestine (Bouchriti *et al.*, 2000 ; Cohen *et al.*, 2007). Les mouches jouent un rôle considérable dans la dissémination des vibrions (Fotedar, 2000).

Les eaux usées de la Wilaya d'Agadir, au même titre que plusieurs villes côtières à l'échelle national et mondial , se déversent dans les eaux littorales constituant une perte d'un grand potentiel hydrique tout en provoquant des préjudices notables, à la fois pour l'écosystème et pour la santé de ses usagers. En effet, les eaux résiduaires sont susceptibles de renfermer et de véhiculer une grande variété d'agents pathogènes pour l'homme et pour l'animal. Le nombre et la variété des pathogènes rencontrés dans les eaux usées sont généralement liés au niveau d'infestation de la population desservie. Ces pathogènes peuvent être à l'origine d'un certain nombre d'épidémies. Devant tous ces problèmes, liés d'une part à la destruction de l'environnement et d'autre part aux nuisances causées par la dégradation de ce milieu récepteur, plusieurs techniques d'épuration des eaux usées ont été développées pour minimiser l'impact des rejets des eaux usées sur l'environnement. Parmi les techniques de traitement étudiées, l'infiltration-percolation sur sable.

## ***OBJECTIFS ET LIMITES D'INTERPRÉTATION DE L'ÉTUDE***

L'objectif de l'étude était d'obtenir un portrait global et représentatif du risque bactériologique des rejets des stations d'épuration municipales, lié aux agents pathogènes sans tenir compte des particularités du milieu récepteur ou de la charge rejetée par les effluents bruts et épurés des stations d'épuration. Par manque d'études des pathogènes au niveau des stations du Grand Agadir (L'Mzar et Drarga) et le peu d'études réalisées au niveau la station de Ben Sergao (Mimouni, 2004), nous avons isolé et caractérisé les espèces du genre *Vibrio*.

L'approche utilisée dans le cadre de notre étude, permet de comparer les effluents municipaux de trois stations d'épuration fonctionnant selon le système infiltration-percolation sur une base commune de façon à :

- Suivre la dynamique des indicateurs de contamination fécale et des paramètres physico-chimiques le long des filières d'épuration choisies dans le cadre de cette étude : Ben Sergao, Drarga et L'Mzar,
- Evaluer l'efficacité de ces ouvrages épurateurs dans l'élimination des vibrions surtout *Vibrio cholerae*,

- Etudier les souches de *Vibrio* isolées par méthode moléculaire à savoir l'électrophorèse en champ pulsé et par méthode protéomique, la spectrométrie de masse MALDI-TOF;

Cette approche ne permet toutefois pas de faire un lien de cause à effet entre le risque microbiologique et les effets potentiels sur le milieu. En effet, le risque microbiologique lié aux différents pathogènes présents dans les eaux usées peut être modifié en raison de certaines caractéristiques environnementales du milieu récepteur telles que la dureté, le pH, la température, la présence d'autres substances, la santé des populations présentes, etc. Pour évaluer l'impact appréhendé d'un effluent sur son milieu récepteur, il faut considérer, en plus des concentrations, les charges rejetées ainsi que les caractéristiques physiques (débit, hydrodynamisme, zones de déposition) et chimiques du milieu récepteur spécifique.

L'étude s'est limitée donc à l'aspect bactériologique et physico-chimique des effluents des stations d'épuration sans tenir compte des autres impacts possibles occasionnés par le rejet d'eaux usées municipales dans le milieu récepteur.

## ***PRESENTATION DU PLAN DU MEMOIRE DE THESE***

Le présent travail entre dans le cadre du suivi de la survie des bactéries d'intérêt sanitaire dans les différents milieux aquatiques en l'occurrence, dans les eaux usées épurées des stations d'épuration fonctionnant selon le système d'infiltration-percolation, et afin d'approfondir les connaissances sur la variabilité génomique des espèces du genre *Vibrio* isolées de différents types d'eaux usées des trois stations d'épuration de la Wilaya d'Agadir (Ben Sergao, Drarga et L'Mzar), ce travail a été initié en collaboration avec le Laboratoire de Bactériologie de la Faculté de Médecine et des Hôpitaux Universitaires de Strasbourg dans le cadre de la cotutelle de thèse. Ce mémoire a été divisé en trois parties.

**La première partie** est une synthèse généraliste sur les méthodes de traitement des eaux usées, de la situation des eaux usées au Maroc et plus particulièrement de la Wilaya d'Agadir, suivi d'une revue bibliographique sur le genre *Vibrio*, via une présentation des méthodes de caractérisation des souches de *Vibrio*.

**La deuxième partie** présente les protocoles de préparation et d'analyse des échantillons utilisés dans le cadre de cette thèse.

**La troisième partie** est subdivisée en trois chapitres et traite les résultats obtenus. **Le premier chapitre** de l'étude traite l'évolution spatio-temporelle de la flore bactériologique des effluents d'eaux usées (dénombrement des marqueurs de la pollution fécale des eaux : les coliformes fécaux, les entérocoques et les spores des bactéries sulfito-réductrices) et détermine la qualité de certains paramètres physico-chimiques (pH, température, salinité et conductivité). L'efficacité épuratoire de chaque station d'épuration a été déterminée pour chaque paramètre étudié et pour chaque station de traitement des eaux usées. **Le deuxième chapitre** s'intéresse à l'efficacité épuratrice du système infiltration-percolation vis-à-vis de l'espèce *Vibrio*. Ce chapitre traite les résultats de l'étude de la résistance aux antibiotiques, la production des toxines des souches isolées dans les différents types d'eaux usées des stations d'épuration étudiées: Ben Sergao, Drarga et L'Mzar. **Le troisième chapitre** étudie la variabilité génétique des souches de *Vibrio* par :

- des approches de typage moléculaire: électrophorèse en champ pulsé afin de déterminer les coefficients de similitude entre les souches isolées des trois stations d'épuration de la Wilaya d'Agadir et établir les dendrogrammes correspondants,
- et par l'approche protéomique : spectrométrie de masse (MALDI TOF), en comparant l'identification des souches de *Vibrio* par cette méthode avec l'identification par le système Vitek 2 (bioMérieux), et leur classification en établissant un dendrogramme par le logiciel BioTyper en se basant sur une analyse à variation multiple fondée sur l'analyse des composants principaux.

# **PREMIÈRE PARTIE**

**SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE**

## ***I. Les stations d'épuration des eaux usées***

Pendant plusieurs siècles les maladies bactériennes d'origine hydrique ont été responsables d'épidémies (fièvre typhoïde, dysenterie, choléra,...) (Monjour, 1997). Le **tableau I** reprend une liste des principaux agents pathogènes responsables de ces maladies (virus, bactéries et parasites). Les bactéries pathogènes, qui sont principalement amenées vers les eaux de surface par les rejets d'eaux usées domestiques, d'élevages et activités industrielles peuvent contaminer l'homme soit par consommation d'eau, soit lors d'un bain ou d'un contact avec des eaux à usage récréatif, soit par la consommation d'aliments contaminés. Cette dernière voie de transmission prend de plus en plus de l'importance (Bou Saab *et al.*, 2007). En effet, les produits de la mer (tels que les fruits de mer et les poissons), les fruits et les légumes qui ont été en contact avec une eau contaminée posent de sérieux problèmes de santé (OMS, 1989a ; Slifko *et al.* 2000).

La nature et la fréquence des germes pathogènes dans les eaux usées sont déterminées par des analyses bactériologiques fournissant plusieurs informations :

- Dans le cadre de la santé publique, l'analyse des eaux usées peut-être considérée comme un moyen simple de surveillance épidémiologique des infections entériques. En effet, cette analyse lorsqu'elle est effectuée périodiquement peut permettre de dresser la liste des germes entériques pathogènes en circulation dans la population, car la charge pathogène des eaux usées reflète l'état de santé de la population de la région (Payment, 2003).
- Dans le cadre du contrôle de la pollution de l'environnement, cette analyse permet d'apprécier l'importance de la pollution microbiologique quotidiennement déversée dans le milieu naturel.

Certains auteurs font une distinction entre infections «transmises» par l'eau et «associées» à l'eau. Les premières sont considérées comme telles car l'eau est le véhicule de l'agent infectieux ou parasitaire et le moyen principal de sa transmission. Il faut noter que le rôle joué par l'eau dans la transmission de certains agents a été parfois surestimé (virus poliomyélitique). Les secondes sont dues aux microorganismes associés à l'eau qui ont un potentiel de causer des infections sévères, voir mortelles, chez les patients fragilisés par des soins invasifs ou une condition immunosuppressante (INSPQ, 2009).

L'épuration des eaux usées consiste à décanter les éléments polluants particuliers et à extraire les éléments dissous qui sont transformés en matières sédimentables suite à un traitement approprié. Ainsi à la sortie de la station, il en résulte d'une part une eau épurée rejetée dans le milieu naturel ou réutilisée, et d'autre part, il reste des sous-produits désignés sous le terme des boues résiduelles (Werther et Ogada, 1999).

Les divers procédés d'épuration des eaux usées actuels entraînent une production plus ou moins importante d'eaux épurées susceptibles d'être réutilisées. La qualité de cette eau épurée dépendra de la nature des activités raccordées au réseau d'assainissement qu'elles soient industrielles ou domestiques.

### I.1. Les différents types de stations d'épuration

Il existe plusieurs filières avec différents types de traitement, mais le choix des procédés de traitement doit être adéquat du point de vue climatique, des applications attendues et du coût d'investissement (ADEME, 1996; Werther et Ogada, 1999). Ces procédés nécessitent un ensemble cohérent de traitements effectués après des prétraitements tels que le dégrillage, le dessablage et le dégraissage. On distingue les procédés intensifs dont les boues activées, les disques biologiques et les lits bactériens et les procédés extensifs dont le lagunage et l'infiltration-percolation.

- Les **boues activées** dont le principe consiste à favoriser le développement des bactéries épuratrices dans un bassin brassé et aéré, alimenté en eau à épurer. La qualité microbiologique du rejet et les rendements épuratoires peuvent atteindre des niveaux très élevés. Il est habituel d'obtenir des rendements d'élimination de la matière organique supérieurs à 95% (Duchène et Vanier, 2002).
- Le **lagunage naturel** où la dégradation de la pollution est assurée par des bactéries épuratrices en suspension dans l'eau. Le procédé permet d'obtenir des rendements d'élimination de la pollution organique de l'ordre de 70 à 80 % et un très bon abattement de la pollution bactériologique (Alexandre *et al.*, 1997).



**Tableau I** : Quelques agents pathogènes responsables d'infections d'origine hydrique.

	Agent pathogène	Symptômes
Virus	Virus de l'hépatite A	Hépatite A
	<i>Rotavirus</i>	Vomissement, diarrhée
	<i>Adenovirus</i>	Maladie respiratoire, conjonctivite, vomissement, diarrhée
	<i>Enterovirus</i>	Paralysie, méningite, fièvre
Bactéries	<i>Escherichia coli</i> O157:H7	Colite hémorragique, syndrome hémolytique et urémique (SHU)
	<i>Helicobacter pylori</i>	Ulcères gastro-duodénaux, cancers gastriques
	<i>Leptospira sp.</i>	Leptospirose
	<i>Salmonella sp.</i>	Fièvres typhoïdes et paratyphoïdes, gastroentérites aiguës.
	<i>Shigella sp.</i>	Dysenteries, gastroentérites
	<i>Escherichia coli</i>	Gastroentérites, diarrhées
	<i>Yersinia enterocolitica</i>	Gastroentérites
	<i>Legionella pneumophila</i>	Légionellose
	<i>Vibrio cholerae</i>	Choléra, diarrhées
Parasites	<i>Entamoeba histolytica</i>	Diarrhée, malabsorption
	<i>Giardia lamblia</i>	Diarrhée bénigne, ulcère du côlon
	<i>Cryptosporidium</i>	Toxoplasmose : ganglions, faible fièvre
	<i>Ascaris</i>	Anémie
	<i>Trichuris</i>	Diarrhée, douleur abdominale

(Sagik *et al.*, 1978; Edwards, 1992, National Research Council, 1998, Dosso *et al.*, 1998)

- Le **filtre en terre** ou le sol, généralement reconstitué (pouzzolane ou sable), constitue un support sur lequel se fixent les bactéries épuratrices. L'aération du massif filtrant, indispensable à un bon fonctionnement, est assurée grâce aux principes de l'alimentation par bâchées (à-coups hydrauliques à fort débit après un stockage temporaire), la ré-oxygénation du massif filtrant se fait par effet d'aspiration de l'air avec l'eau qui s'infiltre, et de l'alternance de phases d'alimentation et de repos (Wanko *et al.*, 2005). Parmi ce type de filière on compte le système d'infiltration-percolation adopté pour épurer les eaux usées de la ville d'Agadir.

**L'infiltration-percolation** sur sable est un traitement biologique par fixation naturelle des bactéries sur les grains du sable. Ce système a été adopté pour le traitement des eaux usées de la ville d'Agadir (Mimouni, 2004). Après une décantation anaérobie des eaux usées, celles-ci sont déversées et étalées sur les lits du sable, les eaux sont d'abord débarrassées des matières en suspension par filtration superficielle, puis leur matière organique est dégradée et leurs composés azotés sont oxydés sous forme de nitrates par les bactéries qui colonisent le sable. L'**annexe 1** montre les différentes étapes que les eaux usées suivent d'amont en aval, et l'**annexe 2** présente le principe de fonctionnement du système infiltration percolation.

Les phénomènes physiques, chimiques et biologiques mis en jeu pour l'épuration par le système infiltration percolation sont (Maresca, 1979 ; Billaut, 1989) :

- la filtration et la sédimentation des particules au niveau des pores du sol ;
- l'échange ionique, l'adsorption et la précipitation de sels dissous ;
- la biodégradation de la matière organique.

Le fonctionnement du système est basé sur la succession de périodes d'inondation et de dessiccation, ces dernières étant destinées à éviter la prolifération d'algues et à maintenir des conditions aérobies dans le sol pour permettre l'oxydation de la matière organique et entretenir une capacité d'infiltration élevée. En effet, les dépôts accumulés dans les pores, entravant l'aération du sol et favorisant la prolifération de bactéries anaérobies, peuvent entraîner un colmatage limitant fortement le fonctionnement du système (Brissaud *et al.*, 1989).

## I.2. Les stations d'épuration au Maroc

Depuis 1958, une soixantaine de stations d'épuration des eaux usées (STEPs) ont été construites au Maroc, mais en 1994 la grande majorité est hors service ou n'a pas été raccordée au réseau pour des raisons diverses : inadaptation de la filière de traitement aux conditions locales, défaut de conception des ouvrages, manque d'entretien, problèmes de gestion (absence de budget, manque de cadres techniques compétents), absence de planification à court et à long terme. Seuls 8 % des eaux usées sont épurées, le reste est déversé directement dans la mer (52 %), dans le réseau hydrographique (32 %) et les fosses septiques, ce qui entraîne une pollution importante du littoral, des cours d'eau et des nappes phréatiques.

En 2009, plus de 100 STEP s sont principalement installées dans des petites et moyennes villes de l'intérieur du pays marocain. Elles ont eu recours à des technologies diverses telles que les boues activées, les étangs, les filtres d'écoulement et les bassins de stabilisation et d'infiltration. La plus grande STEP du pays est celle de la ville de Tanger avec une capacité de 218 000 m<sup>3</sup>/jour. Cependant, seul 13% des eaux usées collectées sont traitées.

Les principales STEP sont les suivantes, par ordre de grandeur.

- Tanger avec une capacité de 218 000 m<sup>3</sup>/jour,
- Marrakech, 118 000 m<sup>3</sup>/jour, traitement primaire par boues activées,
- Meknès, 96 000 m<sup>3</sup>/jour, traitement primaire par lagunage,
- Agadir, 51 000 m<sup>3</sup>/jour, traitement secondaire par décantation anaérobie, infiltration-percolation, traitement tertiaire d'une partie des rejets pour la réutilisation,
- Settat, 17 000 m<sup>3</sup>/jour, traitement tertiaire par lagunage,
- Beni Mellal, 11 000 m<sup>3</sup>/jour, traitement secondaire par boues activées,
- Deroua, 2 000 m<sup>3</sup>/jour, traitement primaire par lagunage,

## I.3. Situation du traitement des eaux usées au Maroc

Le volume annuel des rejets d'eaux usées a triplé en passant de 148 à 370 millions de m<sup>3</sup> de 1960 à 1990 (**figure 1**). Ces rejets atteindront 900 millions de m<sup>3</sup> en l'an 2020 (C.S.E.C., 1994). Ceci s'explique par l'accroissement de la population urbaine, l'augmentation de

l'approvisionnement et de la consommation individuelle en eau potable ainsi qu'à l'utilisation importante d'eau par le secteur industriel et touristique.

Le Maroc dispose d'un patrimoine hydraulique non négligeable ; le volume mobilisable est de 21 milliards de m<sup>3</sup> dont 16 milliards de m<sup>3</sup> d'eaux de surface et 5 milliards de m<sup>3</sup> d'eaux souterraines. Actuellement, le volume mobilisé est de 11,7 milliards de m<sup>3</sup> dont 8 m<sup>3</sup> d'eaux de surface et 3,7 m<sup>3</sup> d'eaux souterraines. Ces ressources en eau ne peuvent subvenir à l'horizon 2020 à la demande croissante des secteurs tels que l'agriculture, l'industrie, l'eau potable, le tourisme, etc. Le problème se posera avec plus d'acuité dans le pays compte tenu de la répartition inégale de l'eau dans l'espace et dans le temps (H.C.P., 2006).

#### **I.4. Assainissement des eaux usées de la Wilaya d'Agadir**

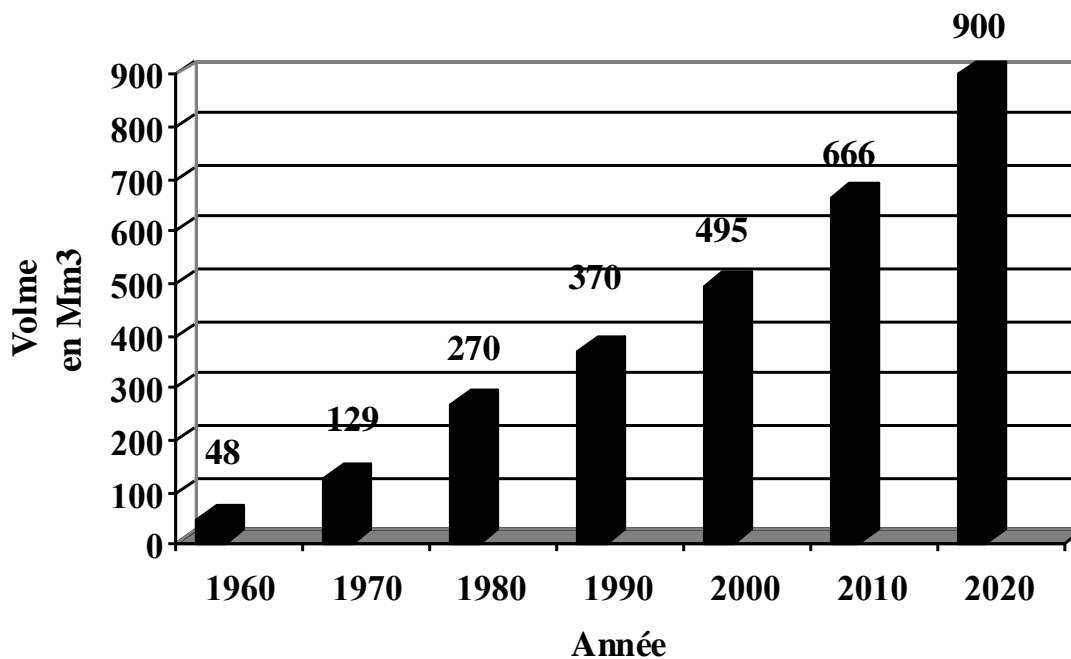
##### **I.4.1. Avant la mise en service du réseau d'assainissement des eaux usées et les ouvrages de prétraitement de L'Mzar**

- La totalité des eaux usées de la Wilaya d'Agadir était rejetée en mer par le biais d'un seul émissaire situé entre l'ancien et le nouveau Port.
- Les eaux usées de la ville d'Anza (urbaines et industrielles) étaient également rejetées en mer à travers un rejet urbain et un autre industriel avec plusieurs autres petits rejets.
- Les eaux usées de la ville de Ben Sergao sont rejetées dans les dunes d'Aghroud jusqu'à la mise en service du collecteur Agadir-Oued Souss en 2001 ; une partie de ces eaux (750 m<sup>3</sup>/j) est traitée par la station expérimentale depuis 1989.
- Les eaux usées du reste de l'agglomération regroupant les centres de Ben Sergao, de Dcheira, d'Inezgane, d'Ait Melloul et de Tikiouine sont rejetées dans l'estuaire de l'oued Souss.

**Tableau II.** Situation du traitement des eaux usées au Maroc.

Stations d'épuration des eaux usées	Nombre	En fonction	Hors service	Non-raccordée	Pourcentage en fonctionnement
Boues activées	20	12	5	3	60
Lits bactériens	11	5	6	0	45,5
Décanteurs- Digesteurs	17	2	13	2	11,8
Egouttage	3	0	3	0	0
Lagunage	13	7	5	1	53,8
Infiltration-Percolation	2	2	0	0	100
Chenal Algal	3	1	1	1	33,3
<b>Total</b>	<b>69</b>	<b>29</b>	<b>33</b>	<b>7</b>	<b>42,0</b>

Source : C.S.E.C (2001)

**Figure 1 :** Evolution du volume des rejets des eaux usées urbaines au Maroc entre 1960 et 2010 et la projection vers 2020 (Elabed, 2003).

#### **I.4.2. Après la mise en service du réseau d'assainissement et les ouvrages de prétraitement des eaux usées urbaines et industrielles**

- La totalité des eaux usées des villes d'Inezgane, de Dcheira, d'Aït Melloul et de Tikiouine et 70% de celles de la ville d'Agadir (32 000 m<sup>3</sup>/j) sont acheminées vers la station de relevage Souss, puis refoulées vers le site de la station L'Mzar où elles subissent une épuration primaire par décantation anaérobie, et une épuration secondaire par infiltration-percolation sur sable. Les eaux usées épurées sont ensuite rejetées par émissaire en mer de L'Mzar.
- Les 30 % des eaux usées de la Wilaya d'Agadir (12 000 m<sup>3</sup>/j) seront aussi raccordées incessamment à la nouvelle chaîne d'évacuation.
- Aussi, 44 000 m<sup>3</sup>/j seront rejetés après une épuration primaire sur la plage de L'Mzar, débarrassées de 50 à 60 % de la pollution.
- Les eaux usées d'Anza et du port d'Agadir (2 500 m<sup>3</sup>/j) sont rejetées respectivement par les rejets d'Anza (industriels et urbains) et au niveau de la jetée du port pour celles des deux ports sans aucun traitement en attendant la solution qui va être adaptée pour le réseau d'assainissement de la ville Anza.

La finalité du projet du schéma directeur d'assainissement liquide du grand Agadir, est de poursuivre l'amélioration des conditions de vie des populations résidentes et de l'attractivité touristique d'Agadir. Ses objectifs spécifiques sont de :

- (i) continuer la mise à niveau engagée de la collecte et du traitement des eaux usées ;
- (ii) renforcer la protection de l'environnement et de la biodiversité des écosystèmes côtiers, en supprimant la totalité de la pollution de la baie d'Agadir engendrée par les rejets d'eaux usées domestiques et industrielles ;
- (iii) mieux gérer les ressources en eau du bassin versant, en étroite association avec l'Agence de Bassin Hydraulique du Souss-Massa, grâce à des actions de dépollution industrielle et à la concrétisation d'une première expérience de réutilisation des eaux usées traitées à une échelle significative.

## I.5. Réutilisation des eaux usées en agriculture

Devant l'augmentation des besoins en eau, la multiplication démographique, l'amélioration du niveau de vie des populations et la rareté des précipitations dans les zones arides et semi-arides; la réutilisation des eaux usées constitue une solution incontournable pour faire face à la pénurie en eau. Les eaux usées sont recyclées depuis longtemps dans les zones arides comme la Namibie, où elles s'avèrent même être la ressource la plus fiable (Wintgens *et al.*, 2005). Mais les zones arides ne sont pas les seules à être concernées : dans de nombreuses régions d'Espagne, d'Australie, des États - Unis, du Moyen Orient, d'Afrique Australe, le recyclage est la solution choisie pour améliorer la disponibilité des ressources et réduire la pollution (Takashi, 1998). L'utilisation croissante des eaux usées brutes ou traitées à des diverses fins à travers le monde a contribué au développement de lignes directrices pour protéger l'environnement et la santé publique. À cet égard, la qualité de l'eau réutilisée est d'une importance capitale.

Les organisations mondiales et les chercheurs travaillent ensemble pour limiter les risques que présentent les eaux usées pour les ouvriers et pour les consommateurs de produits irrigués avec ces eaux usées. L'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) a élaboré en 1998 (b) des lignes directrices pour la qualité microbiologique de l'eau: une irrigation illimitée avec une qualité microbiologique de 1 œuf d'helminthes/L et un taux inférieur ou égal à 1000 bactéries coliformes fécales/100 mL.

Au Maroc, la réutilisation des eaux usées brutes est une pratique courante et très ancienne. Leur réutilisation en agriculture est le mode de valorisation le plus généralisé dans le pays. la réutilisation est réalisée à la périphérie de certaines grandes villes continentales où les terrains agricoles sont disponibles en aval des lieux de déversements des effluents, et également dans de petites parcelles aux alentours des rejets des réseaux d'assainissement (Angelakis *et al.*, 1999). Les contraintes climatiques amènent naturellement les agriculteurs à irriguer les cultures là où les ressources en eau sont disponibles. Durant les dernières années, la réutilisation des eaux usées s'est développée aussi autour de certaines agglomérations récemment pourvues d'un réseau d'assainissement. On totalise une superficie de plus de 7000 ha irriguée directement avec les eaux usées brutes rejetées par les villes, soit environ 70 millions de m<sup>3</sup> d'eaux usées réutilisées chaque année en agriculture sans qu'aucune précaution sanitaire ne soit appliquée (normes OMS par exemple). Une grande diversité de

types de cultures est concernée par cette réutilisation (cultures fourragères, cultures maraîchères, grandes cultures, arboriculture, ...).

L'irrigation des cultures maraîchères avec les eaux usées brutes est soumise à certaines conditions ([Décret N°2-97-875](#)) au Maroc. Mais, cette interdiction n'est pas respectée, soumettant ainsi à la fois le consommateur des produits agricoles et l'agriculteur à des risques de contaminations bactériologiques ou parasitologiques ([Jemali et Kefati, 2002](#) ; [Fatta et al., 2004](#)).

Depuis une dizaine d'années, de nombreux projets de recherches pluridisciplinaires de grande importance intéressant le traitement et la réutilisation des eaux usées épurées en irrigation ont été lancés au Maroc, afin d'apporter des réponses aux questions préoccupantes d'ordre agronomique, sanitaire et écologique. Les résultats de ces recherches ont permis de mettre à la disposition des collectivités locales et des bureaux d'études des données fiables nécessaires à la conception, au dimensionnement des stations d'épuration des eaux usées adaptées aux contextes locaux et à la conduite contrôlée de la réutilisation des eaux usées épurées en agriculture ([Jemali et Kefati, 2002](#)).

Le schéma directeur d'assainissement liquide (SDAL) du Grand Agadir a tracé plusieurs objectifs notamment: la protection des plages et de l'oued Souss contre la pollution, l'extension de la collecte des eaux usées et la réutilisation des eaux usées épurées pour l'arrosage des golfs et des espaces verts de la zone. Actuellement et afin de garantir la qualité en termes bactériologiques, la régie autonome de la mise en service d'Agadir (RAMSA) réalise un traitement tertiaire de désinfection par ultraviolet des eaux usées épurées de la station de L'Mzar, dont 300 m<sup>3</sup>/j sont déjà vendus à un terrain de golf. Une seconde tranche en cours de réalisation devrait permettre de porter cette réutilisation d'eaux usées traitées pour les espaces verts et les golfs à 3000 m<sup>3</sup>/j.





Figure 2 : Plan d'assainissement liquide du Grand Agadir. (P.D.A., 2008)

## II. Revue bibliographique sur le genre *Vibrio*

### II.1. Morphologie

Les bactéries du genre *Vibrio* appartiennent à la classe des  $\gamma$ -*Proteobacteria* et à la famille des *Vibrionaceae* décrite par Véron en 1965 (Véron, 1965). Le genre *Vibrio* est un genre essentiellement aquatique et principalement marin. Les *Vibrio* sont des bacilles à Gram négatif, droits ou incurvés, d'un diamètre compris entre 0,5 et 0,8  $\mu\text{m}$  et d'une longueur comprise entre 1,4 et 2,6  $\mu\text{m}$ . Toutes les espèces de *Vibrio*, à l'exception de *Vibrio metschnikovii* et de *Vibrio gazogenes*, sont positives pour le test de l'oxydase. Ils sont aéro-anaérobies, possédant un métabolisme respiratoire et fermentatif. La plupart des espèces fermentent le glucose, sans production de gaz. Les *Vibrio* présentent une mobilité due à un ou plusieurs flagelles polaires entourés d'une gaine qui est un prolongement de la membrane externe. A l'exception des espèces, *Vibrio cholerae* et *Vibrio mimicus*, qui sont halotolérantes, les espèces de *Vibrio* sont halophiles et requièrent du chlorure de sodium pour leur croissance. Elles poussent abondamment en milieux peptonés simples et généralement sur le milieu "marine agar". Une gélose TCBS (Thiosulfate, Citrate, Bile Salt, Sucrose agar) a été développée pour l'isolement sélectif de *V. cholerae* et de nombreux autres *Vibrio* peuvent également y être cultivés.

Certaines souches sont capables d'émettre de la lumière dites souches luminescentes. Cette luminescence se produit par un mécanisme redox aérobie (oxydation réduction), catalysé par un type unique d'enzymes : la luciférase (Voahanginirina, 1998). Parmi les *Vibrio sp.* luminescents : *Vibrio albensis*, *Vibrio fischeri*, *Vibrio logei*, *Vibrio harveyi* et *Vibrio splendidus*.

### II.2. Ecologie

Le genre *Vibrio* fait partie des bactéries autochtones des milieux marins, beaucoup vivent en saprophytes dans les eaux douces (Raoult, 1998), mais également commun dans les habitats aquatiques salés (eaux de mer, estuaires, intestins des animaux marins), les vases et les boues marines. Ce groupe bactérien qui, de part sa quantité et sa diversité, est un élément essentiel du fonctionnement des écosystèmes laguno-côtiers. Connue comme pathogène humaine, ce groupe est aussi impliqué dans les infections des animaux marins (mollusques, crustacés,

poissons) (Gay, 2004). Ceci résulte à la fois de la pression croissante induite par l'homme sur les zones côtières et de la plasticité génétique et phénotypique des *Vibrio* qui s'adaptent rapidement aux nouvelles conditions environnementales (Fischer-le Saux *et al.*, 2002).

### II.3. Taxonomie

Les bactéries appartenant aux genres *Vibrio* et *Photobacterium*, font partie des bactéries les plus anciennement décrites. Il revenait à R. Koch après l'observation de Pacini en 1854 de formes vibrionnées dans les selles de cas de choléra, d'isoler et d'incriminer *Vibrio comma* comme agent de la maladie cholérique, le vibron cholérique, en 1893 à Alexandrie (Howard-Jones, 1984). C'était la première maladie décrite rattaché à un vibron. Il a fallu ensuite attendre 67 ans pour que Fujino en 1950 authentifie une intoxication d'origine alimentaire due à une autre espèce de *Vibrio* : *Vibrio parahaemolyticus*.

La taxonomie du genre *Vibrio* a été modifiée de nombreuses fois, en fonction de l'évolution des techniques d'identification. A ce jour, le genre *Vibrio* compte 91 espèces bien identifiées (<http://www.bacterio.cict.fr/uw/vibrio.html>). Les premiers critères de la caractérisation taxonomique étaient basés sur quelques critères phénotypiques tels que la morphologie des souches (présence de flagelles, incurvation des cellules, aspect des cultures) et le métabolisme des sucres (Baumann *et al.*, 1971). Ces critères donnèrent lieu à un certain nombre d'erreurs de classification de nouvelles espèces et même de genres.

Au début des années 80, les outils d'identification des bactéries appartenant au genre *Vibrio* se sont considérablement améliorés avec l'utilisation d'un certain nombre de tests phénotypiques et une analyse en taxonomie numérique. Ces tests reposent sur l'utilisation de différents composés comme sources nutritives carbonées, la mise en évidence de certaines activités enzymatiques (arginine dihydrolase, gélatinase, chitinase, oxydase, catalase, lysine et ornithine décarboxylases), la tolérance au sel, la croissance à différentes températures, les antibiogrammes et la composition en GC % du génome (Alsina and Blanch, 1994). Cependant, en raison de la variabilité génotypique (plasticité du génome) au sein d'une même espèce des souches environnementales, une classification reposant uniquement sur des critères phénotypiques peut poser des problèmes et aboutir à des erreurs de classification taxonomique.

Aujourd'hui de nombreuses techniques de génotypage moléculaire sont disponibles pour des études de taxonomie (Vandamme *et al.*, 1996 ; Thompson *et al.*, 2004b). L'analyse de la

séquence des gènes ribosomiaux (ARNr 5S, 23S et notamment 16S) ont permis d'affiner la classification de la famille des *Vibrionaceae* (Kita-Tsukamoto *et al.*, 1993). Les hybridations ADN/ADN permettent de comparer de façon quantitative les génomes de 2 souches de bactéries. En bactériologie, deux souches appartiennent à la même espèce si le taux d'hybridation entre leurs génomes est supérieur à 90 % (Grimont, 1984 ; Stackebrandt *et al.*, 2002). Les dernières avancées en terme de taxonomie ont montré le pouvoir très discriminant du typage de séquence en multiloci ou MLST (pour MultiLocus Sequence Typing) basée sur le séquençage de plusieurs gènes (Maiden *et al.*, 1998).

#### II.4. Épidémiologie

En 2009, le nombre des cas de choléra notifiés à l'OMS a augmenté de 16% par rapport à 2008. Au total, 45 pays, sur tous les continents, ont notifié des cas de choléra à l'OMS : 221226 cas, dont 4946 mortels avec 217333 cas en Afrique (7 pays de l'Afrique australe : Afrique du Sud, Botswana, Malawi, Mozambique, Swaziland, Zambie, Zimbabwe, notifiant au total 108849 cas dont 3125 mortels, ce qui représente 50% de l'ensemble des cas survenus en Afrique) ; 1902 cas en Asie ; en Amérique du Nord : 10 cas importés (en USA) et 2 locaux (au Canada) ; 5 cas en Amérique latine (enregistrés uniquement au Paraguay) ; 1957 cas dont 45 mortels en Océanie ; 2 pays européens (France avec 1 cas et le Royaume-Uni avec 16 cas) ont notifié des cas importés (OMS, 2010). Début 2010, un tremblement de terre frappa Haïti, puis en Novembre 2010 une épidémie de choléra survenait après la contamination accidentelle de la rivière Artibonite par *Vibrio cholerae*. Le MSPP (Ministère de la Santé Publique et de la Population) a rapporté un total de 220784 cas de choléra à Haïti à *Vibrio cholerae* O1 sérotype Ogawa, dont 4334 décès et 121397 patients hospitalisés.

Le choléra reste donc l'une des grandes préoccupations de santé publique dans les pays en développement qui n'ont pas les infrastructures de base pour fournir l'accès à une eau saine et à l'assainissement. Cette maladie reste problématique pour la proportion croissante des populations vulnérables vivant dans de mauvaises conditions sanitaires.

De nombreux pays font d'énormes efforts pour endiguer la propagation du choléra mais l'inquiétude grandit devant les populations toujours plus nombreuses qui vivent dans des conditions d'insalubrité et sont exposées au risque de flambées de choléra et d'autres maladies diarrhéiques à potentiel épidémique. Le grand nombre de flambées confirmées et de cas notifiés à l'OMS révèle l'insuffisance des activités de lutte contre le choléra (OMS, 2010).

## II.5. Caractères bactériologiques des *Vibrio* pathogènes pour l'homme

Parmi les vibriens, [West et Colwell \(1984\)](#) recensent 6 espèces potentiellement pathogènes pour l'homme: *V. cholerae*, *V. parahaemolyticus*, *V. alginolyticus*, *V. vulnificus*, *V. fluvialis*, et *V. metschnikovii*. [Lee et Donovan \(1985\)](#), distinguent les vibriens entéropathogènes, entraînant des diarrhées, tels *V. cholerae*, *V. mimicus*, *V. fluvialis*, des vibriens provocants des infections non-entériques : *V. vulnificus*. En 1996, [Sears et Kaper](#) incluent *V. cholerae*, *V. parahaemolyticus*, *V. fluvialis*, *V. metschnikovii*, *V. hollisae* et *V. mimicus* dans les bactéries entériques toxinogènes et pathogènes pour l'homme (**figure 3**).

### II.5.1. *Vibrio cholerae*

*Vibrio cholerae* O1 et O139 sont les agents pathogènes du choléra, une maladie d'origine hydrique et alimentaire ayant un très important potentiel épidémique et pandémique. Le choléra survient dans des zones où les conditions et les infrastructures sanitaires sont inadéquates et il est associé à la contamination fécale de l'eau et des aliments. *V. cholerae* est largement distribué dans les environnements côtiers et estuariens. On compte parmi les réservoirs de *V. cholerae*, des copépodes, des plantes aquatiques, des insectes chironomides, des planctons et des cyanobactéries ([Lipp et al., 2003](#) ; [Islam et al., 2004](#) ; [Halpern et al., 2006](#)). Les souches non-O1/non-O139 peuvent également être pathogènes mais à la différence de ce qui se passe pour le choléra, il n'y a pas de transmission interhumaine des infections à *Vibrio cholerae* non-O1/non-O139. Les souches de *V. cholerae* non-O1/non-O139 n'ont qu'un réservoir, le réservoir environnemental hydrique ([Fournier et Quilici, 2002](#)). Les souches non-O1/non-O139 sont responsables habituellement de gastro-entérites et elles sont habituellement associées à des cas sporadiques et des petites flambées épidémiques plutôt qu'à des épidémies ([Desmarchelier, 1997](#)). Des flambées de choléra ont été associées à la consommation de produits de la mer crus, peu cuits ou contaminés après cuisson, notamment les huîtres, les crabes et les crevettes ([Oliver et Kaper, 1997](#)).

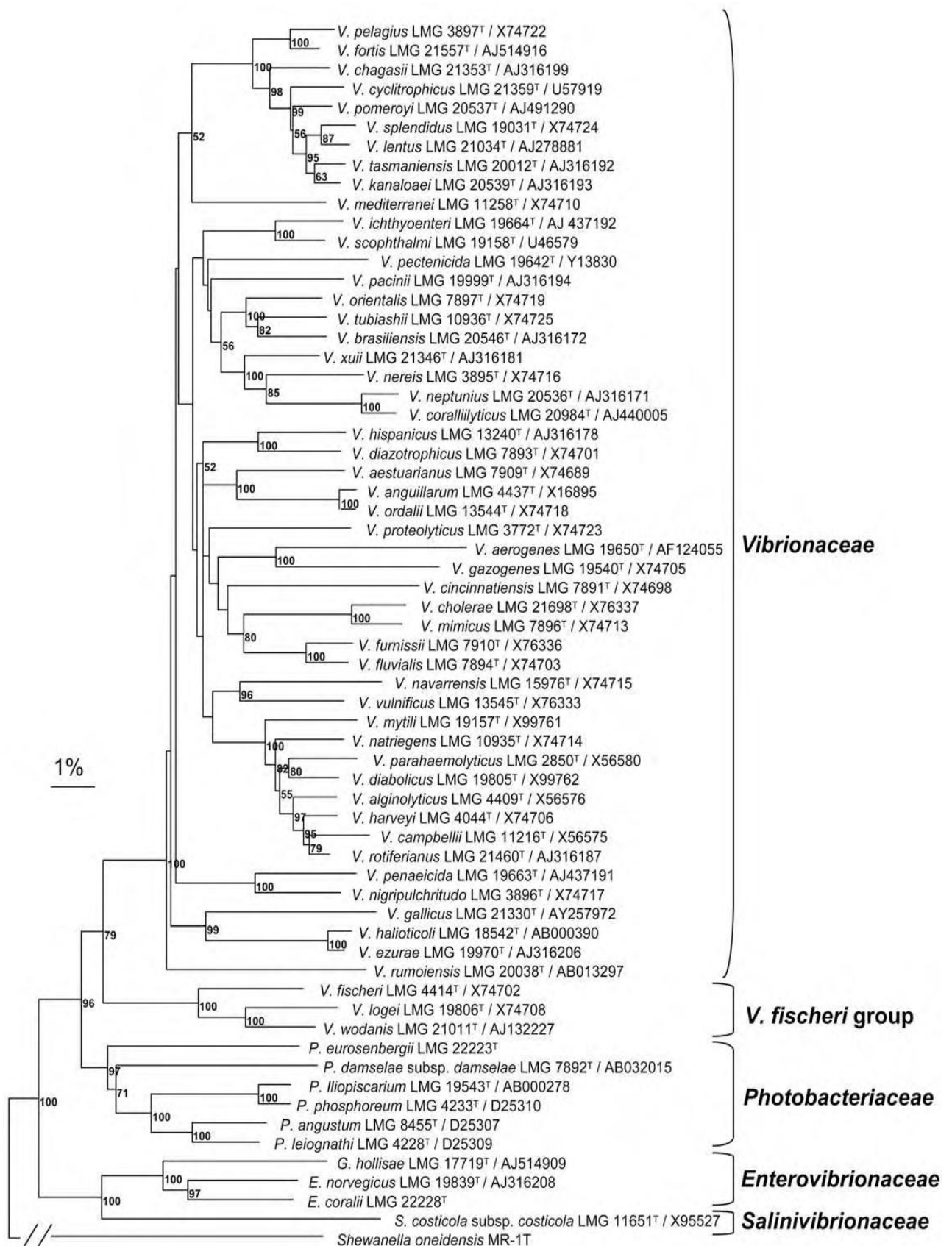


Figure 3 : Phylogénie des vibrions (selon Thompson *et al.*, 2004a)

L'espèce *V. cholerae* peut survivre dans un environnement moins salé que les espèces halophiles, et sa croissance est possible dans un milieu dépourvu en sel. Cette caractéristique contribue sans doute au caractère plus ubiquitaire des infections qu'elle entraîne. En effet, outre les produits de la mer et l'écosystème marin, les souches impliquées en pathologie humaine peuvent être également isolées d'aliments divers (pommes de terre, œufs, légumes et viandes) (Morris, 1990) ce qui suggère la possibilité d'une contamination d'origine fécale, transitant par les eaux usées d'origine domestique.

La classification des souches de *V. cholerae* se fait à partir de la caractérisation de l'antigène O (un constituant du lipopolysaccharide (LPS)) qui présente une grande diversité sérologique permettant de définir plus de 200 sérogroupes. Selon les définitions de l'OMS, seuls les sérotypes O1 et O139 causent le choléra (à l'intérieur du groupe O1, trois types sérologiques peuvent être distingués en utilisant des antisérums agglutinants monospécifiques (Ogawa, Inaba, Hikojima). L'aptitude à produire la toxine cholérique (TC) est le facteur déterminant de la virulence pour causer le choléra. Les vibrions non cholériques, ne produisant pas de toxine analogue à la toxine cholérique, sont incapables d'entraîner des infections pouvant se propager dans une population. En revanche, ils possèdent d'autres facteurs de pathogénicité qui sont à l'origine des différents syndromes observés lors des infections qu'ils provoquent : entérotoxine thermostable (ST), hémolysine/cytolysine et capsule polysaccharidique pour 70% des souches, conférant aux bactéries la résistance à la phagocytose et la possibilité de provoquer ainsi des septicémies chez les sujets immunodéprimés (Bonhomme, 2003).

### II.5.2. *Vibrio alginolyticus*

*V. alginolyticus* est un vibriion halophile dénué de pouvoir entéropathogène, à large répartition géographique dans les eaux marines et estuariennes en particulier dans les zones de baignade (Barbierji *et al.*, 1999 ; Baffone *et al.*, 2000) ; il a été associé à plusieurs maladies d'animaux marins y compris les poissons et les crustacés (Balebona *et al.*, 1998 ; Gomez-Leon *et al.*, 2005, Ben kahla-Nakbi *et al.*, 2006). La voie d'infection et de transmission de cette espèce reste à étudier, une des voies de transmission est probablement l'eau de mer ; on ne sait pas si cette bactérie est endémique dans l'environnement marin et si elle se comporte comme un pathogène opportuniste des poissons (Ben Kahla-Nakbi *et al.*, 2007).

Chez l'homme, *V. alginolyticus* peut être isolé à partir d'infections cutanées (ulcères, cellulite), souvent à la suite d'un contact avec de l'eau de mer (Rubin *et al.*, 1975 ; Scheftel *et*

*al.*, 2006 ; Campanelli *et al.*, 2008). *V. alginolyticus* est plus halophile que *V. cholerae* avec lequel il partage beaucoup de caractères (Denis *et al.*, 2007), plusieurs études ont montré une large diffusion de gènes de *V. cholerae* et *V. parahaemolyticus* entre les souches de *V. alginolyticus* dans l'environnement (Snoussi *et al.*, 2008). Il présente comme certains *Proteus* un caractère diffusible des colonies sur gélose au sang.

### II.5.3. *Vibrio fluvialis*

*V. fluvialis* est fréquent au niveau des eaux saumâtres et estuariennes. Cette espèce est potentiellement pathogène pour l'homme et peut causer des gastro-entérites. *V. fluvialis* produit une entérotoxine présentant une similarité immunobiologique avec la toxine cholérique produite par les souches de *V. cholerae* O1 (Ahsan *et al.*, 1988 ; Igbinsa et Okoh, 2010). Cette bactérie produit aussi une hémolysine identifiée par une hémolyse de type  $\beta$  sur gélose au sang, Han *et al.* (2002) ont cloné le gène correspondant.

### II.5.4. *Vibrio vulnificus*

*V. vulnificus* est un agent infectieux pour l'homme transmis par la consommation de fruits de mer contaminés ou par contact d'une blessure ou plaie avec de l'eau de mer. Des infections opportunistes, chez des patients fragilisés, peuvent causer le décès en 24 à 48 heures (Oliver, 2005).

Cette bactérie est halophile, abondamment présente dans les écosystèmes estuariens, et dans les eaux saumâtres. Sa multiplication est favorisée par des températures supérieures à 20°C et une salinité modérée (15-25g/L), mais elle est capable de persister, en passant en stade viable non cultivable (VNC) à des températures très froides allant jusqu'à -20°C (Fischer-le Saux *et al.*, 2002).

### II.5.5. *Vibrio parahaemolyticus*

*V. parahaemolyticus* est l'agent responsable de gastroentérites caractérisées par des douleurs abdominales, des diarrhées liquides, des nausées et des vomissements (Bourgeois *et al.*, 1990). En général les gastro-entérites font suite à la consommation des produits de la mer consommés crus ou insuffisamment cuits. *V. parahaemolyticus* est présent dans



l'environnement marin (eaux côtières et estuariennes). Il se trouve à l'état libre dans l'eau, associé au zooplancton et aux algues, contamine les mollusques, les crustacés (crevettes...), les céphalopodes (calamars...) et les poissons (Robert-Pillot, 2006).

### **III. Méthodes d'identification : Des méthodes conventionnelles aux méthodes moléculaires**

Dès la fin du 19<sup>ème</sup> siècle, Robert Koch soupçonnait l'existence d'une source de choléra dans l'environnement, mais cela n'avait pas été prouvé puisque *Vibrio cholerae*, agent responsable du choléra, n'avait pu être isolé entre les épidémies. Les procédures bactériologiques conventionnelles basées sur les caractéristiques biochimiques, pour l'isolement des vibrions à partir d'échantillons naturels, y compris l'eau, étaient généralement infructueuses, longues et fastidieuses car *V. cholerae*, vibron marin qui requiert du sel pour sa croissance, entre dans une phase de dormance appelée "état viable non cultivable", quand les conditions sont défavorables à sa croissance et sa reproduction. Actuellement les tests d'identification biochimique ont été miniaturisés et automatisés, ce qui les rend plus rapides à mettre en œuvre et plus économiques. Parmi ces tests on distingue, les kits constitués pour la plupart d'un dispositif contenant plusieurs puits et permettant de réaliser les 15 à 20 tests nécessaires pour identifier une espèce ou un groupe bactérien. Actuellement ces méthodes rapides ont également permis l'automatisation des réactions et de la lecture, de nombreux dispositifs automatisés existent en microbiologie clinique notamment le système Vitek 2<sup>®</sup> (Pérez-Vázquez *et al.*, 2001), mais cela reste plus rare quand à la microbiologie environnementale. Ces méthodes classiques d'identification bactérienne peuvent conduire à une confusion entre les espèces, notamment entre l'espèce *V. parahaemolyticus*, biochimiquement très proche de l'espèce *V. alginolyticus*, qui n'a pas la même implication en pathologie humaine (Robert-Pillot, 2006).

Les techniques de biologie moléculaire offrent de nouveaux outils pour l'étude des relations qui existent entre les organismes englobant la classification, la nomenclature et l'identification, et permettent de définir des empreintes digitales et la singularité d'une souche bactérienne (annexe 3). De nombreuses méthodes de typage ont été développées pour différencier les souches de *Vibrio*. Certaines, phénotypiques, incluent le sérotypage et le biotypage et différents schémas de lysotypage, d'autres moléculaires notamment le

séquençage des gènes ribosomiaux (ARNr 5S, 23S et notamment 16S) a permis de remanier la classification des *Vibrio* (Kita-Tsukamoto *et al.*, 1993), l'analyse du polymorphisme de restriction des gènes codant la toxine cholérique (*ctx*), le polymorphisme électrophorétique d'enzymes métaboliques (multilocus enzyme electrophoresis ou MLEE), la PCR au hasard (RAPD : *Random Amplification of Polymorphic DNA*), et surtout le ribotypage, ont été appliquées. Actuellement parmi les applications récentes de technologies émergentes employées figure la spectrométrie de masse (Dieckmann *et al.*, 2010).

### III.1. Electrophorèse en champ pulsé

En 1984, Schwartz et Cantor ont proposé un nouveau concept pour la séparation des molécules d'ADN d'une taille supérieure à 50 kilopaires de bases (kpb): l'utilisation de champs électriques alternatifs (champs pulsés). Cette technologie permet de séparer des molécules d'ADN d'une taille allant de quelques kpb à 10 Mpb (Méga paires de base) soit ( $10^7$  pb). L'ADN bactérien est extrait puis clivé par des endonucléases qui reconnaissent des sites de restriction rares sur le chromosome (de l'ordre de 10 sites par mpb), ce qui permet d'obtenir un nombre réduit de fragment d'ADN. L'ECP permet de séparer ces fragments de grande taille et de comparer des souches bactériennes en fonction de leurs profils de macrorestriction. L'enzyme de macrorestriction est choisie en fonction du contenu en G + C de l'ADN bactérien ainsi que du nombre de sites de reconnaissance de l'enzyme au sein de l'ADN (Siméon *et al.*, 1997)

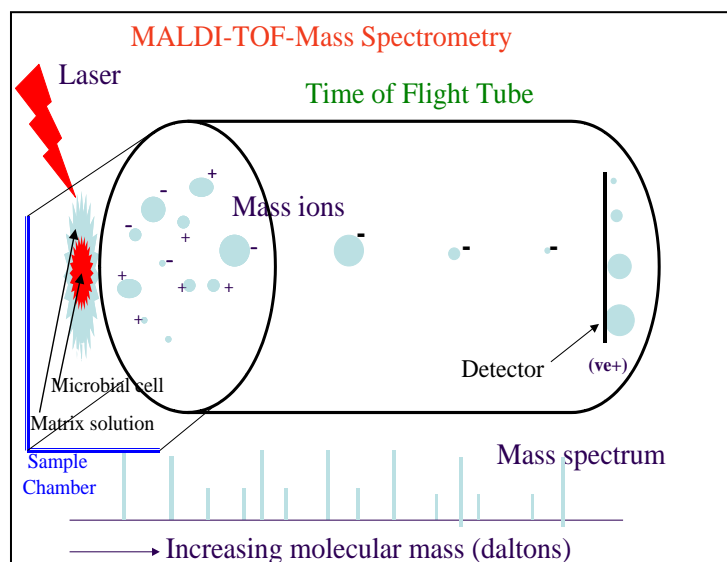
L'électrophorèse en champ pulsé (ECP) s'avère très performante pour analyser une grande variété de microorganismes. En bactériologie médicale, l'ECP est considérée comme la méthode de référence pour le typage épidémiologique en comparant des profils de restriction ou pulsotypes de différentes souches bactériennes au sein d'une même espèce en fonction du polymorphisme des fragments de restriction du génome (Tenover *et al.*, 1995 ; Wong *et al.*, 1996). D'un point de vue taxonomique, cette technique va permettre d'étudier le génome bactérien dans sa globalité. En effet, une détermination du nombre de chromosomes, de mégaplasmides et/ou de grands plasmides ainsi que leur taille et leur conformation (circulaire ou linéaire) est possible après électrophorèse de l'ADN intact (Yamaichi *et al.*, 1999 ; Dean et Bazylinski, 1999). Certains auteurs utilisent cette technique pour étudier la plasticité génomique en ciblant des régions spécifiques de l'ADN après Southern blot et hybridation (Reynaud, 2008).

Actuellement, un réseau d'experts s'est constitué, le réseau «PulseNet» en vue de standardiser et d'harmoniser des protocoles optimaux pour cette technique de génétique moléculaire et de constituer une base de données électronique des différents profils obtenus par électrophorèse en champ pulsé. Le réseau PulseNet renforce la surveillance des maladies par l'analyse de l'empreinte moléculaire des agents pathogènes, assure l'alerte rapide en cas d'épidémie de maladies à vecteur alimentaire ou véhiculées par l'eau, d'apparition d'agents pathogènes et d'actes de bioterrorisme.

### III.2. Spectrométrie de masse MALDI TOF

La spectrométrie de masse MALDI-TOF permet l'identification des bactéries par analyse de leurs protéines totales (protéines ribosomales et protéines associées aux membranes) (Claydon *et al.*, 1996). L'identification est réalisée selon deux modes opératoires : dépôt direct de la colonie bactérienne (fin frottis ou smear) ou dépôt des protéines bactériennes préalablement extraites. Quelle que soit la nature du dépôt, le micro-organisme est déposé sous la forme d'un fin frottis à la surface d'une plaque métallique puis recouvert d'une matrice donneuse d'électrons (acide sinapinique, HCCA) qui sera bombardée par un faisceau laser (**figure 4**). Les spectres sont lus dans la gamme de masse 2000 – 20000 Da. La matrice permet de protéger l'analyte (l'échantillon) d'une ionisation directe, de refroidir les ions (distribution plus fine de l'énergie cinétique), d'améliorer le rendement d'ionisation. Le choix de la matrice dépend du type de laser utilisé puisque les molécules de matrice doivent présenter une forte absorption à la longueur d'onde émise par le laser et dépend aussi de la nature des molécules à ioniser.

L'identification d'un spectre inconnu est réalisée à l'aide d'un algorithme de reconnaissance qui considère les positions des pics dont l'intensité est comprise entre 1 à 1000. Le logiciel associé au spectromètre génère automatiquement une liste de pics à partir du spectre obtenu après l'analyse de l'échantillon. Cette liste de pics est ensuite comparée aux listes de pics enregistrées dans une banque de données pour tous les spectres typiques de chaque espèce. Un score d'appariement ou de vraisemblance classe les spectres et précise la ou les identifications bactériennes les plus plausibles. À partir des spectres obtenus, il est possible de construire un dendrogramme fondé sur les scores de similarités (Courcol, 2009).



**Figure 4 :** Représentation schématique du principe de MALDI-TOF-MS (Shah, 2005).

Le spectre de masse est susceptible de variations. La nature du milieu de culture, la durée d'incubation des cultures peuvent influencer sur la qualité du spectre obtenu. Par exemple, les colonies doivent être jeunes pour ne pas avoir de dégradation des protéines ribosomales et des protéines associées aux membranes. Ces protéines, de masse moléculaire relativement faible, sont les mieux conservées et offrent une typicité d'espèce.

En taxonomie, les protéines ribosomales abondantes et très stables permettent d'affiner les relations taxonomiques entre micro-organismes (Lay, 2001). Les Centres de ressources biologiques ont recours à la spectrométrie de masse pour faciliter l'identification des bactéries et l'édification de bases de données constituées de spectres de référence.

Une banque de spectres est générée par plusieurs mesures d'une espèce ou d'une souche bactérienne connue sous différentes conditions de culture. De ces essais, les informations spécifiques du spectre sont extraites. Un profil moyen est obtenu après la mesure de 20 spectres. Le logiciel génère automatiquement les listes des pics à partir de tous les spectres et extrait les pics typiques qui sont présents dans un certain nombre de spectres d'une seule espèce.

Les micro-organismes inconnus sont identifiés en comparant leurs pics individuels à la banque de données. Le « matching score », fondé sur les masses identifiées et la corrélation de leurs intensités, est généré et utilisé pour classer les résultats. Un algorithme de recalibration permet de corriger les déviations de masses des pics.

**DEUXIÈME PARTIE**  
**MATERIEL ET METHODES**

## ***I. Introduction***

Nos exigences dans le choix des stations d'épuration ont été des exigences de représentativité au niveau de chaque STEP : type, qualité du rejet, qualité de traitement, qualité de l'effluent d'entrée, taille de la STEP. Les STEPs étudiées ont été choisies pour leur traitement tertiaire : procédé d'infiltration-percolation sur sable dunaire, traitement le plus utilisé dans la région du sud du Maroc. Trois stations d'épuration ont été retenues pour notre étude présentant des capacités différentes et dont les effluents proviennent soit de l'activité urbaine (Ben Sergao, Drarga) soit de l'activité urbaine et industrielle (la grande station de la ville d'Agadir : station de L'Mzar). L'épuration des eaux usées par le procédé d'infiltration-percolation consiste à faire percoler lentement les eaux usées à travers un milieu granulaire (sable) dans lequel on maintient un écoulement non saturé d'eau et selon un mode d'apport séquentiel qui fait alterner les périodes d'alimentation et les périodes de repos (E.P.A., 1981).

Les premières analyses microbiologiques de l'eau, à la fin du siècle dernier, portaient uniquement sur la recherche des microorganismes pathogènes. Cette méthode se heurta à des difficultés de deux ordres, qui subsistent aujourd'hui :

- i.** Il existe une multitude d'agents pathogènes (bactéries, virus et protozoaires) et les rechercher tous exigerait des analyses nombreuses, toujours onéreuses, le plus souvent délicates et difficiles à réaliser en routine.
- ii.** Les pathogènes ne sont généralement présents dans l'eau que de façon très irrégulière. Il faudrait donc multiplier les analyses, ce qui est techniquement et financièrement irréalisable.

Telles sont les raisons pour lesquelles, a été introduite la notion de "germes témoins" pour apprécier le risque d'origine microbiologique. Ces germes sont toujours présents en grand nombre dans les matières fécales des humains et des animaux à sang chaud, se maintiennent plus facilement dans le milieu extérieur et peuvent être aisément identifiés. Ces germes sont appelés germes indicateurs de pollution fécale et leur présence dans l'eau au moment du prélèvement témoigne de l'existence d'une contamination fécale. Leur mise en évidence dans l'eau n'est pas la preuve de la présence de pathogène, mais permet de la suspecter fortement.

Dans ce chapitre, nous présentons les stations d'épuration (STEPs) retenues dans le cadre de notre étude ainsi que les différentes méthodes mises en œuvre pour suivre de point de vue bactériologique et physico-chimique les performances épuratoires de chaque unité de

traitement. Il présente les différents paramètres analysés ainsi que les méthodes de détermination de ces paramètres.

## ***I. Description des stations d'épuration des eaux usées de la Wilaya d'Agadir***

### **II.1. Station de Ben Sergao**

En 1984, les autorités locales de la ville d'Agadir et la coopération Française ont décidé l'expérimentation d'un nouveau procédé d'épuration des eaux usées (lagunage anaérobie) suivi de l'infiltration des eaux traitées au stade primaire à travers un massif de sable de 2 m d'épaisseur. Une station pilote a été mise en place en 1986 à Ben Sergao (à 6 km au sud de la ville d'Agadir) sur une surface de 300 m<sup>2</sup> de bassins d'infiltration sur sable pour tester ce procédé.

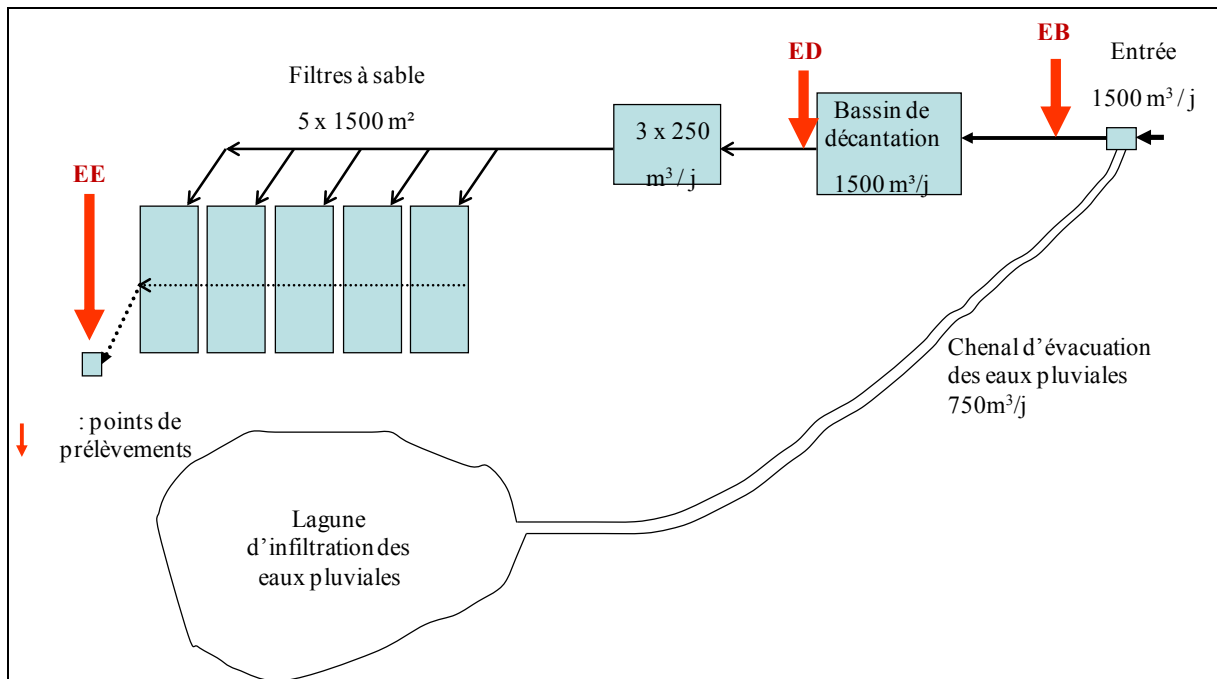
Les résultats encourageants ont conduit les responsables et les autorités locales à réaliser une station industrielle et expérimentale pour traiter un débit de 750 m<sup>3</sup>/j (soit 10000 éq/hab.) des eaux usées urbaines par le système reposant sur une décantation anaérobie de 48 heures suivie d'une infiltration-percolation sur sable. Cette station est composée :

- d'un traitement primaire par lagunage anaérobie,
- d'une filière secondaire de 5 bassins d'infiltration-percolation sur un lit de sable d'épaisseur de 2 m.

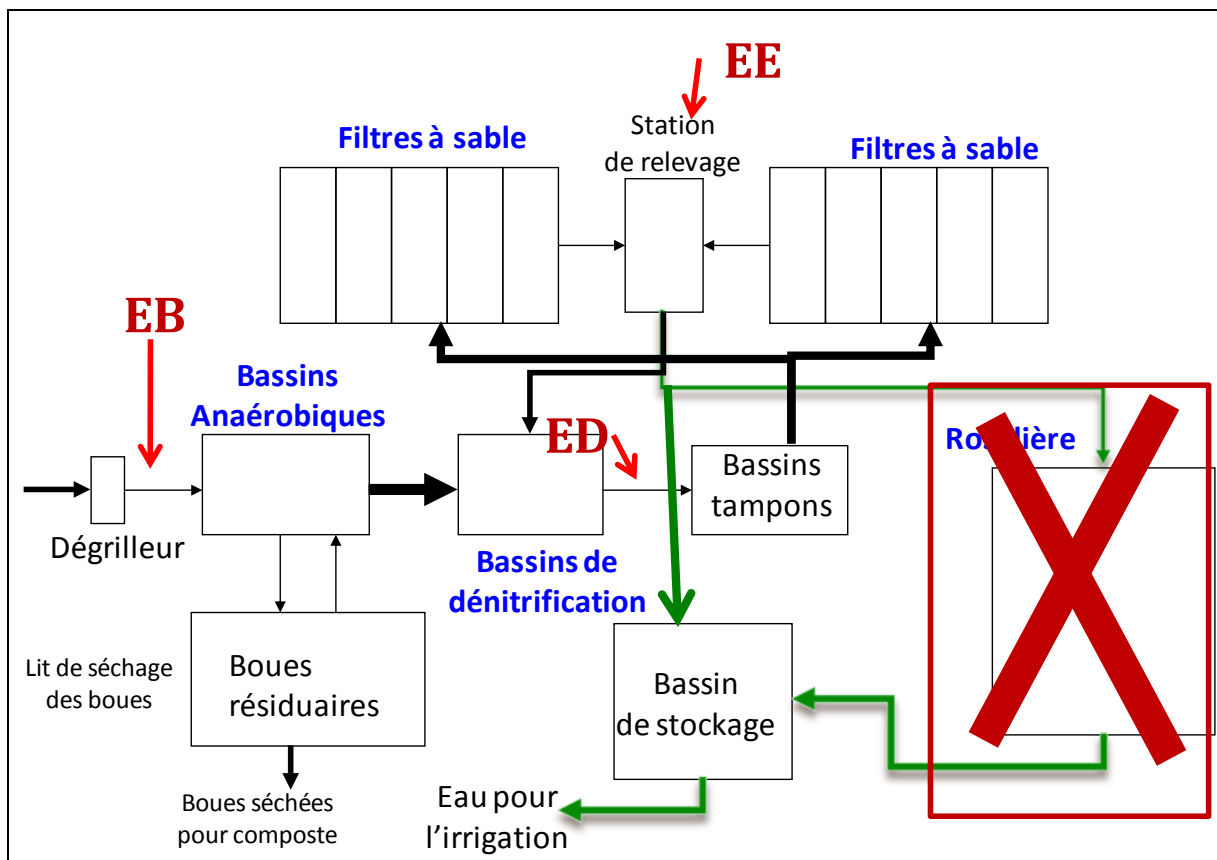
Les points de prélèvements des échantillons d'eaux usées sont représentés sur la **figure 5**.

### **II.2. Station de Drarga**

La commune de Drarga est située sur la rive droite de l'Oued Souss. Elle fait partie du chapelet des communes riveraines de l'Oued Souss et ne s'inscrit pas dans le Schéma Directeur d'Assainissement du Grand Agadir. Elle est située à 16km de la ville d'Agadir. Le projet pilote de la station de traitement et de réutilisation des eaux usées de Drarga s'inscrit dans le cadre du programme de coopération que le Maroc a signé avec l'Agence américaine pour le développement international (USAID) (USAID, 2002). La station a une capacité de traitement de 1000 m<sup>3</sup>/jour et utilise le système d'infiltration-percolation pour l'épuration des eaux usées.



**Figure 5:** Schéma de la filière épuratoire de la station d'épuration des eaux usées de Ben Sergao (Mimouni *et al.*, 2009).



**Figure 6:** Schéma de la filière épuratoire de la station d'épuration des eaux usées de Drarga,

Tirée d'USAID, 2002, p. 11



La filière de traitement installée à Drarga est composée d'un dégrilleur automatique, d'un bassin de décantation anaérobie, d'un bassin de dénitrification de 2x5 bassins d'infiltration en parallèle fonctionnant de manière séquentielle, qui fait alterner les périodes d'alimentation (3 jours de fonctionnement successifs) et les périodes de repos (2 jours). La moitié du flux des eaux usées décantées est orienté vers une roselière (utilisée comme traitement tertiaire) qui alimente 2 bassins de stockage suivi des champs d'irrigation et l'autre moitié est dénitrifiée. La station est en fonctionnement depuis la fin de l'année 2000 (**figure 6**). Cependant durant la période de prélèvement la roselière n'était pas en fonctionnement, ainsi la moitié des eaux usées sensées être acheminée vers la roselière est acheminée directement vers les bassins de stockage.

Les points de prélèvements des échantillons d'eaux usées sont représentés sur la **figure 6**. A l'entrée de la station : eaux usées brutes (EB), après les bassins de dénitrifications (ED), et après la filtration sur sable au niveau de la station de relevage (EE).

### II.3. Station de L'Mzar

La station de L'Mzar, construite en 2002 sur le site des dunes de L'Mzar dans l'enceinte du parc national Souss Massa, fonctionne selon le procédé infiltration-percolation et dispose actuellement de 13 bassins de décantation et 10 autres sont prévues entre 2010 et 2020 (**tableau III**).

**Tableau III** : Caractéristiques dimensionnelles des composantes de la station d'épuration L'Mzar.

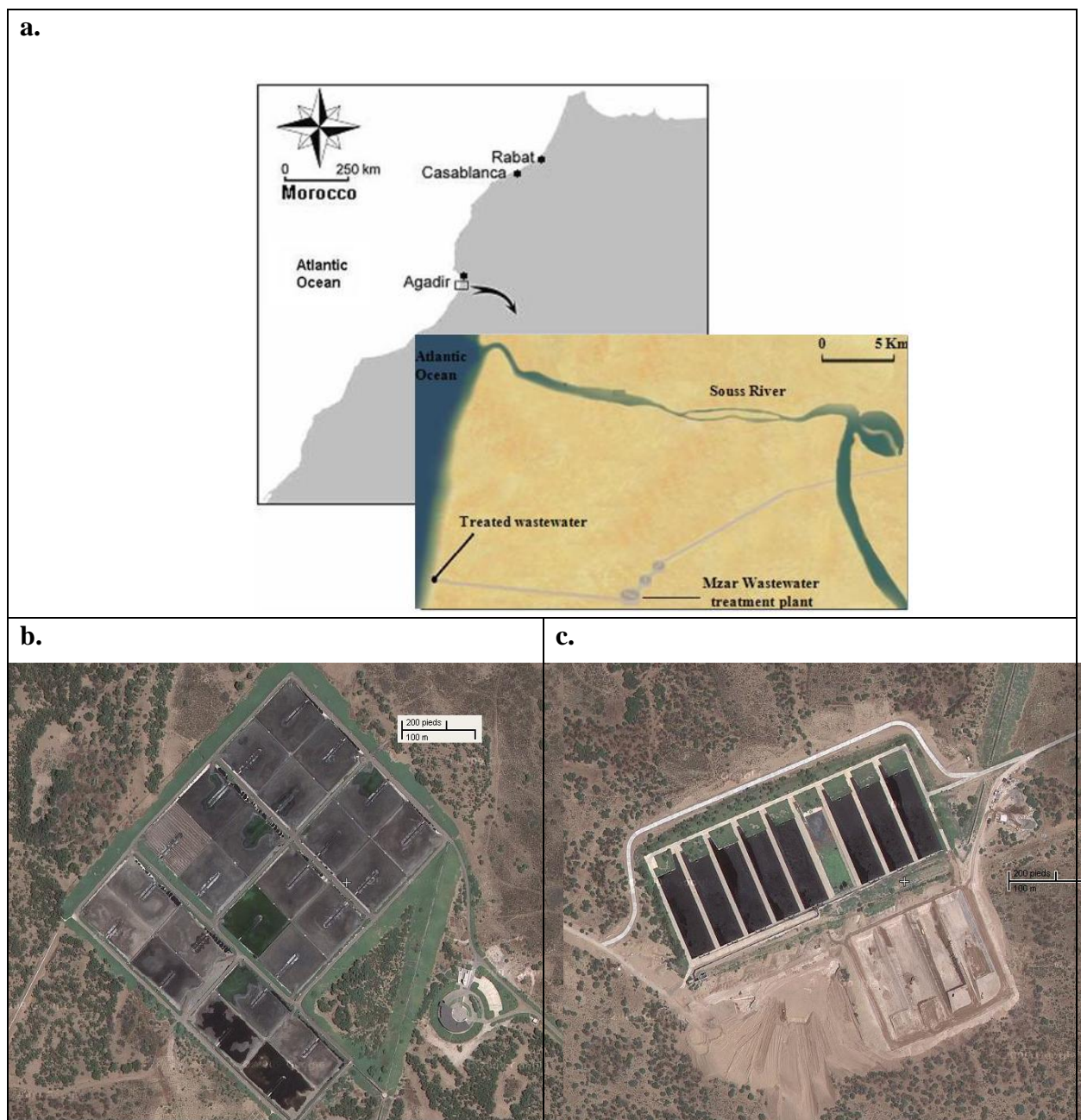
Décanteurs	Filtres à sables
13 décanteurs (115 X 35); 50000m <sup>3</sup> /j	24 filtres à sable (2m); Débit à traiter 10000m <sup>3</sup> /j.
Profondeur 4,30 à 6,60 m	Epaisseur du filtre : 2 m de sable, et 0.5m du gravier
Temps de séjour 2,5j	Surface de chaque filtre : 5000 m <sup>2</sup> environ

A terme, cette station d'épuration devra traiter la totalité des eaux usées domestiques et industrielles du Grand Agadir. La station d'épuration de L'Mzar (**figure 7**) en cours de réalisation repose sur le même procédé que celui adopté à la station de Ben Sergao et de Drarga. Elle comprend :

- Un traitement primaire par décantation anaérobie, avec un module de capacité de 50000 m<sup>3</sup>/j mis en service depuis novembre 2002.

Une épuration secondaire par infiltration -percolation sur sable. Cette épuration secondaire est réalisée en 2 phases : une première tranche de 10000 m<sup>3</sup>/j est en service ; le complément pour atteindre un débit total de 50000 m<sup>3</sup>/j fera l'objet d'une seconde tranche.

Les points de prélèvements : à l'entrée de la station (EB), après les bassins de décantation (ED), et après la filtration sur sable (EE).



**Figure 7 :** Localisation de la station d'épuration des eaux usées de L'Mzar (a), bassins d'infiltration sur sable (b) et bassins de décantation (c). ([www.maps.Google.fr](http://www.maps.Google.fr))

### III. Prélèvements et suivi des paramètres

#### III.1. Rythme des prélèvements

Au niveau des trois stations d'épuration (Ben Sergao, Drarga et L'Mzar), des prélèvements instantanés des effluents ont été réalisés au niveau de trois points : les eaux usées brutes (EB), les eaux usées décantées (ED), les eaux usées épurées (EE). Les points de prélèvements des eaux usées sont représentés dans les figures des STEPs (**figures 5, 6**).

Les prélèvements ont été effectués entre 9 et 11 heures (9h à Drarga, 10h à L'Mzar et 11h à Ben Sergao) avec une périodicité bimensuelle (de décembre 2006 à juin 2007). Les flacons contenant les échantillons d'eaux usées à analyser ont été transportés dans des conditions isothermes entre 4°C et 6°C. Les analyses sont effectuées dans les trois premières heures qui suivent les prélèvements.

#### III.2. Paramètres physico-chimiques

Les paramètres étudiés sont : le pH, la conductivité, la salinité et la température. Ces paramètres ont été mesurés *in situ* directement au niveau des échantillons ponctuels d'eaux usées prélevés dans les trois stations d'épuration : Ben Sergao, L'Mzar et Drarga.

##### III.2.1. pH

Ce paramètre conditionne un grand nombre d'équilibres physico-chimiques, et dépend de facteurs multiples dont la température et l'origine de l'eau. En milieu côtier et estuarien, certains rejets industriels ou les apports d'eaux de ruissellement sont la cause de variation du pH qui s'avère être, dans ce cas, un indice de pollution ([Aminot et Chaussepied, 1983](#)).

Le pH et la température ont été mesurés à l'aide d'un pH mètre (HI9025 Hanna Instruments).

##### III.2.2. Température

La température est un facteur écologique important du milieu. Elle permet de corriger les paramètres d'analyse dont les valeurs sont liées à la température (conductivité notamment).

De plus, en mettant en évidence des contrastes de température de l'eau sur un milieu, il est possible d'obtenir des indications sur l'origine et l'écoulement de l'eau. Il est important de connaître la température de l'eau avec précision. En effet, celle-ci joue un rôle dans la solubilité des sels et surtout des gaz, dans la détermination du pH, pour la connaissance de l'origine de l'eau et des mélanges éventuels, etc. (Rodier *et al.*, 1996).

### III.2.3. Conductivité

La conductivité mesure la capacité de l'eau à conduire le courant électrique entre deux électrodes. La plupart des matières dissoutes dans l'eau se trouvent sous forme d'ions chargés électriquement. La mesure de la conductivité permet donc d'apprécier la quantité de sels dissous dans l'eau. La conductivité est également fonction de la température de l'eau ; elle est plus importante lorsque la température est élevée. Les résultats doivent donc être présentés pour une conductivité équivalente à 20 ou 25°C. Les appareils de mesure utilisés sur le terrain font généralement la conversion automatiquement.

La conductivité et la salinité de l'eau ont été mesurées à l'aide d'un conductimètre (WTW 525).

### III.3. Paramètres bactériologiques

Les analyses bactériologiques des différents échantillons d'eaux usées ont consisté en un dénombrement des germes indicateurs de contamination fécale, à savoir les coliformes fécaux (CF), les entérocoques (SF) et les spores anaérobies sulfite-réducteurs (SSR). Les méthodes utilisées pour la détermination des indicateurs de pollution fécale sont multiples. Les critères de choix d'une technique dépendent de l'origine, de la nature de l'eau à examiner (eau de forage ou de puits, eau trouble, eaux usées, etc.), des facteurs relatifs à la qualité des résultats et des facteurs relatifs au coût des analyses. Les méthodes classiques utilisées sont :

- La filtration sur membrane : basée sur la filtration des échantillons (0,45 µm) et la mise en culture du filtre sur un milieu gélosé dans des conditions (durée, température) adaptées au micro-organisme recherché;
- L'étalement sur une gélose sélective d'une prise d'essai de l'échantillon ou d'une dilution (entre 0,1 et 0,5 mL);

- La dilution en milieu liquide ou le nombre le plus probable (NPP) : consiste en l'ensemencement de prises d'essai de l'échantillon et/ou de dilutions, dans un milieu de culture liquide.

Dans le cadre de notre étude les numérations bactériennes ont été réalisées par dénombrement indirect par la technique de dilution et étalement de 0,1 mL de l'échantillon brute ou l'une de ces dilutions sur les milieux de culture appliquée aux eaux usées brutes et décantées des trois stations d'épuration et les eaux épurées de la station de L'Mzar. Pour les eaux épurées de la station de Ben Sergao et de Drarga la technique utilisée est la filtration sur membrane (Q=0,45 µm) de 100mL de l'échantillon brut (**annexe 4**).

### III.3.1. Dénombrement des coliformes fécaux

Coliformes fécaux ou coliformes thermotolérants, sont un sous-groupe des coliformes totaux capables de fermenter le lactose à une température de 44,5°C. L'espèce la plus importante de ce groupe bactérien est *Escherichia coli* (*E. coli*) et, dans une moindre mesure certaines espèces des genres *Citrobacter*, *Enterobacter* et *Klebsiella* (Elmund *et al.*, 1999; Emmanuel, 2004).

L'évolution spatio-temporelle des abondances des C.F. a été appréciée par le dénombrement des colonies jaune-orange sur le milieu gélosé au Tergitol et au Chlorure de Triphényl Tetrazolium (TTC – Tergitol 7). Les boîtes ensemencées ont été incubées à 44,5°C pendant 24 heures (**annexe 4**). (AFNOR, 2001).

### III.3.2. Dénombrement des entérocoques

Les entérocoques sont des bactéries sphériques, en paires ou en chaînettes, à Gram positif, catalase négative, anaérobies facultatives qui hydrolysent l'esculine en présence de bile (CEAEQ, 2006). Ce test est caractéristique des bactéries du groupe D de Lancefield. Sous la dénomination générale d'entérocoques (streptocoques fécaux) et selon l'OMS, les streptocoques fécaux sont en grande partie d'origine humaine. Cependant, certaines bactéries de ce groupe proviennent également des fèces des animaux comme *Streptococcus bovis*, *S. equinus*, *S. gallolyticus* et *S. alactolyticus* (Clausen *et al.*, 1977; Farrow *et al.*, 1984; Bitton, 1999), ou se rencontrent même sur les végétaux. Ils sont néanmoins considérés comme

indicateurs d'une pollution fécale, et leur principal intérêt réside dans le fait qu'ils soient résistants à la dessiccation et persistent plus longtemps dans l'eau (Gleeson et Gray, 1997). Ils apportent donc une information supplémentaire sur une pollution.

La présence d'entérocoques est évaluée par dénombrement des colonies noires avec halo noir sur le milieu gélosé à la bile, à l'esculine et à l'azide de sodium, après incubation à 37°C pendant 48h (annexe 4) (AFNOR, 2001).

Il est important de mentionner que la valeur du rapport coliformes fécaux/streptocoques fécaux est utilisé comme un élément informatif de premier ordre. En effet, quand il est supérieur à 4, la pollution est d'origine humaine. Lorsque ce rapport est inférieur à 0,7, la pollution est d'origine animale (Geldreich et Kenner, 1969). Cependant, l'utilisation de ce ratio n'est pas recommandée à moins que la contamination soit réellement récente.

### **III.3.3. Dénombrement des spores de bactéries anaérobies sulfito-réductrices**

Les bactéries anaérobies strictes à Gram positif et sporulées réduisent les sulfites en sulfures d'hydrogène. Les spores résistent au stress environnemental en particulier aux radiations solaires. Parmi les spores anaérobies sulfito-réductrices, celles de *Clostridium perfringens*, espèce le plus souvent associée aux fèces d'animaux à sang chaud. Les spores de bactéries sulfito-réductrices sont considérés comme des indicateurs de l'élimination des kystes de protozoaires (Henze *et al.*, 2008).

Les échantillons d'eaux usées sont préalablement chauffés à 80°C pendant 10 min afin de détruire les formes végétatives et garder uniquement les formes sporulées. Les spores d'anaérobies sulfito-réducteurs sont dénombrées après ensemencement d'eaux usées ou de ses dilutions dans un milieu gélosé viande-foie. Le milieu inoculé est recouvert d'huile de paraffine pour créer les conditions d'anaérobiose nécessaires à la germination de ces spores. Il est ensuite incubé à 37°C pendant 48 heures (AFNOR, 2001).

### III.3.4. Abatement des bactéries fécales dans les trois STEP

L'abatement des trois types d'indicateurs de contamination a été étudié sur les trois STEPs (Ben Sergao, Drarga et L'Mzar). L'abatement considéré par cette étude est la différence des concentrations entre l'entrée et la sortie de la station d'épuration. Il est exprimé en pourcentage.

On le calcule selon la formule suivante :

$$\text{Abatement} = ((E - S) / E) \times 100$$

E : Concentration à l'entrée de la station.

S : Concentration à la sortie de la station

## IV. *Traitement statistique et analyse des données*

L'analyse en composantes principales normées (ACP) est un outil d'analyse de données qui permet d'expliquer la structure des corrélations ou des covariances en utilisant des combinaisons linéaires des données originelles. Son utilisation permet de réduire et d'interpréter les données sur un espace réduit (Clarke and Ainsworth, 1993).

Cette méthode est appliquée dans notre cas pour apprécier, les relations entre les différentes variables que nous avons mesurées, mais surtout pour accéder à leur structuration afin de pouvoir les regrouper par zone.

L'ACP est appliquée à l'ensemble des sept variables : coliformes fécaux, entérocoques, spores des bactéries sulfite-réductrices, pH, température, conductivité et salinité, en utilisant le logiciel *STATISTICA* 6.0, cette méthode cherche à définir, à partir des corrélations entre les variables, des facteurs indépendants les uns des autres, qui reprennent le maximum de variance.



## V. *Isolement et caractérisation des vibrions isolés*

L'utilisation de plus en plus importante d'antibiotiques, en médecine et dans d'autres domaines (vétérinaire), au cours des vingt dernières années, a fortement contribué, au sein de la population bactérienne, à la sélection de souches résistantes. Aussi, on observe des souches bactériennes qui résistent aux antibiotiques usuels en clinique. La contribution la plus efficace du biologiste à l'étude de cet important problème de la thérapeutique moderne est incontestablement de dépister les résistances acquises par les germes étudiés.

Notre étude répond à une demande sociétale forte pour des études approfondies sur les réservoirs environnementaux et sources d'agents pathogènes, et sur le comportement de ces agents au sein de ces milieux. Augmenter nos connaissances dans ce domaine pourrait permettre la mise en place d'actions préventives et une amélioration des pratiques ayant pour objectifs de réduire l'exposition des populations humaines aux agents pathogènes parfois multirésistants aux antibiotiques. Ces études permettent également de mieux comprendre les phénomènes d'émergence de variants génétiques (clones dominants ou épidémiques) chez les agents pathogènes bactériens. Le but de ce travail est de déterminer les différentes espèces de *Vibrio*, d'évaluer leur degré d'antibiorésistance afin de montrer l'efficacité du système d'infiltration-percolation dans l'élimination de ce microorganisme pathogène.

### V.1. *Recherche des Vibrio*

Le protocole d'isolement de *Vibrio* adopté est celui décrit par [Lesne et al., 1991](#). Les échantillons (eau brute, décantée et épurée) prélevés au niveau de chaque station d'épuration (L'Mzar, Ben Sergao et Drarga) ont été pré-enrichis (450 mL) dans un premier temps dans l'eau peptonée, alcaline hypersalée, à pH compris entre 8.5 et 9 (50 mL). Le pH et la teneur élevée de NaCl (3%) favorisent le développement des vibrions et inhibent la majorité des autres bactéries.

Après 6 à 18 heures d'incubation à 37°C, un voile apparaît à la surface des récipients. Sans agiter, on prélève 1 ml à la surface du tube car les vibrions ont tendance à se développer dans la partie supérieure du milieu, et on l'ajoute au tube de l'enrichissement effectué dans l'eau peptonée alcaline simple (20 mL) ; après incubation à 37°C pendant 6 à 18 heures, un inoculum de chaque type d'eau (enrichi), estensemencé à la surface d'une gélose TCBS

(Thiosulfate, Citrate de sodium, Bile de bœuf, Saccharose) et l'ensemble est incubé à 37°C pendant 24 heures. Si des colonies caractéristiques des vibrions se développent (de couleur jaune ou verte).

Les colonies présumées sur le milieu TCBS, sont purifiées sur gélose TSA (Tryptic Soja Agar), puis subissent le test oxydase qui permet d'éliminer les entérobactéries qui ne la possèdent pas (Lipp et al. 2002).

La conservation des souches isolées se fait dans la gélose TSA pour une identification ultérieure.

## V.2. Identification phénotypique et sérotypage des souches de *Vibrio*

### V.2.1. Identification des *Vibrio*

Les méthodes classiques d'identification bactérienne ne sont pas toujours sensibles pour l'étude des souches de *Vibrio* à cause de l'existence de souches de formes sphériques et non cultivables retrouvées dans l'environnement aquatique. Au cours de notre étude, nous avons identifié les souches présumées de *Vibrio*, isolées des eaux usées des trois stations d'épuration par le système VITEK 2 (bioMérieux, Marcy l'Etoile, France), un système automatique d'identification microbiologique et d'antibiogramme.

Le système Vitek 2<sup>®</sup> comprend :

- Un Densichek<sup>®</sup> : densitomètre permettant l'ajustement de l'inoculum,
- Des cassettes pouvant contenir jusqu'à 15 cartes (deux types de cartes sont connues Les cartes d'identification des bactéries à Gram positif (GP) et des bactéries à Gram négatifs (GN). Chacune contient 47 tests biochimiques) et les tubes contenant la suspension bactérienne à inoculer. L'inoculation de la carte est réalisée en la plongeant dans le tube contenant la suspension bactérienne. Ces cassettes sont destinées à être incorporées dans l'automate (**annexe 5**).
- Un automate réalisant les étapes de remplissage, de scellage, d'incubation, de lecture et d'interprétation des cartes.
- Un ordinateur et des logiciels spécialisés gérant et analysant les données générées par l'automate en identifiant l'organisme testé au niveau du genre et/ou de l'espèce

- Une Station Compacte Satellite

## V.2.2. Sérotypage

### V.2.2.1. Principe

La recherche est basée sur la mise en évidence d'une réaction spécifique entre un anticorps présent dans un sérum test (base des vaccins...) et un antigène porté par le microorganisme étudié (de surface, de toxine, de virulence ...). Cette réaction est visualisée par une agglutination qui est le résultat macroscopique de la réaction antigène-anticorps (Ag/Ac).

### V.2.2.2. Mode opératoire

La recherche de *Vibrio cholerae* O1 est effectuée par la technique d'agglutination sur lame avec un antisérum anti-O1 (BIO-RAD, Marnes-la-Coquette-France). Sur une lame propre, on dépose une goutte de l'antisérum anti-O1. A l'aide d'une pipette pasteur, on prélève un peu de la souche bactérienne et on la met en suspension dans la goutte (c'est la bactérie elle-même qui sert de révélateur). On étale ensuite la goutte et on effectue un mouvement de balancement de la lame. Si la souche possède l'antigène correspondant à l'antisérum testé, il se forme des agglutinats visibles à l'œil nu (**annexe 8**).

## V.3. Recherche de la toxine cholérique

La détection de la toxine cholérique peut se faire par plusieurs méthodes différentes: des techniques immunochimiques, des techniques biologiques, des méthodes biochimiques et la détection des gènes codant les entérotoxines par des méthodes de biologie moléculaire. Les techniques les plus utilisées sont des techniques ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay) et la technique RPLA utilisée lors de cette étude.

La technique utilisée dans le cadre de notre étude est la technique d'agglutination passive réverse de particules de latex (RPLA) qui peut être utilisée pour la détection des entérotoxines dans des aliments ou dans des milieux de culture.

### V.3.1. Principe du RPLA

L'anticorps est attaché à des particules en latex et il réagit avec l'antigène soluble (l'entérotoxine). L'agglutination se produit en présence de l'entérotoxine et une couche diffuse se forme. Si l'antigène n'est pas présent les particules forment un «bouton» compact (Pimbley et Patel, 1998).

La détection des entérotoxines chez les souches de *Vibrio* a été réalisée, avec le kit OXOID, selon les instructions du fabricant.

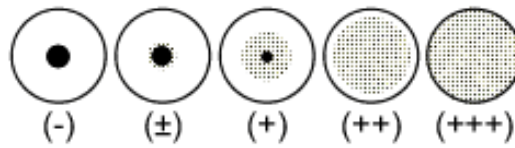
### V.3.2. Mode opératoire

Les souches identifiées comme *Vibrio cholerae* sont cultivées dans 10 mL du milieu de CAYE avec 100 µL de la solution de glucose à 25% puis traitées avec 1 mL de la polymyxine B diluée (2200UI) (SIGMA). Incuber sous agitation à 37°C pendant 24h. La culture est centrifugée à 10 000 g pendant 20 mn. Le surnageant obtenu est filtré sur une membrane 0,45 µm.

Le filtrat de culture obtenu est traité par les réactifs du coffret (le 1<sup>er</sup> réactif (réactif latex) et le 2<sup>ème</sup> réactif (réactif contrôle)) de la recherche de l'entérotoxine (OXOID toxin detection kits VET-RPLA) selon le mode opératoire suivant :

Chaque échantillon nécessite l'utilisation de 2 rangées de 4 puits (**tableau IV**). 25 µl de diluant est réparti dans les puits à l'exception du premier puits de chaque rangée, puis on ajoute 25 µl d'échantillon aux 2 premiers puits des 2 rangées. Avec une pipette, reprendre 25 µl dans le deuxième puits de chaque rangée et effectuer des dilutions successives dans chaque rangée jusqu'au quatrième puits. On ajoute 25 µl de réactif latex à chaque puits de la première rangée. Puis 25 µl de contrôle latex à chaque puits de la deuxième rangée. On mélange le contenu de chaque puits par rotation sur un agitateur ou à la main. La plaque est recouverte par un couvercle pour éviter l'évaporation. L'incubation se fait à température ambiante et à l'abri de toute vibration pendant 20 à 24 heures. La lecture des résultats de la plaque se fait à l'œil nu.

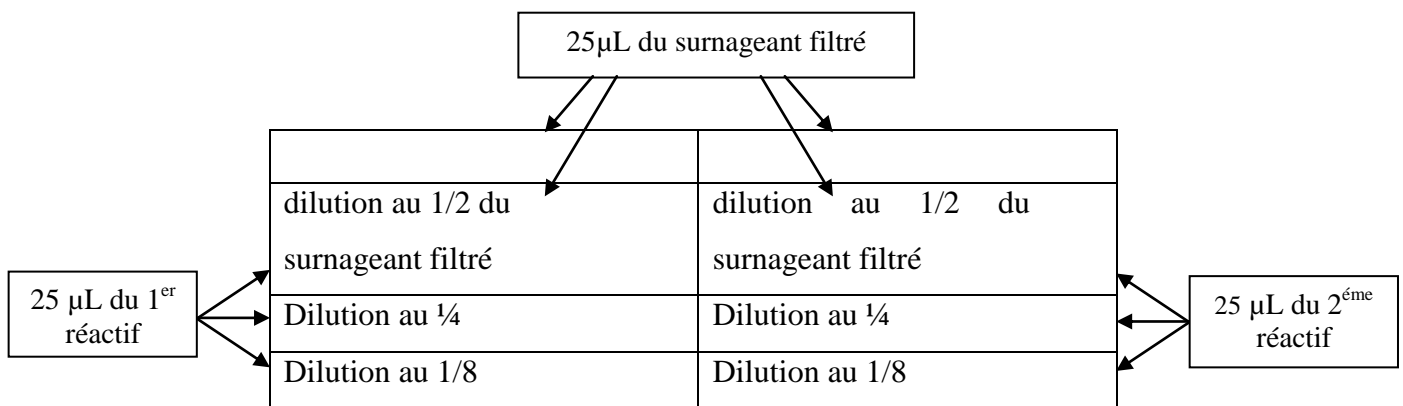
Le degré d'agglutination est déterminé par comparaison avec les figures ci-dessous.



Les résultats classés de + à +++ sont considérés comme positifs.

Aucune agglutination ne doit apparaître dans la rangée de puits contenant le contrôle latex.

**Tableau IV** : Représentation schématique de la technique d'agglutination RPLA pour la détection de la toxine cholérique.



#### V.4. Détermination des profils de résistance aux antibiotiques

L'étude de la sensibilité d'une bactérie à différents antibiotiques consiste en la réalisation d'antibiogrammes et surtout la détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI) qui a toute son importance en médecine.

L'antibiogramme en milieu solide (par opposition à l'antibiogramme en milieu liquide) est une méthode basée sur le principe de la diffusion de l'antibiotique en milieu gélosé à partir d'un disque imprégné avec une concentration définie de cet antibiotique. Il a été principalement développé en bactériologie médicale et permet de déterminer à quels antibiotiques une souche bactérienne isolée chez un patient est sensible. Cette méthode peut également être utilisée pour établir un profil de résistance à divers antibiotiques des souches isolées de l'environnement.

Tout au long de ce travail, l'antibiogramme a été utilisé pour déterminer *in vitro* le profil de résistance à 20 antibiotiques, communément utilisés en médecine humaine pour le traitement des maladies infectieuses, des souches de *Vibrio* isolées des eaux usées des trois stations d'épuration de la Wilaya d'Agadir. Les 20 antibiotiques utilisés, ainsi que la famille et le groupe d'appartenance sont résumés dans le **tableau V**. Ces 20 antibiotiques ont également été choisis de manière à représenter les trois familles chimiques importantes, ayant différentes cibles et mécanismes d'action, à savoir, les bêta-lactamines, les fluoroquinolones et les aminosides.

##### V.4.1. Antibiogramme par la technique de diffusion sur gélose

La technique de diffusion sur gélose ou méthode des disques est préconisée par [Bauer et al. \(1966\)](#). A partir d'une culture pure (18-24 heures) on prépare une suspension inoculum en eau physiologique équivalente à 0,5 sur l'échelle de MacFarland ( $\sim 10^8$  UFC/mL) puis une dilution au 1/100<sup>ème</sup> ( $\sim 10^6$  UFC/mL). A l'aide d'une pipette Pasteur on ensemence par inondation la surface du milieu Mueller-Hinton (MH) avec 3 à 5mL de la suspension bactérienne. Avant de déposer les disques d'antibiotiques, les boîtes sont séchées 15 minutes à température ambiante.

Les 20 disques d'antibiotiques imprégnés chacun avec une concentration définie d'antibiotiques (**tableau V**) sont déposés à l'aide d'un distributeur

**Tableau V:** Liste des antibiotiques utilisés dans l'étude de l'antibiorésistance des souches de *Vibrio*.

Antibiotique	Code	Famille	Charge du disque	Diamètre critique mm
Amikacine	AN	Aminosides	30µg	17-15
Isépamicine	ISP	Aminosides	30µg	17-15
Tobramycine	TM	Aminosides	10µg	16-14
Gentamicine	GM	Aminosides	15µg (10UI)	16-14
Amoxicilline	AMX	Bêta-lactamines	25µg	21-14
Imipénème	IPM	Bêta-lactamines	10µg	22-17
Aztréonam	ATM	Bêta-lactamines	30µg	23-17
Tazocilline (Pipéracilline+Tazobactam)	TZP	Bêta-lactamines	75/10 µg	21-14
Claventin (Ticarcilline+acide clavulanique)	TCC	Bêta-lactamines	75µg + 10µg	22-18
Amoxicilline + Ac clavulanique	AMC	Bêta-lactamines	20µg + 10µg	21-14
Pipéracilline	PIP	Bêta-lactamines	75µg	20-12
Céfotaxime	CTX	Bêta-lactamines	30µg	21-15
Céfotétan	CTT	Bêta-lactamines	30µg	23-17
Céfépime	FEP	Bêta-lactamines	30µg	21-15
Ceftazidime	CAZ	Bêta-lactamines	30µg	21-15
Céfalotine	CF	Bêta-lactamines	30µg	18-12
Ofloxacine	OFX	Fluoroquinolones	5µg	22-16
Ciprofloxacine	CIP	Fluoroquinolones	5µg	22-19
Fosfomycine	FOS	Fosfomycine	50µg	14-14
Sulfaméthoxazole Triméthoprime	SXT	Sulfamides 2-4 diamino- pyrimidines	1,25µg + 23,75 µg	16-10

automatique sur la surface de la culture. Les cultures (boîte retournée) sont incubées à 37°C pour une durée de 18 à 24 heures.

Les diamètres des zones d'inhibition ont été mesurés, les valeurs obtenues en millimètres sont comparées aux diamètres figurant dans les tables de recommandations mises à jour chaque année par le Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie (CASFM). Les valeurs des diamètres permettent de déterminer si une souche donnée est sensible, intermédiaire ou résistante à un antibiotique donné.

D'une manière générale, plus le diamètre de la zone d'inhibition de la croissance sera faible plus la souche sera résistante à l'antibiotique testé. Au contraire, plus le diamètre de la zone d'inhibition de croissance sera grand, plus la souche sera sensible à l'antibiotique. Cette méthode est la plus simple, la plus rapide et la plus utilisée. Le coût est faible. Mais elle est critiquée par certains auteurs en raison du manque de corrélation dans certains cas entre les diamètres d'inhibition et les concentrations minimales inhibitrices (CMI) déterminées par les méthodes de référence.

#### **V.4.2. Antibiogramme par le système Vitek 2<sup>®</sup>**

La détermination de la sensibilité des bactéries aux antibiotiques a été la première des séquences de l'analyse microbiologique qui a pleinement bénéficié de l'automatisation. L'automate Vitek 2<sup>®</sup> a été utilisé conformément aux recommandations de bioMérieux. Au cours de cette étude nous avons utilisé les cartes d'antibiogramme (AST-N051 et AST-N017).

Une suspension bactérienne d'une densité optique comprise entre 0,55 et 0,62 dans une solution NaCl 0,45%, pH 5-7,2 (bioMérieux, Marcy l'Etoile, France) est préparée dans un premier tube en même temps qu'un deuxième tube vide servant à la dilution est placé immédiatement après sur la cassette. L'introduction dans la carte VITEK 2<sup>®</sup> s'effectuera dans l'automate. Cette carte de 64 micro-puits contient des antibiotiques de plusieurs familles à différentes concentrations permettant de déterminer les CMI. L'interprétation des résultats d'un antibiogramme s'appuie sur une comparaison avec les phénotypes de résistance connus et identifiés en faisant appel à la banque de données du système VITEK 2.



## **VI. Analyse des profils génomiques et protéomiques des vibrions isolés**

Généralement, pour différencier des espèces bactériennes de même nom, on utilise des méthodes de sérotypage ou biotypage. Actuellement, l'application des méthodes de biologie moléculaire telles que l'hybridation de l'ADN-ADN, séquençage de l'ARN 16S et l'électrophorèse au champ pulsé, dans la caractérisation des bactéries a ouvert de nouvelles perspectives pour l'identification bactérienne à tous les niveaux taxonomiques, y compris le niveau infraspécifique.

Les différentes souches de *Vibrio*, isolées des échantillons d'eaux usées des trois stations d'épuration de la ville d'Agadir, ont été identifiées, analysées pour leur capacité à produire la toxine cholérique et caractérisées sur le plan génomique par la technique de l'électrophorèse en champ pulsé et sur le plan protéomique par la technique de la spectrométrie de masse MALDI-TOF, de façon à mettre en évidence la diversité phénotypique et génétique de la collection.

### **VI.1. Typage moléculaire par électrophorèse en champ pulsé**

#### **VI.1.1. Principe**

La caractérisation génétique des espèces de vibrions, est faite par l'électrophorèse en champ pulsé (ECP). L'ECP est la méthode de référence pour le typage des souches bactériennes d'origine clinique et environnementale. Utilisée pour séparer des fragments de taille supérieure à 20 kb, cette méthode est basée sur l'analyse de l'ADN bactérien et donne une empreinte génétique, appelée pulsotype, caractéristique de chaque souche.

L'ADN bactérien est soumis à l'action d'une enzyme (endonucléase de restriction) pour produire une série de fragments d'ADN dont la taille et le nombre sont caractéristiques de l'isolat étudié. Les molécules d'ADN migrent dans un gel d'agarose selon des directions imposées par l'application alternée de deux champs électriques (**figure 8**). Les molécules d'ADN sont séparées en fonction de leur taille. Les fragments ainsi séparés, sont révélés par coloration du gel. La photographie du gel est ensuite utilisée pour faire des comparaisons entre les souches et leur affecter un pulsotype.

Lors de l'électrophorèse en champ pulsé, les profils sur les gels comportent généralement plusieurs bandes. Chaque profil obtenu se caractérise par le nombre de bandes et par la

distance qui les sépare. Pour évaluer la similitude entre plusieurs profils il faut combiner et comparer ces deux paramètres. Cela se fait par construction de dendrogrammes UPGMA (*unweighted pair group method with arithmetic averaging*) avec le logiciel Fingerprinting II (Biorad), qui évalue les différences de distances moyennes entre les bandes prises deux à deux sur le gel par la méthode de calcul du coefficient de Dice qui correspond au rapport du nombre de fragments communs multiplié par deux sur le nombre total de fragments observés dans les deux profils.

### VI.1.2. Mode opératoire

L'électrophorèse en champ pulsé a été réalisée pour les 58 souches de vibrions isolées lors de cette étude en utilisant le kit GenePath<sup>®</sup> Group 2 Reagent Kit (Biorad Diagnostic, Ivry-sur-Seine, France) selon les instructions du fabricant. Après 18 heures de culture à 37 °C en bouillon cœur-cervelle, 500 µl de la suspension bactérienne obtenue ont été centrifugés pendant une minute à 11000 g. Le culot bactérien a été remis en suspension dans la solution tampon fournie avec le kit puis mélangé à 100 µl d'agarose en surfusion (50 °C). Cette étape permet la réalisation d'un bloc (plug) contenant les bactéries immobilisées. Dans le bloc, la paroi bactérienne est digérée par le lysozyme (1 h à 37 °C) et l'ADN bactérien est ensuite libéré par la protéinase K (18 h à 50 °C). Enfin, on utilise l'enzyme de restriction *Not I* fournie avec le kit GenePath<sup>®</sup> qui coupe l'ADN au niveau des sites de restriction spécifiques ; l'incubation des plugs se fait à 37 °C pendant 18 h. Chaque plug est ensuite positionné dans les puits d'un gel d'agarose de migration. La migration électrophorétique en champ pulsé (18 h avec un rampe de pulse de 1s-15s, 6.0 V/cm à 15°C) est réalisée en utilisant le programme 13 préenregistré dans le module de commande de l'appareil BioRad. La révélation des bandes d'ADN se fait après une coloration par le bromure d'éthidium et les profils de restriction sont visualisés sur un transilluminateur UV. Une photographie de chaque gel est réalisée.

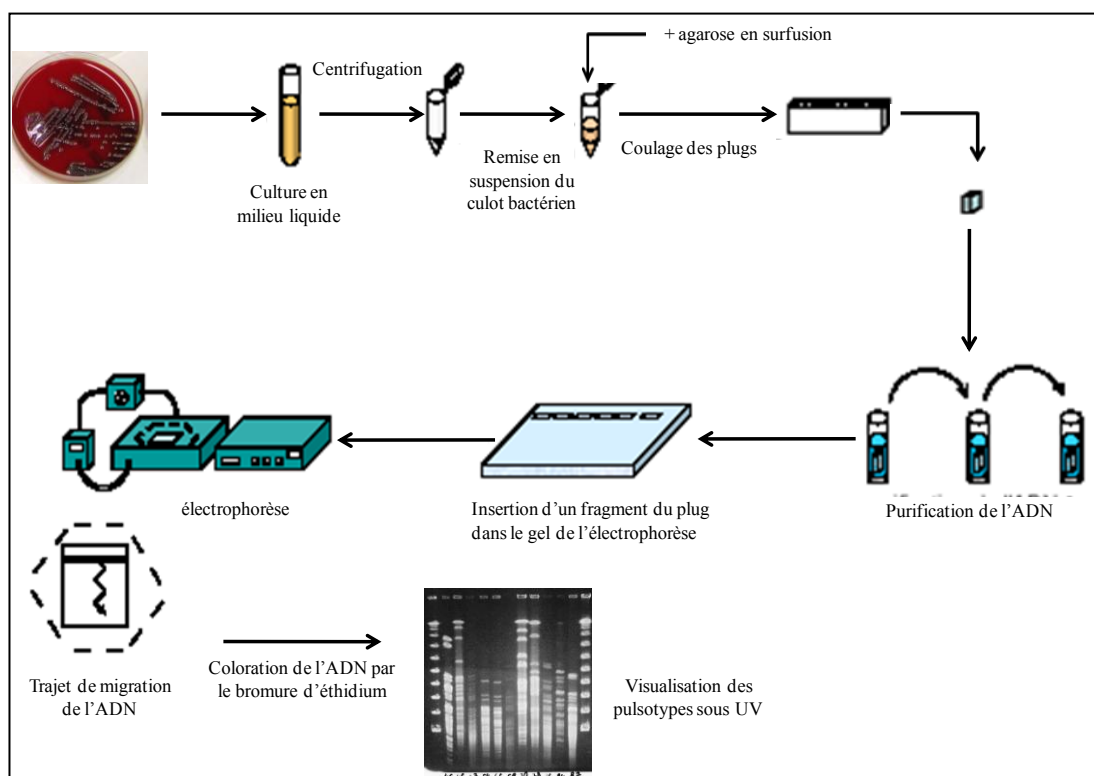
L'analyse des résultats consiste en une analyse à l'aide du logiciel Fingerprinting II (BioRad), des profils électrophorétiques obtenus par rapport à un témoin Lambda Ladder. Les dendrogrammes résultant de cette analyse sont établis à partir des pulsotypes (macrorestriction de l'ADN total) en utilisant l'algorithme de hiérarchisation UPGMA (*unweighted pair group using arithmetic averages*) on utilise le coefficient de Dice pour mesurer quantitativement la similarité entre deux profils d'empreintes moléculaires électrophorétiques. Ce coefficient se calcule en multipliant par deux le nombre de fragments

communs, divisé par le nombre total de fragments dans les deux profils. Les génotypes majeurs sont définis comme différents les uns des autres par plus de trois fragments (pourcentage de similitude d'ADN inférieur à 85%) [Tenover et al. \(1995\)](#). Lambda Ladder est utilisé pour équilibrer les gels et pour déterminer les poids moléculaires de chaque bande.

Certaines souches de *Vibrio* qui n'ont pas donné de profil électrophorétique par le présent protocole ont été envoyées à l'Institut Pasteur pour le typage par électrophorèse en champ pulsé, en utilisant les conditions de migration et le marqueur préconisé par la méthode standardisée PulseNet (protocole PulseNet) décrit par [Cooper et al., 2006](#) ; [Parsons et al., 2007](#) et [Man et al., 2008](#).

Les principales différences à noter entre le protocole utilisé dans le cadre de notre étude et le protocole PulseNet sont les suivantes :

- Au cours de la digestion enzymatique : pour le protocole PulseNet l'incubation des plugs se fait à 37°C pendant 4h,
- Pour les paramètres de migration : concernant le protocole PulseNet la migration se fait suivant 2 programmes : le premier programme dure 13h (avec un ramp de pulse de 2s-10s), le second programme dure 6h (avec un ramp de pulse de 20s-25s), 6.0 V/cm à 14°C.



**Figure 8** : Principe de l'électrophorèse en champ pulsé.

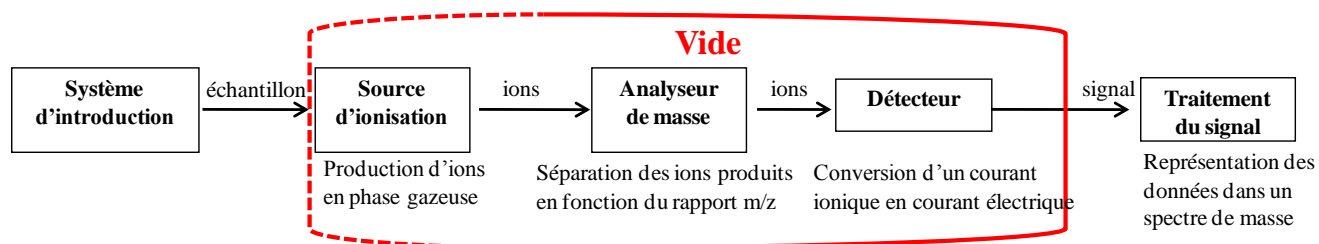
## VI.2. Spectrométrie de masse MALDI-TOF

### VI.2.1. Principe

Dès le début des années 90, la spectrométrie de masse a commencé à jouer un rôle de plus en plus important en biologie. Elle compte actuellement parmi les méthodologies les plus prometteuses permettant des progrès majeurs dans la compréhension de nombreux processus biologiques. Deux méthodes d'ionisation dites « douces » ont été développées: l'ionisation par ESI (électrospray) (Yamashita *et al.*, 1984a ; Yamashita *et al.*, 1984b; Fenn *et al.*, 1989) et l'ionisation par MALDI (ionisation/désorption laser assistée par matrice) (Karas *et al.*, 1987 ; Karas *et al.*, 1989 ; Tanaka *et al.*, 1988). J. B. Fenn et K. Tanaka ont été récompensés en 2002 par le prix Nobel de chimie pour leurs travaux sur ces nouvelles méthodes d'ionisation. La spectrométrie de masse MALDI-TOF (Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionisation - Time Of Flight) permet en pratique la mesure de masse de biopolymères de 1 à 500 kDa. Elle est adaptée à l'analyse de biomolécules telles que les peptides, les protéines, les oligosaccharides, les polymères synthétiques.

L'approche SM-MALDI-TOF produit des signatures uniques de masse/nombre de charge ( $m/z$ ) pour les microorganismes analysés, dus aux protéines cellulaires et subcellulaires les mieux conservées et offrent une typicité de l'espèce à savoir les protéines ribosomales et certaines protéines membranaires.

Les molécules à analyser sont incorporées à une matrice absorbant fortement à la longueur d'onde du laser. Les ions sont générés par excitation de la matrice par le laser. Cette source est généralement couplée à un analyseur à temps de vol TOF (Time of Flight) qui se base sur le principe de séparation des ions selon leur rapport masse/nombre de charge ( $m/z$ ) en fonction de leur temps de vol. Enfin le détecteur collecte ces ions, quantifie leurs intensités et amplifie le signal. Ces deux étapes se déroulent dans un vide pour éviter toute collision entre les ions et les molécules de gaz. Après le détecteur, un logiciel informatique permet le traitement des données et génère un spectre de masse qui précise la variation du courant ionique observé en fonction du rapport  $m/z$  et permet de déterminer la masse moléculaire de l'espèce analysée. Les différents éléments constituant un spectromètre de masse sont schématisés sur la **figure 9**.



**Figure 9:** Schéma des différents constituants d'un spectromètre de masse (Tholozan et Lorquin, 2009)

## VI.2.2. Mode opératoire

La spectrométrie de masse MALDI-TOF permet l'identification des bactéries par analyse de leurs protéines totales (Claydon *et al.*, 1996).

L'identification est réalisée selon deux modes opératoires :

### VI.2.2.1. Dépôt direct de la colonie bactérienne (fin frottis ou smear)

Pour cette technique, il est recommandé d'étaler un film bactérien très fin sur la plaque cible du MALDI à l'aide d'un cône de micropipette. Il faut donc veiller à bien plaquer les bactéries sans déposer une trop grande quantité de matériel biologique car cela risque de minimiser l'ionisation, et l'acquisition de bons spectres de masse. La limite de détection, par exemple pour *Esherichia coli* vivante est de  $10^5$  cellules par point de dépôt. Une fois secs, ces dépôts sont recouverts d'une matrice.

### VI.2.2.2. Extraction des protéines bactériennes

La solution extemporanée de matrice se compose de 200 à 500  $\mu\text{L}$  de 50% (v/v) d'acétonitrile, 2,5% (p/v) d'acide trifluoroacétique (TFA) dans laquelle quelques cristaux de l'acide  $\alpha$ -cyano-4-hydroxycinnamique ( $\alpha$ -HCCA) vont saturer la solution. Après homogénéisation de la solution pendant quelques minutes, elle est soniquée pendant 2 min à température ambiante jusqu'à l'obtention d'une solution saturée. La solution est centrifugée pendant 1min à 6000 g. Un  $\mu\text{L}$  de cette solution est déposée, trois fois (répétition) sur la plaque cible et séché à l'air libre. Le dépôt de l'échantillon est finalement recouvert avec 1 $\mu\text{L}$

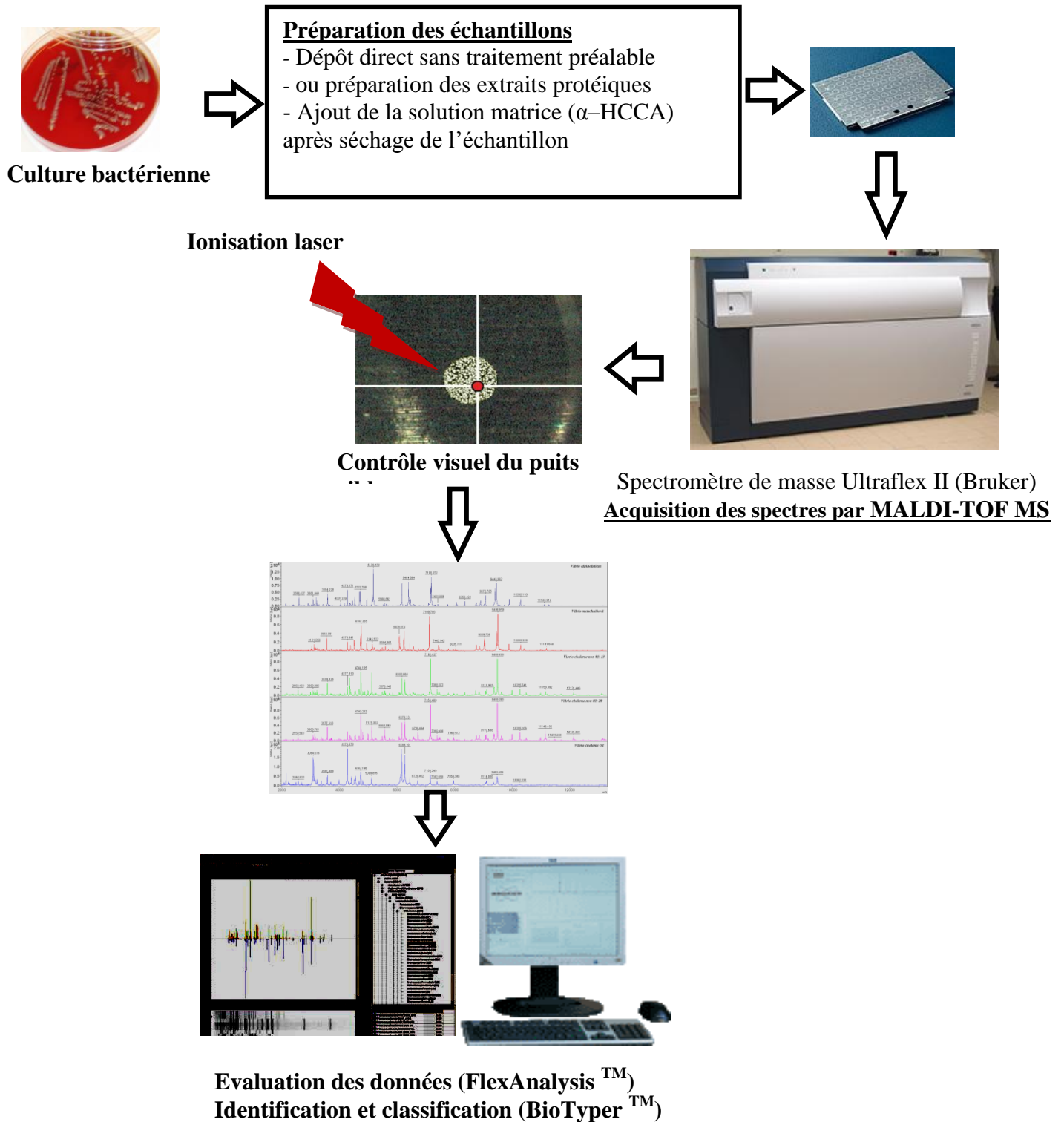
de la solution matrice et à nouveau séché. Le dépôt cristallin contenant la matrice organique et l'échantillon à analyser est irradié avec le faisceau laser pulsé de longueur d'onde (laser d'azote,  $\lambda=337$  nm). Le laser n'est utilisé qu'entre 40-60% de sa puissance maximale (**figure 10**).

Les spectres de masse sont obtenus par le spectromètre de masse Ultraflex II MALDI-TOF (Bruker Daltonics GmbH, Bremen, Allemagne), en mode positif linéaire à fréquence maximale (20 Hz soit 20 tirs/seconde par point de dépôt) avec une résolution monoisotopique. La gamme des masses/charges ( $m/z$ ) mesurés va de 2000 à 20000, soit de 2 à 20 kDa. L'acquisition automatique des spectres est réalisée en utilisant le logiciel 'autoExecute'<sup>TM</sup> Bruker avec un contrôle de Brouillage de l'intensité du laser. Trois spectres individuels ont été acquis pour chaque souche de *Vibrio* ainsi pour les 58 souches on a 174 spectres individuels.

Le transfert direct des données vers le logiciel d'identification BioTyper<sup>TM</sup> 2 a été effectué. Le logiciel BioTyper<sup>TM</sup> 2 est basé sur MATLAB 7.1, et permet l'analyse des pics basée sur la génération des principaux composants et sur leur indice de corrélation. L'identification d'un spectre inconnu est réalisée à l'aide d'un algorithme de reconnaissance utilisant les positions des pics, leurs intensités autant que leurs fréquences. Les microorganismes inconnus sont identifiés en comparant leurs pics individuels à la banque de données du logiciel.

L'identification débute par l'acquisition des spectres par BioTyper Automation Control. Chaque identification dure 30 secondes (soit 10ms pour la coïncidence d'un pic avec un autre pic présent dans les spectres de la banque de données et selon la vitesse du processeur du PC utilisé. Les spectres de la banque de données sont des spectres moyens après plusieurs analyses, ils établissent une pondération sur la présence de certains peptides pouvant être considérés comme caractéristique de l'espèce (Claydon *et al.*, 1996). L'approche PCA (Principal Component Analysis) a été utilisée pour la classification des bactéries en dendrogrammes et en 3 dimensions, cette approche ne retient que 70% des pics majoritaires avec un bruit de fond égal à 1%.

Afin de vérifier la solidité de la banque de données, une base de données a été réalisée pour l'ensemble des 58 souches de *Vibrio*, constituée de 4 spectres moyen ou spectres consensus représentatifs de chaque espèce (*V. cholerae*, *V. alginolyticus*, *V. fluvialis* et *V. metschnikovii*), ces spectres consensus résultent de la moyenne des 3 spectres individuels acquis par souche, grâce au logiciel Biotyper (Bruker).



**Figure 10:** Schéma des différentes étapes pour l'identification bactérienne par MALDI-TOF/MS associé à un logiciel de classification (BioTyper™, Bruker Daltonics) dans un laboratoire d'analyses (Moussaoui *et al.*, 2009).

# **TROISIÈME PARTIE**

## **RÉSULTATS ET DISCUSSION**



## CHAPITRE I

### *Dynamique de certains indicateurs de pollution au cours du traitement des eaux usées par infiltration-percolation*

## ***I. Etude physico-chimiques et bactériologiques des eaux usées brutes et traitées des stations d'épuration des eaux usées de la Wilaya d'Agadir***

### **I.1. Paramètres électrochimiques**

Les résultats des mesures des paramètres électrochimiques : température, pH, conductivité et salinité effectuées sur les échantillons d'eaux usées prélevés à différents points des trois stations d'épuration (eaux usées : brute, décantée et épurées) sont présentés dans les **figures 11 et 12**.

#### **I.1.1. Température**

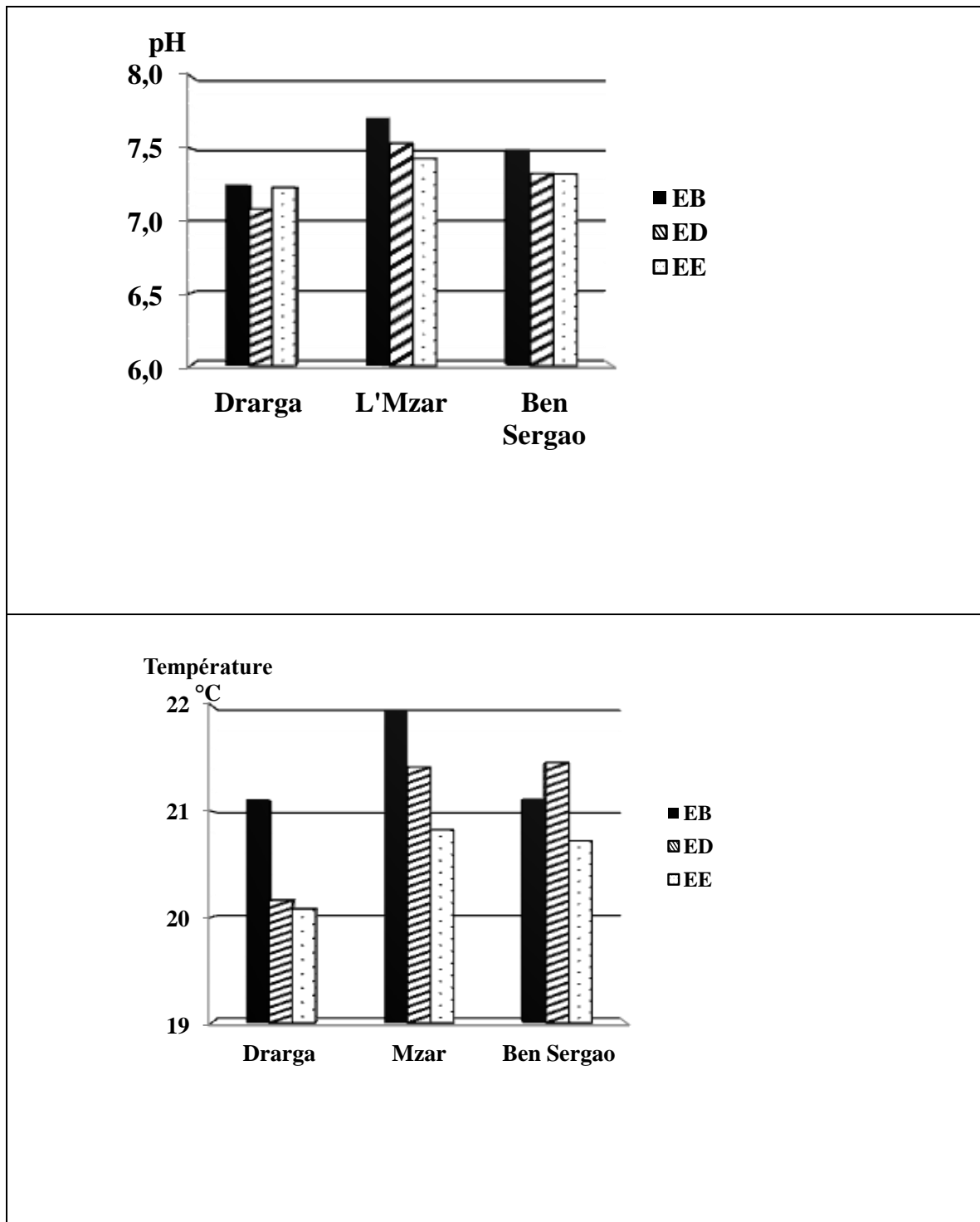
Les valeurs de la température des eaux usées montrent que la valeur la plus basse est de 16°C enregistrée au mois de janvier 2007 au niveau de l'EE des trois stations d'épuration L'Mzar, Ben Sergao et Drarga et que les températures les plus élevées sont de 26,4 ; 25 et de 24,8°C enregistrées respectivement au niveau de EBD, EBM et EDB.

Durant la période de l'étude les valeurs des températures enregistrées à la sortie (EE) des trois stations d'épuration sont toujours inférieures à celles enregistrées pour l'eau usée brute et l'eau usée décantée (**figure 11**).

Il est important de noter que les valeurs de la température des eaux usées enregistrées au niveau des trois STEPs sont inférieures à 30°C considérée comme valeur limite de rejet direct dans le milieu récepteur. De même, ces valeurs sont inférieures à 35°C, considérée comme valeur limite indicative pour les eaux destinées à l'irrigation ([Ministère de l'Environnement du Maroc, 2002](#)).

#### **I.1.2. pH**

Les valeurs de pH enregistrées au niveau des trois stations d'épuration sont comprises entre 6,66 et 8,60 unités de pH. Ces valeurs limites sont enregistrées au niveau des eaux usées brutes de la station de L'Mzar.



**Figure 11 :** Valeurs moyennes des paramètres physico-chimiques (pH, température) caractérisant les eaux usées brutes, décantées et épurées des stations d'épuration des eaux usées de la Wilaya d'Agadir.

Le pH de l'effluent brut des trois stations est généralement supérieur à 7,6. Alors que la valeur moyenne du pH de l'eau usée lagunée (ED), varie de 7,08 pour la station de Drarga à 7,32 pour Ben Sergao et 7,53 pour la station de L'Mzar, Ces valeurs montrent une faible variation durant toute la période de l'étude.

L'eau épurée présente des valeurs moyennes de pH qui varient entre 7,32 (pour la station de Ben Sergao) et 7,43 (L'Mzar). La variation du pH à la sortie du lit de sable (EE) est étroitement corrélée ( $r=0,380$  à  $P < 0,05$ ) à celle de l'eau décantée, les valeurs moyennes du pH dans les différents types d'eaux usées sont présentées dans les **tableaux VI, VII et VIII**.

Si le pH est inférieur à 5 ou supérieur à 8,5, la croissance des microorganismes est directement affectée. En outre, le pH est un élément important pour l'interprétation de la corrosion dans les canalisations des installations de l'épuration. Les valeurs de pH mesurées varient peu et restent autour de 7,5 en moyenne.

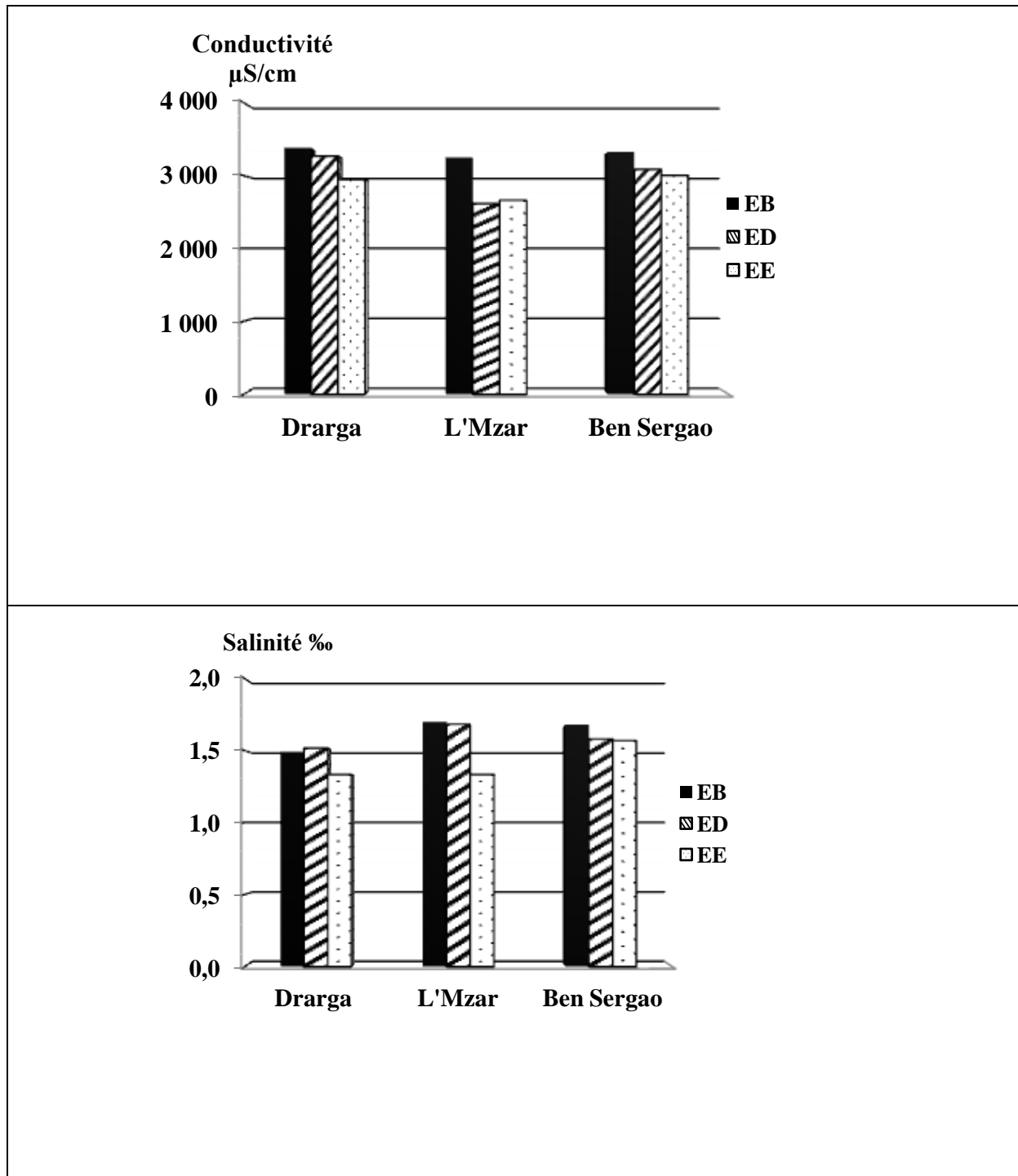
### **I.1.3. Conductivité et Salinité**

Concernant la conductivité électrique entre les différents types d'eaux usées des trois stations, aucune différence appréciable n'est enregistrée. Elle reste toujours élevée dans les eaux usées épurées par rapport aux eaux usées brutes, les valeurs mensuelles de la conductivité sont comprises entre 449,7 et 1038,3  $\mu\text{S}/\text{cm}$ .

Les valeurs moyennes de la conductivité mettent en évidence une forte minéralisation des rejets. La même évolution est observée pour les valeurs de la salinité.

La conductivité électrique est probablement l'un des plus simples et des plus importants paramètres pour le contrôle de la qualité des eaux usées. Elle traduit le degré de minéralisation globale, et renseigne sur le taux de salinité. Les résultats obtenus mettent en évidence une variation importante de la minéralisation exprimée en conductivité moyenne. Ces résultats peuvent être expliqués par le rejet d'eaux usées fortement minéralisées directement dans le réseau d'assainissement.

La comparaison des valeurs de la conductivité électrique au niveau des eaux usées analysées avec les normes de qualité des eaux destinées à l'irrigation permet de déduire que ces eaux usées ne sont pas acceptables pour l'irrigation des cultures (**annexe 6**). De même, ces valeurs moyennes sont inférieures à 2700 $\mu\text{S}/\text{cm}$  pour la STEP L'Mzar, considérée comme valeur limite de rejet direct dans le milieu récepteur ([Ministère de l'Environnement du Maroc, 2002](#)).



**Figure 12 :** Valeurs moyennes des paramètres physico-chimiques (conductivité, salinité) caractérisant les eaux usées brutes, décantées et épurées des 3 STEPs de la Wilaya d'Agadir.

## I.2. Paramètres bactériologiques

### I.2.1. Présence des bactéries fécales dans les eaux usées des trois stations d'épuration :

La **figure 13** illustre le taux moyen en bactéries fécales (CF, SF, et SSR) à l'entrée (EB), à la sortie du bassin de décantation (ED) et à la sortie (EE) du système d'épuration pour les trois stations : L'Mzar (A), Drarga (B) et Ben Sergao (C).

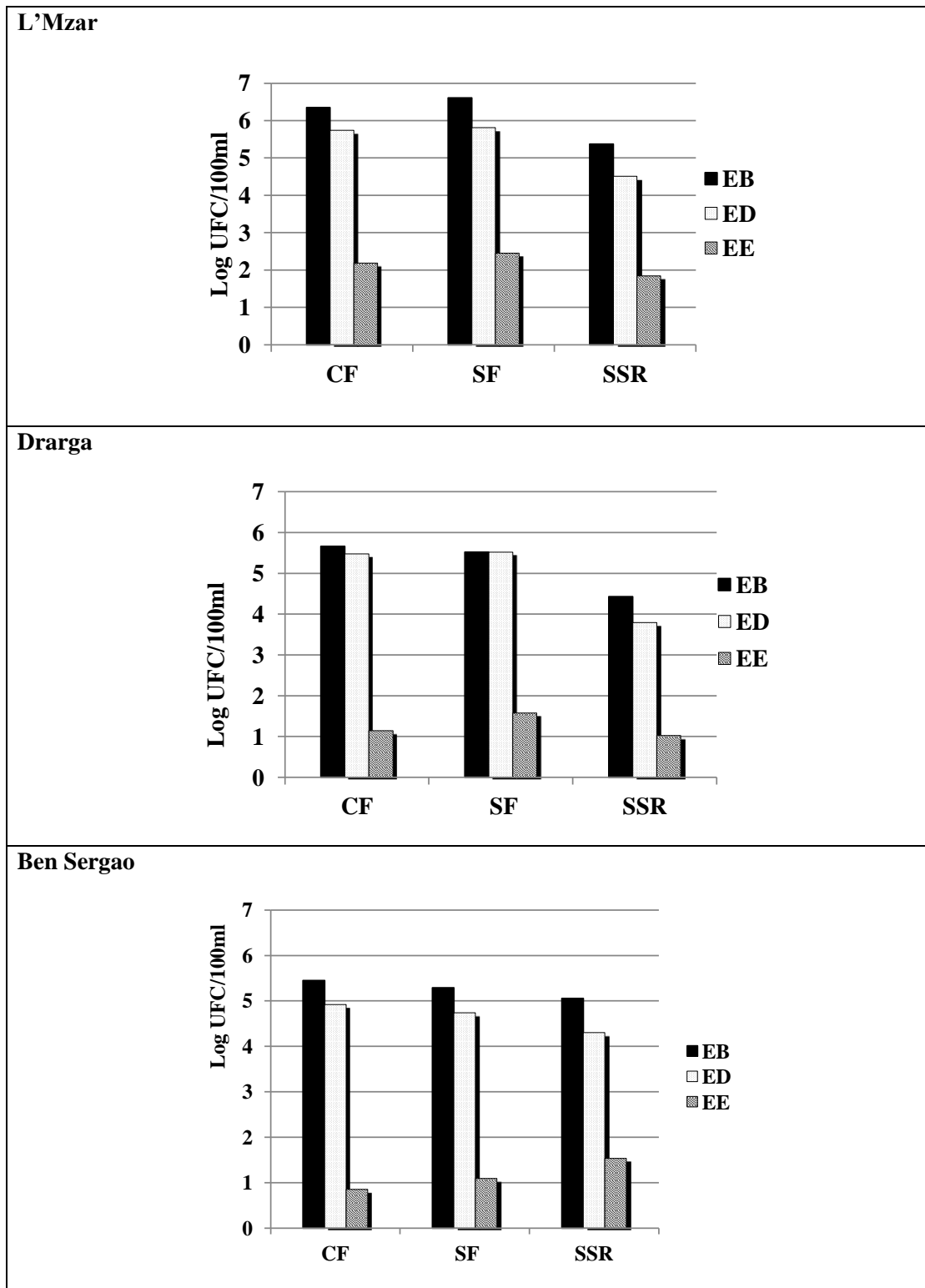
La présence des CF dans les eaux usées brutes des trois stations ne présente pas de fluctuations significatives durant toute la période de notre étude (janvier-juin 2007). Les concentrations en coliformes fécaux des EB sont comprises entre  $3,5.10^4$  et  $9,8.10^6$  UFC/100 mL, la moyenne pour les trois stations (L'Mzar, Drarga et Ben Sergao) étant respectivement de  $2,24.10^6$  ;  $4,6.10^5$  et  $2,8.10^5$  UFC/100 mL (**Tableau VI**). Les concentrations moyennes en entérocoques et en SSR sont respectivement de  $4,04.10^6$  ;  $2,36.10^5$  UFC/100 mL dans les EB et  $2,81.10^2$  ; 70,17 UFC/100 mL dans les EE de la STEP de L'Mzar, de  $3,3.10^5$  ;  $1,77.10^5$  UFC/100 mL dans les EB et 38 ; 42 UFC/100 mL dans les EE de la STEP de Drarga et de  $1,94.10^5$  ;  $1,13.10^5$  UFC/100 mL dans les EB et 12,4 ; 34,4 UFC/100 mL dans les EE de la STEP de Ben Sergao.

Les teneurs en SSR dans les trois stations relativement stable oscillant autour d'une valeur moyenne de l'ordre de  $1,8.10^4$  UFC/100 mL à l'entrée du système d'épuration alors qu'à sa sortie la valeur moyenne est de l'ordre de 15,5 UFC/100 mL.

Dans les effluents traités de la station d'épuration de L'Mzar, les teneurs des germes tests sont supérieures à celles relevées à la sortie des deux autres stations d'épuration : Ben Sergao et Drarga (la moyenne est de  $1,52.10^2$  UFC/100 mL pour les CF ;  $2,81.10^2$  UFC/100mL pour les SF et 70,17 UFC/100mL pour les SSR).

### I.2.2. Abatement des bactéries fécales dans les trois STEP

Les résultats des abattements enregistrés sont de l'ordre de 99,99% ; 99,99% ; 99,95% pour les CF, de 99,98% ; 99,97% ; 99,87% pour les SF et de 99,96% ; 99,97% ; 99,96% pour SSR respectivement dans les STEPs de Ben Sergao, Drarga et L'Mzar (**tableaux VI**). Les différents types d'indicateurs microbiens semblent donc être affectés de la même manière par les traitements appliqués aux eaux usées, et que les taux d'abattement dépassent les 99%.



**Figure 13 :** Taux moyen des coliformes fécaux (CF), des entérocoques (SF) et des spores des bactéries sulfite-réductrices (SSR) dans les eaux usées des 3 STEPs.

**Tableau VI:** Valeurs moyennes (Moy), écarts type et taux d'abattement (T.A.) des paramètres bactériologiques et physico-chimiques des eaux usées des 3 STEPs du Grand Agadir, T.A. (u.log) : taux d'abattement en unités logarithmiques.

	Paramètres	Eau Brute	Eau Décantée	Eau Epurée	T.A. (%)	T.A. (u.log)
		Moy.	Moy.	Moy.		
<b>L'Mzar</b>	pH	7,71 ±0,36	7,53 ±0,43	7,43 ±0,46	3,67	0,016
	Conductivité (µS/cm)	3249 ±761	2615 ±386	2663 ±521,9	13	0,086
	Température (°C)	21,95 ±2,52	21,41 ±2,4	20,82 ±2,74	5,25	0,022
	Salinité (‰)	1,7 ±0,34	1,68 ±0,39	1,33 ±0,2	18,69	0,105
	CF (UFC/100 mL)	2,24 10 <sup>6</sup> ±3,28 10 <sup>6</sup>	5,5 10 <sup>5</sup> ±8,18 10 <sup>5</sup>	152 ±2,18 10 <sup>2</sup>	99,95	4,16
	SF (UFC /100 mL)	4,04 10 <sup>6</sup> ±1,09 10 <sup>7</sup>	6,45 10 <sup>5</sup> ±1,39 10 <sup>6</sup>	281 ±2,65 10 <sup>2</sup>	99,87	4,15
	SSR (UFC/100 mL)	2,36 10 <sup>5</sup> ±6,8 10 <sup>4</sup>	3,22 10 <sup>4</sup> ±1,26 10 <sup>4</sup>	70,17 ±20,04	99,96	3,52
<b>Drarga</b>	pH	7,24 ±1,07	7,08 ±0,97	7,23 ±0,19	-2,69	0,001
	Conductivité (µS/cm)	3380 ±0,9	3260 ±0,21	2940 ±0,36	6,89	0,059
	Température (°C)	21,11 ±2,15	20,14 ±2,22	20,44 ±3,95	3,3	0,021
	Salinité (‰)	1,49 ±0,28	1,51 ±0,13	1,33 ±0,19	6,33	0,048
	CF (UFC/100 mL)	4,6 10 <sup>5</sup> ±5,36 10 <sup>5</sup>	3 10 <sup>5</sup> ±3,53 10 <sup>5</sup>	139,6 ±11,5	99,99	4,51
	SF (UFC /100 mL)	3,3 10 <sup>5</sup> ±2,72 10 <sup>5</sup>	3,32 10 <sup>5</sup> ±7,88 10 <sup>5</sup>	38 ±31,67	99,97	3,93
	SSR (UFC/100 mL)	1,77 10 <sup>5</sup> ±2,6 10 <sup>4</sup>	1,84 10 <sup>4</sup> ±6,26 10 <sup>3</sup>	42 ±10,56	99,97	3,40
<b>Ben Sergao</b>	pH	7,49 ±0,19	7,32 ±0,16	7,32 ±0,16	2,24	0,009
	Conductivité (µS/cm)	3324 ±0,28	3085 ±0,22	3003 ±0,32	9,31	0,044
	Température (°C)	21,12 ±2,42	21,46 ±2,67	20,72 ±2,34	1,87	0,008
	Salinité (‰)	1,68 ±0,1	1,58 ±0,13	1,57 ±0,13	6,33	0,029
	CF (UFC/100 mL)	2,8 10 <sup>5</sup> ±9,63 10 <sup>4</sup>	8,4 10 <sup>4</sup> ±3 10 <sup>4</sup>	7,2 ±4,18	99,99	4,59
	SF (UFC /100 mL)	1,94 10 <sup>5</sup> ±9,67 10 <sup>4</sup>	5,49 10 <sup>4</sup> ±2,7 10 <sup>4</sup>	12,4 ±11,89	99,98	4,19
	SSR (UFC/100 mL)	1,13 10 <sup>5</sup> ±1,2 10 <sup>4</sup>	2 10 <sup>4</sup> ±5,98 10 <sup>3</sup>	34,4 ±10,25	99,96	3,51



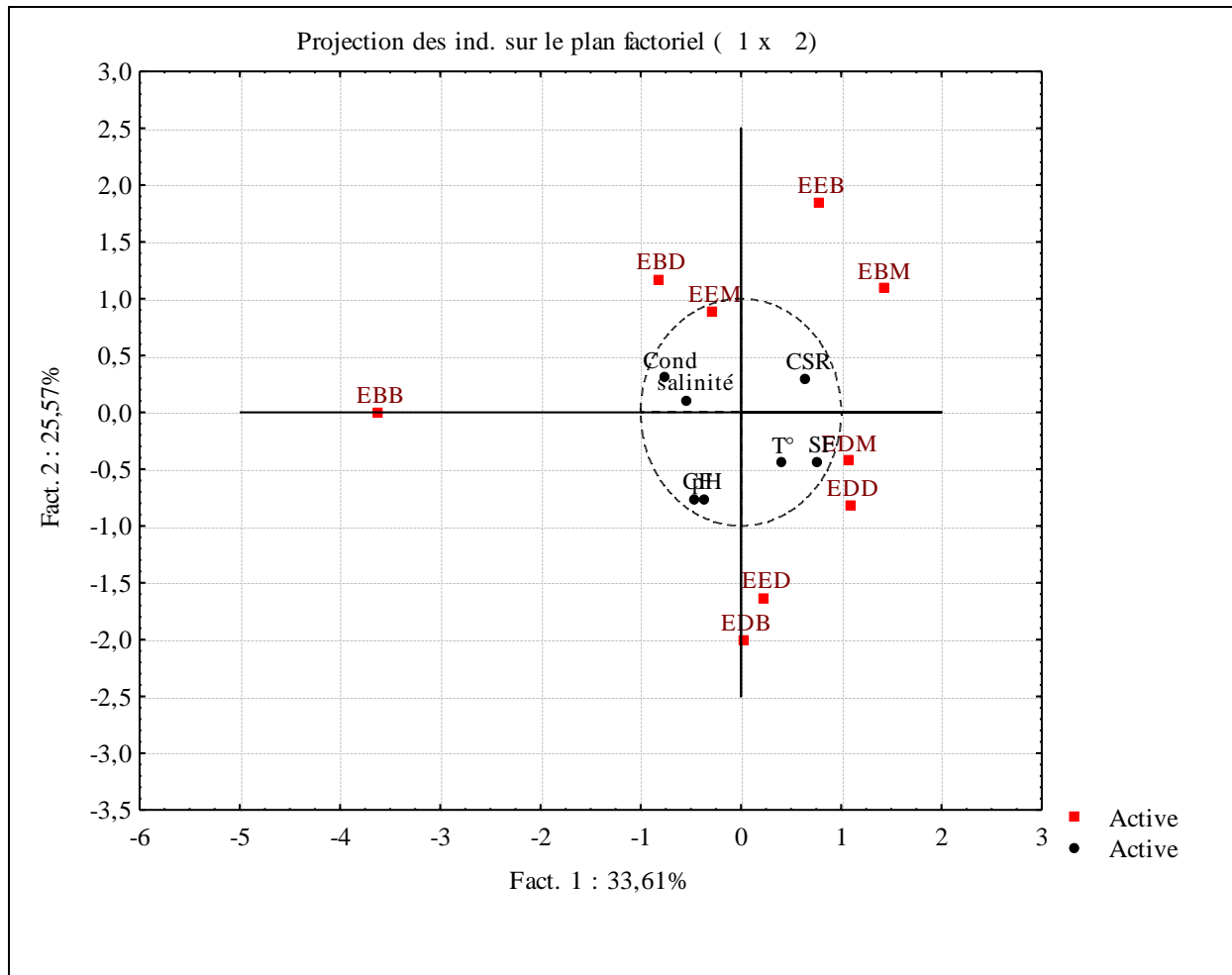
### I.3. Analyse statistique

L'analyse en composantes principales (ACP) a été effectuée sur les sept variables physico-chimiques et bactériologiques mesurés sur des prélèvements d'eaux usées collectées en neuf points (trois points par station d'épuration). L'analyse des variables montre que l'axe F1 exprime 33,61 % de la variance (**figure 14**). Avec les deux premiers axes (58,18 % d'inertie) dans un système bidimensionnel des sept paramètres mesurés (température, pH, conductivité, salinité, coliformes fécaux, entérocoques et les spores d'anaérobies sulfite réducteurs) paraît raisonnable. Ces considérations nous ont permis d'obtenir la matrice de corrélation des données (**tableau VII**), et la représentation graphique des corrélations entre les différentes variables (**figure 14**) avec le regroupement des sites d'échantillonnage.

L'axe 1 ou axe de pollution permanente est défini positivement par ces 3 variables : température (T), entérocoques (SF) et les spores d'anaérobies sulfite réducteurs (SSR). Du côté négatif de l'axe, on rencontre les variables suivantes : pH, coliformes fécaux (CF), conductivité et salinité. La disposition de la presque totalité des variables (**figure 14**) dans les quadrants I et III, permet de mettre en évidence une relation entre les différentes variables, notamment l'existence d'un rapport étroit entre les données bactériologiques (CF) et les variables physiques (température, salinité, conductivité et pH). Ce rapprochement est souligné, sur le **tableau VII**, par des corrélations positives : 0,577 avec le pH, 0,425 avec la température. Par ailleurs, l'examen des coefficients de corrélation entre les couples de variable (**tableau 6**), montre que le pH a une faible corrélation avec les bactéries : SSR ( $r = -0,241124$ ), entérocoques ( $r = 0,018127$ ), la conductivité et la salinité montrent respectivement un coefficient de corrélation significatif et négatif avec les SSR ( $r = -0,747653$ ), et ( $r = -0,590278$ ).

L'axe 2, moins important avec une variance de 25,57 %, cet axe représente l'axe de pollution spécifique occasionnelle, et elle est représentée essentiellement par des individus provenant des prélèvements d'eaux usées EBD, EDD, EDM, EEB et EEM.

D'après cette analyse statistique, on peut conclure que la distribution des valeurs des paramètres étudiés correspond à une répartition spatiale des points d'échantillonnage. En effet, le point de prélèvement EBM représente le point dont la qualité de l'eau est chargée bactériologiquement.



**Figure 14 :** Analyse en composantes principales des paramètres physico-chimiques et bactériologiques étudiés au niveau des stations d'épuration des eaux usées de la Wilaya d'Agadir.

Cond : conductivité ; Salin : salinité ; T°: température ; CF : Coliformes fécaux ; SF : entérocoques ; SSR : spores des bactéries sulfite-réductrices.

EBM : eau usée brute L'Mzar ; EDM : eau décanté L'Mzar ; EEM : eau épurée L'Mzar ; EBB : eau usée brute Ben Sergao ; EDB : eau décantée Ben Sergao ; EEB : eau épurée Ben Sergao ; EBD : eau usée brute Drarga ; EDD : eau décantée Drarga ; EED : eau épurée Drarga.

**Tableau VII** : Matrice de corrélation obtenue à partir de l'analyse en composantes principales normées des paramètres physico-chimiques et bactériologiques des échantillons d'eaux usées prélevés *in situ* dans les trois stations d'épuration de la Wilaya d'Agadir

Paramètre	pH	Cond.	Salinité.	T°	CF	SF	SSR
pH	1	0,0410	0,3044	0,2793	0,5779	0,0181	-0,2411
Conductivité	0,0410	1	0,0722	-0,1527	0,0380	-0,7476	-0,442
Salinité	0,3044	0,0722	1	-0,230	0,1499	-0,5902	0,1190
T°	0,2793	-0,1522	-0,2308	1	0,1062	0,2544	0,4257
CF	<b>0,5779</b>	0,0380	0,1499	0,1062	1	-0,0100	-0,5273
SF	0,0181	-0,7476	-0,5902	0,2544	-0,010	1	0,1377
SSR	-0,2411	-0,4421	0,1190	<b>0,4257</b>	-0,527	0,1377	1

CF : Coliformes fécaux ; SF : entérocoques (Streptocoques fécaux) ; SSR : spores des bactéries sulfite-réductrices, T : température ;

## Discussion

Le traitement des eaux usées est d'une importance capitale dans les sociétés modernes compte tenu des risques sanitaires qu'il représente. La conception des systèmes d'épuration s'inscrit dans une stratégie qui vise outre la protection de l'environnement et la santé publique, le dégagement d'une ressource en eau supplémentaire et la réutilisation des eaux épurées notamment pour l'irrigation.

A Agadir, de nombreuses études ont été conduites sur le procédé d'infiltration-percolation sur sable sur les différents aspects : microbiologique (Anajjar, 1997; Ben Yakhlef, 1998; El Hachemi, 1999; Mimouni, 2004, Mimouni *et al.*, 2005 ; Mimouni *et al.*, 2009), physico-chimique (Touyer O., 1997; Mimouni *et al.*, 2011) et parasitologique (Guessab *et al.*, 1993; Touyer, 1997; Mimouni, 2004). La présente étude, qui s'inscrit dans la suite de ces travaux, se propose de caractériser la qualité bactériologique et physico-chimique des eaux usées des trois stations d'épuration de la ville d'Agadir : Ben Sergao, Drarga et L'Mzar, et de vérifier si les exigences du rejet de la station de L'Mzar respectent les valeurs limites indicatives pour les eaux destinées à l'irrigation.

Parmi les paramètres physico-chimiques étudiés la température, facteur écologique important du milieu, elle est importante pour le bon fonctionnement de la digestion anaérobie des boues et l'activité de la faune épuratrice du sable (Touyer, 1997). Les températures enregistrées au niveau des eaux usées épurées (EE) pour les 3STEPS sont toujours inférieures à celles enregistrées pour l'eau usée brute (EB), en effet l'ED se refroidit à la surface des filtres de sable avant sa filtration, il en résulte des EE avec des températures plus basses (Touyer, 1997). Cependant pour la STEP de Drarga on remarque que l'eau usée décantée (ED) à une température faible ceci est dû à la re-circulation des eaux usées épurées présentant des températures basses vers les bassins de dénitrification pour être mélangées avec les ED avant de les acheminées vers les bassins de sable (**figure 6**).

La faible valeur du pH de l'effluent brut par rapport à l'effluent décanté dans les trois stations d'épuration s'explique par le pouvoir tampon du système d'épuration dans le maintien du pH de l'effluent décanté dans la zone de neutralité. Ce phénomène a été rapporté par Touyer 1997 : le pH de l'eau épurée est étroitement lié à celui de l'eau décantée.

Toutes les valeurs de pH enregistrées comme celles de la température sont compatibles avec les activités biologiques en milieu aquatique. Elles n'auront donc pas d'incidence néfaste sur la faune et sur la flore du milieu récepteur de même elles sont considérées comme valeur limite indicative pour les eaux destinées à l'irrigation.

La conductivité électrique de l'eau usée brute montre une forte minéralisation pour les trois stations d'épuration. Des résultats similaires ont été rapportés par [Touyer \(1997\)](#) et [Abouelouafa et al., \(2002\)](#) La forte minéralisation serait liée à l'activité industrielle de la ville représentée essentiellement par les unités industrielles de la transformation des produits de la mer, avec une consommation annuelle en eau de l'ordre de 1 400 000m<sup>3</sup> à 2 100 000m<sup>3</sup> ([RAMSA, 2001](#)).

Les eaux usées véhiculent un nombre important d'agents pathogènes : parasites, bactéries et virus ([IME, 1987](#)). L'efficacité d'élimination des germes lors de l'infiltration-percolation est fonction non seulement de leur rétention mais de leur capacité de survie dans le lit filtrant ([Billaut, 1989](#) ; [Makni, 1995](#)). Les mécanismes de rétention de ces germes sont la filtration (parasites et bactéries) et la sédimentation (bactéries) dans les pores, ainsi que l'adsorption (bactéries et virus) sur le complexe du sol ([Moreau, 1993](#)). L'élimination des micro-organismes est importante à la surface du sol, les parasites et leurs œufs étant efficacement filtrés de même qu'une part importante des bactéries et virus adsorbés sur les matières en suspension ([Brissaud et al., 1989](#)). Cependant, il existe des possibilités de transport des bactéries et virus dans le sol qui sont essentiellement fonction des caractéristiques du sol, de celles de l'effluent, du mode d'épandage, ainsi que des conditions climatiques (précipitations) ([Gerba et al., 1984](#)). Il existe des différences selon les microorganismes, mais il apparaît que les bactéries peuvent être retenues dans les premiers centimètres du sol ([Rabhi, 1988](#)). L'évaluation de la qualité microbiologique des eaux est basée sur le concept de germes dits "indicateurs". Ces indicateurs (ou bactéries indicatrices de contamination) n'ont pas nécessairement par eux-mêmes un caractère pathogène, mais leur présence indique l'existence d'une contamination par des matières fécales et leur abondance est une indication du niveau de risque de présence de micro-organismes pathogènes.

Les résultats de dénombrement des indicateurs de contamination fécale au niveau des eaux usées brutes des trois stations d'épuration de la ville d'Agadir, montrent que le nombre des CF varie de  $9,88 \cdot 10^6$  UFC/100mL (valeur mensuelle maximale enregistrée) pour la station de L'Mzar à  $3,5 \cdot 10^4$  UFC/100mL pour la station Drarga (valeur mensuelle minimale enregistrée). Le nombre des SF varie de  $3,8 \cdot 10^7$  UFC/100mL (valeur mensuelle maximale

enregistrée) pour la station de L'Mzar à  $2,9.10^4$  UFC/100mL pour la station Drarga (valeur mensuelle minimale enregistrée). Cette charge est de même ordre de grandeur que celle généralement rencontrée dans les effluents urbains qui varie entre  $4,9.10^6$  et  $4,1.10^7$  UFC/100mL (Stover *et al.*, 1986 ; Shahalam, 1989 ; Mezrioui et Balleux, 1994 ; Trad, 1989; Empanza-Knorr *et al.*, 1995; Nigim *et al.*, 2002).

Les eaux usées épurées des trois stations véhiculent une charge bactérienne moins élevée que les eaux usées brutes. Les coliformes, les entérocoques et les spores de bactéries sulfito-réductrices sont présents à des concentrations moyennes respectives qui varient entre 7,2-152 UFC/100mL, 12,4-281UFC/100mL et 42-70,17 UFC/100mL. Ces valeurs mensuelles représentent les valeurs mensuelles minimales enregistrées à Ben Sergao et les valeurs mensuelles maximales enregistrées à L'Mzar.

Bien que la charge bactérienne au niveau de l'effluent traité de la station de L'Mzar soit plus élevée que dans les deux autres stations d'épuration, elle reste inférieure à la concentration limite (1000 CF/100mL) recommandée par l'OMS pour une réutilisation en irrigation non restrictive (OMS, 1989b), à condition que le taux des œufs d'Helminthe soit inférieur à 1 OH/L.

Les taux d'abattement des indicateurs de la contamination fécale, enregistrés pour les trois stations d'épuration, concordent avec les valeurs trouvées dans la littérature et qui montrent que les procédés biologiques permettent de réduire l'abondance des coliformes de 3 à 4 unités logarithmiques. Il est de l'ordre de 90% pour les boues activées (Omura, 1989 ; Dupray *et al.*, 1990), de 99% pour les boues activées en aération prolongée et pour les réacteurs à culture fixe (Audic, 1990), et de 99,9% pour le lagunage (Finch et Smith, 2003). Ces taux d'abattement sont liés à la vitesse de décantation, au temps de séjour hydraulique, à la qualité de l'eau usée brute (Audic, 1990).

## CHAPITRE II

***Isolement, identification et recherche de la résistance aux antibiotiques des souches de Vibrio prélevés des eaux usées des stations d'épuration de la Wilaya d'Agadir***

## **I. Isolement, identification et résistance aux antibiotiques des *Vibrio* isolés**

L'objectif de cette étude est double : collecter, à partir des échantillons d'eaux usées prélevés dans les trois stations d'épuration de la Wilaya d'Agadir, un grand nombre de souches pour avoir la plus de diversité possible dans les souches de *Vibrio* pour la suite de l'étude. Avoir une image actualisée de la diversité de l'espèce de *Vibrio* isolée dans les eaux usées des trois STEP's retenues dans le cadre de notre étude, et principalement dans les eaux usées épurées de la STEP de L'Mzar destinées à l'irrigation.

Au cours de cette étude, au niveau des trois stations d'épuration de la Wilaya d'Agadir (L'Mzar, Drarga et Ben Sergao), à différents stades de traitement des eaux usées (EB, ED et EE) et tout au long de la période de prélèvements (Décembre 2006 jusqu'à mai 2007), nous avons prélevé 117 échantillons d'eaux usées (brutes, décantées et épurées), dont 70 échantillons ont été positifs pour la recherche des *Vibrio*. Cependant, ayant rencontré un problème au niveau du repiquage des souches ; nous n'avons pu conserver que 58 souches de *Vibrio*.

### **I.1. Indentification des souches, sérotypage et recherche de la toxine cholérique**

#### **I.1.1. Identification**

L'identification des souches de *Vibrio* par le système Vitek 2<sup>TM</sup> a permis de caractériser les 58 souches: 26 souches de *V. cholerae*, 16 souches de *V. alginolyticus*, 9 souches de *V. fluvialis* et une souche de *V. metschnikovii*. Les résultats sont présentés dans la **figure 15** et le **tableau VIII**.

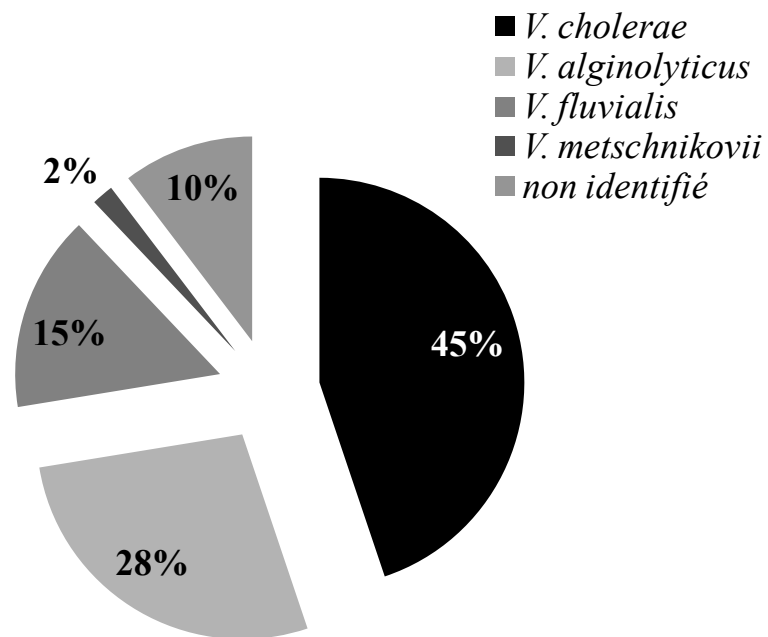
Au cours de cette étude 6 souches de *Vibrio* n'ont pas été identifiées par le système Vitek 2

#### **Exemple :**

- une souche *Vibrio sp.* n° 84 est identifiée avec un pourcentage de 50,28 % comme *Aeromonas sobria* et de 49,72% comme *Vibrio metschnikovii*

Sur les 31 souches de *V. cholerae* isolées (incluant 5 souches identifiées par PCR cf **Tableau IX**, page 70), 10 souches (32,25%) ont été isolées des EE.





**Figure 15** : Pourcentage des souches de *Vibrio* identifiées par le système Vitek 2®.

**Tableau VIII** : Répartition des souches de *Vibrio* dans les différents types d'eaux usées des stations d'épuration des eaux usées de la Wilaya d'Agadir.

	Stations d'épuration des eaux usées								
	L'Mzar			Drarga			Ben Sergao		
Souches de <i>Vibrio</i>	EB	ED	EE	EB	ED	EE	EB	ED	EE
<i>Vibrio cholerae</i>	6	6	5	2	-	3	2	5	2
<i>Vibrio fluvialis</i>	2	2	-	-	1	-	2	-	2
<i>Vibrio alginolyticus</i>	2	2	3	2	3	-	2	1	2
<i>Vibrio metschnikovii</i>	-	-	-	-	1	-	-	-	-

EB : Eau usée Brute ; ED : Eau usée Décantée ; EE : Eau usée Epurée

- la souche n°6 identifiée par le système Vitek 2 comme étant *Aeromonas sobria* ; alors que la lecture du résultat du composé vibriostatique O/129 montre qu'il y a une discordance avec l'identification. Ce résultat montre que *A. sobria* est sensible au O/129 (**annexe 7**).

Ces souches ont été envoyées au Laboratoire d'analyse de l'Unité de Microbiologie Environnementale de l'Institut Français de Recherche pour l'Exploitation de la Mer (IFREMER) de Brest pour confirmation de leur identification par Polymerase Chain Reaction (PCR), le résultat est présenté dans le **tableau IX**.

### **I.1.2. Test d'agglutination à l'aide de l'antisérum anti-O1 et recherche de la production de la toxine cholérique**

- Le test d'agglutination sur lame a confirmé que toutes les souches identifiées comme *Vibrio cholerae* isolées au cours des différentes phases d'épuration sont des *Vibrio cholerae* non-O1 (**annexe 8**).
- Toutes les souches de *Vibrio cholerae* sont sensibles à la polymyxine B (**figure 16**),
- Toutes ces souches ne produisent pas de toxine cholérique.

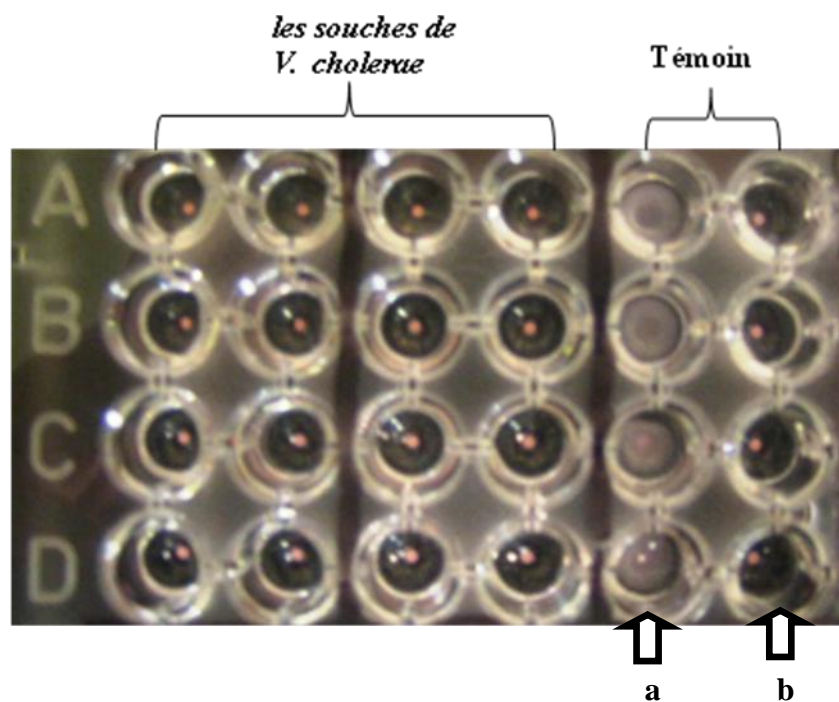
### **I.2. Résistance des vibrions isolés des différents échantillons aux antibiotiques**

Bien que l'efficacité épuratoire du système infiltration-percolation ait été démontrée dans l'abattement des indicateurs de contamination, les filières de traitement rejettent dans le milieu récepteur des quantités plus ou moins grandes de bactéries. La présence de *V. cholerae* non-O1 dans les effluents traités pose de sérieux problèmes qui seraient encore plus graves si ces bactéries présentaient une multi-résistance aux antibiotiques.

L'étude de la résistance des vibrions a été réalisée sur les 58 souches de *Vibrio* dont 28 sont isolées des eaux usées de la station d'épuration de L'Mzar, 12 au niveau de la station de Drarga et 18 au niveau la station de Ben Sergao.

**Tableau IX** : Confirmation de l'identification de certaines souches de *Vibrio* par la technique Polymerase Chain Reaction (PCR).

N° de la souche	Première technique : Vitek 2	Deuxième technique : PCR
6	<i>Aeromonas sobria</i>	<i>V. cholerae</i>
8	faible discrimination	<i>V. cholerae</i>
23	faible discrimination	<i>V. alginolyticus</i>
27	faible discrimination	<i>V. cholerae</i>
84	<i>Vibrio sp.</i>	<i>V. cholerae</i>



**Figure 16:** Test d'agglutination RPLA pour la détection de la toxine cholérique, a : Test positif, b : Test négatif.

### I.2.1. Résistance des souches isolées de la station d'épuration L'Mzar

D'après les résultats de la **figure 17 (A)** et du tableau (**annexe 9**), nous constatons :

La majorité des souches de *V. cholerae* non-O1 isolés dans les différents types d'eaux usées (brute, décantée et épurée) de la station présente un phénotype sauvage (résistance naturelle) 76,47 % (13/17), avec cependant des résistances pour certaines souches isolées dont :

- 2 souches résistantes à la fosfomycine,
- 1 souche résistante au Sulfaméthoxazole Triméthoprime (SXT), et à l'acide nalidixique (NAL).

Alors que 23,52% (4/17) des souches de *Vibrio cholerae* isolées présentent le phénotype pénicillinase bas niveau. (résistance à AMX et TIC)

Pour les 7 souches de *V.alginolyticus*:

- 2 souches présentent un phénotype sauvage
- 4 souches (57,14%) ont un phénotype pénicillinase bas niveau,
- et une souche a un phénotype céfuroximase.

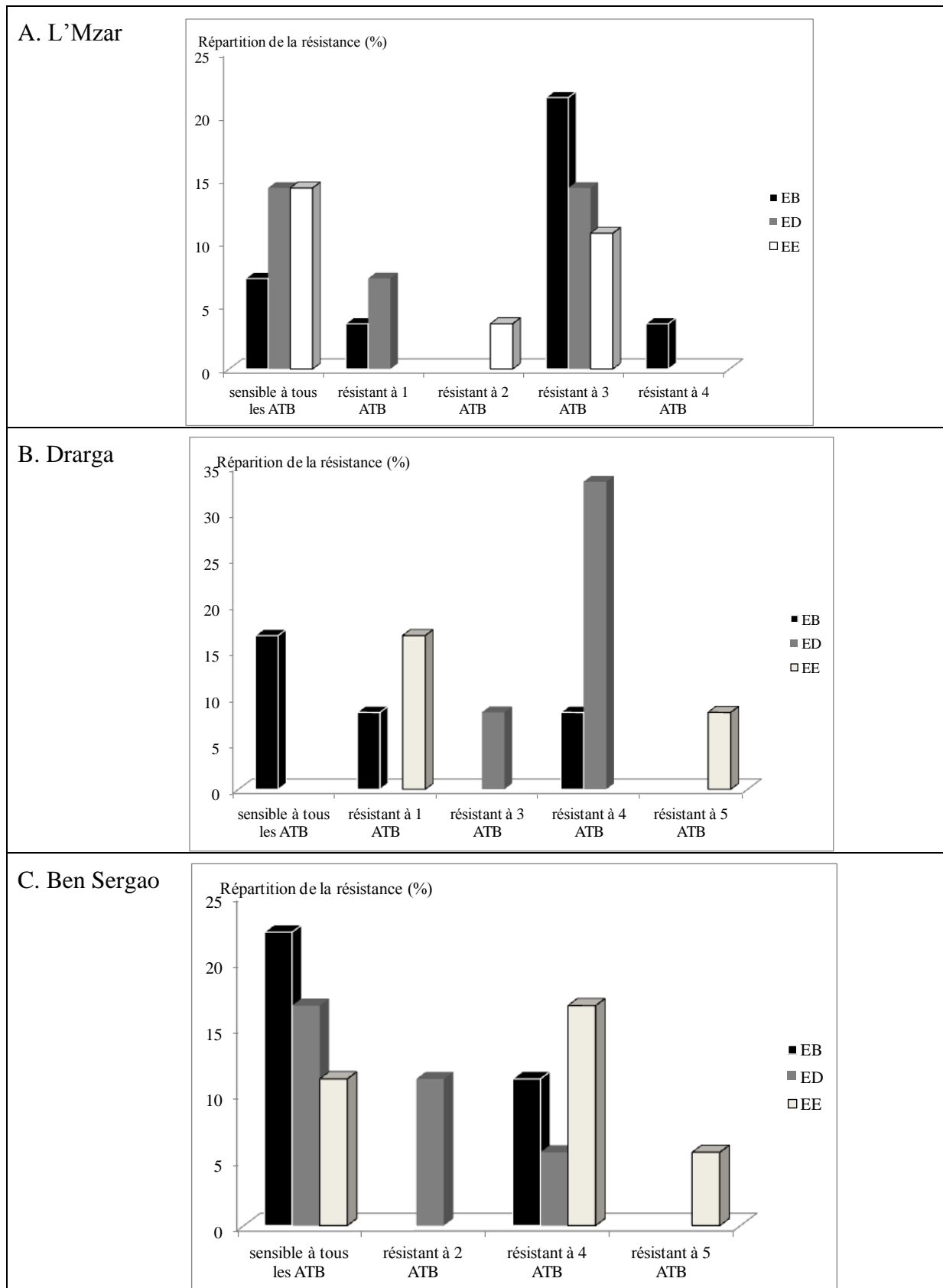
Les 4 souches de *V. fluvialis* isolées de l'EB et l'ED présentent un phénotype céphalosporinase bas niveau (résistance à : AMX, CF, AMC).

### I.2.2 Résistance des souches isolées de la station d'épuration de Drarga

Les résultats de l'antibiorésistance pour les souches de *Vibrio* isolées de la station de Drarga sont présentés dans la **figure 17 (B)**.

4 souches de *V. cholerae*, une souche de *V. alginolyticus* et la souche de *V. metschnikovii* sont de type sauvage alors que 4 souches de *V. alginolyticus* et une souche de *V. cholerae* produisent une pénicillinase à bas niveau.

Pour la souche de *V. fluvialis* isolée des ED, elle est de type céphalosporinase bas niveau (résistant à : AMX, CF, AMC).



**Figure 17 :** Répartition des profils de résistance aux antibiotiques (%) chez les souches de *Vibrio* isolées des eaux usées (EB, ED, EE) des trois stations d'épuration de la Wilaya d'Agadir.

### I.2.3. Résistance des souches isolées de la station d'épuration de Ben Sergao

Pour cette station, nous avons répertorié 10 souches de phénotype sauvage (8 *V. cholerae* et 2 *V. alginolyticus*), 4 souches de type pénicillinase bas niveau (1 *V. cholerae* et 3 *V. alginolyticus*). Les 4 souches de *V. fluvialis* isolées de cette station sont de type céphalosporinase bas niveau (**annexe 11**).

#### En conclusion :

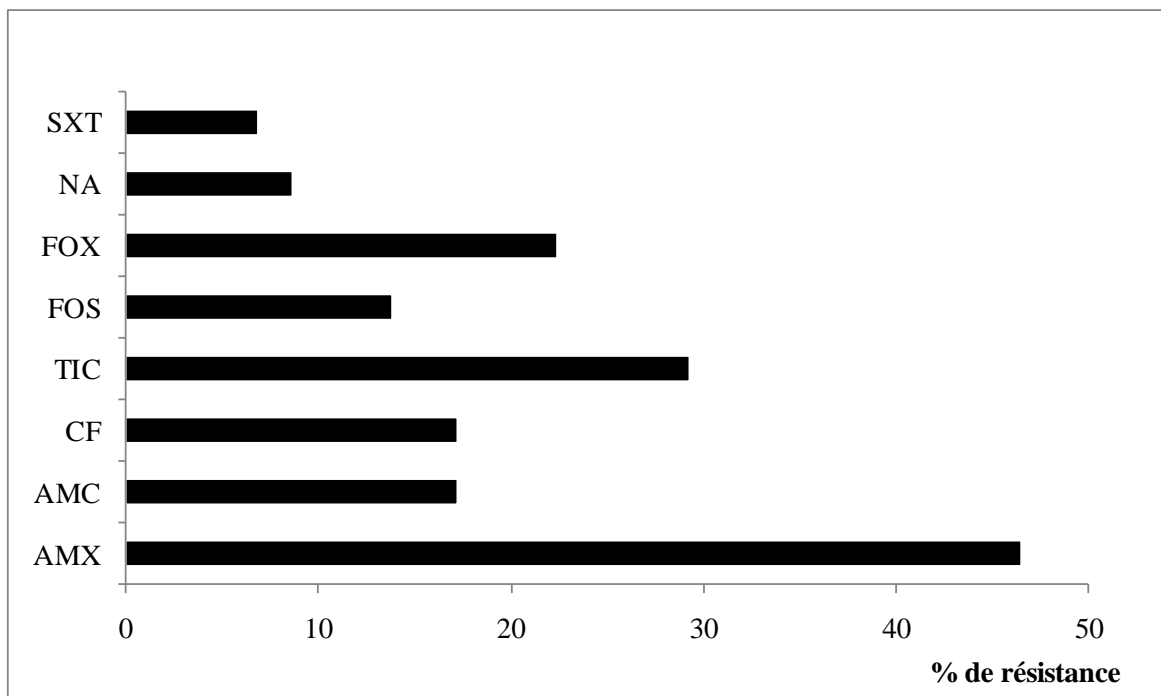
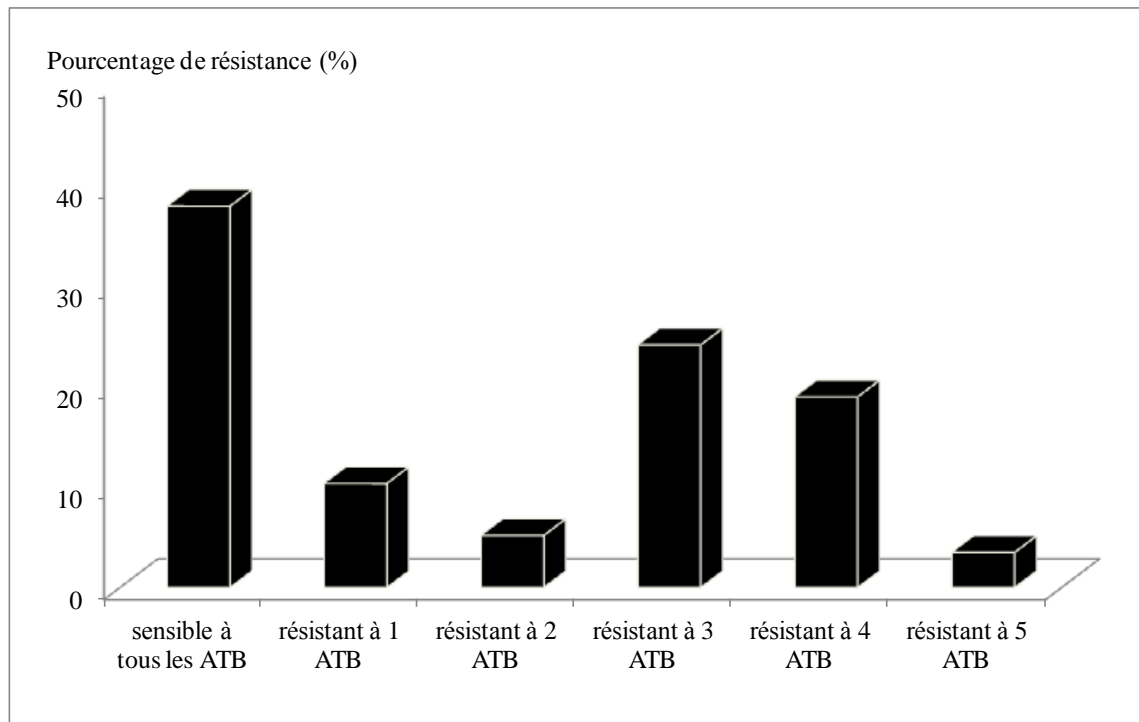
Les résultats de la détermination de la sensibilité aux antibiotiques des vibriens isolés dans les différents types d'eaux usées des trois STEPs de la ville d'Agadir ont montré que :

- Le phénotype dominant est de type sauvage : 53,44% (11 souches isolées dans les ED, 10 souches dans les EE et 9 souches dans les EB) (**figure 18**)
- Le phénotype pénicillinase à bas niveau représente 31,03 % (6 souches isolées dans les EB, 7 dans les ED et 5 dans les EE). Ce phénotype est aisément détectable par la résistance aux  $\beta$ -lactamines suivantes: amoxicilline (AMX), ampicilline, ticarcilline (TIC) et la restitution de la sensibilité avec l'acide clavulanique illustrée par des réponses majoritairement «sensible» pour l'amoxicilline + acide clavulanique (AMC) et la ticarcilline + acide clavulanique (TCC).
- Toutes les souches de *V. fluvialis* sont de phénotype céphalosporinase à bas niveau 15,51% (9 souches/58). Les céphalosporinases, codées le plus souvent par un gène chromosomique, ne sont produites qu'en présence d'inducteurs qui sont presque toujours des  $\beta$ -lactamines. Les inhibiteurs de  $\beta$ -lactamases n'inhibent pas ces enzymes. Ces dernières sont produites à bas niveau par les souches sauvages. Une mutation sur les gènes régulateurs aboutit à une hyperproduction de ces enzymes : céphalosporinase de haut niveau, dérprimée ou hyperproduite.

Les céphalosporinases bas niveau sont caractérisées par une résistance à l'amoxicilline (AMX), l'amoxicilline + acide clavulanique (AMC) et la céfalotine (CF) et par une sensibilité à la ticarcilline (TIC) et à la ceftazidime (CAZ).

- Une souche de *V. alginolyticus* est de phénotype céfuroximase (résistance à l'AMX et au CF).

12,9% des souches de *V. cholerae* (4 souches de *V. cholerae* de phénotype sauvage) sont résistantes au SXT et au NAL.



**Figure 18 :** Résistance aux antibiotiques (%) chez les souches de *Vibrio* isolées des eaux usées des trois stations d'épuration d'Agadir

## II. Discussion

Les eaux usées urbaines contiennent un grand nombre de microorganismes : *Salmonella* spp., *Escherichia coli*, streptocoques fécaux, *Clostridium* spp., *Vibrio* spp., *Aeromonas* spp. et de virus (hépatite A, virus responsables de gastro-entérites, entérovirus), pathogènes pour l'homme et peuvent entraîner des pathologies à l'occasion de la consommation d'éléments souillés par de l'eau contaminée ou de baignades dans la mer qui représente le réceptacle propice des eaux usées. Ainsi, l'évaluation de l'impact microbiologique des eaux usées passe tout d'abord par la connaissance de la charge bactérienne et des mécanismes qui régissent l'activité et la survie des bactéries dans le milieu récepteur. Les facteurs environnementaux influençant ainsi, la survie des *Vibrio* ont fait l'objet de nombreuses études. Les principaux facteurs de stress étudiés sont: la lumière solaire, la salinité, la teneur en éléments nutritifs, la température, le pH (Huq *et al.*, 1984), la prédation et la compétition de flore (Islam, 1990). Sous l'effet de ces différents stress, les bactéries évoluent dans l'eau côtière, vers des formes viables non cultivables.

Plusieurs études ont rapporté qu'il n'existe pas de corrélation entre la dynamique des populations de *Vibrio* et celles des indicateurs de pollution fécale (Robert-Pillot 2006 ; Quilici *et al.*, 2007). Ainsi nous avons fixé comme objectif de déterminer la présence ou l'absence des espèces du genre *Vibrio* dans les eaux usées épurées des 3 STEPs du Grand Agadir.

L'identification des souches isolées des trois stations d'épuration du Grand Agadir par le système Vitek 2<sup>®</sup>, confirmée pour certaines souches par la PCR, a montré l'isolement de 4 espèces de *Vibrio* dans les trois stations fonctionnant selon le système d'infiltration-percolation et dans les différentes étapes de traitement des eaux usées (EB, ED et EE) : *V. cholerae*, *V. alginolyticus*, *V. fluvialis* et *V. metschnikovii*. Avec une prédominance de l'isolement des *V. cholerae* non-O1 (32,25% dans les EE, 35,48% dans les ED et 32,25% dans les EB), ce qui suggère que le système d'épuration ne permet pas d'éliminer les vibrions notamment les *V. cholerae*. Mimouni, 2004 avait rapporté la présence de plusieurs souches de *V. cholerae* non-O1 au niveau des EB et des ED de la station d'épuration de Ben Sergao et leur absence dans les eaux usées épurées. L'écologie des espèces de *Vibrio* dans les stations d'épuration de la Wilaya d'Agadir est représentée majoritairement par de trois espèces : *V. cholerae*, *V. alginolyticus*, *V. fluvialis*. Une colonisation de ces stations par ces espèces (*V. cholerae*, *V. alginolyticus*, *V. fluvialis*) pourrait s'expliquer par leur adaptation aux conditions



du milieu. La présence de *Vibrio* dans les effluents traités pourrait poser de sérieux problèmes qui seraient encore plus graves si ces bactéries présentaient une résistance.

L'utilisation massive d'antibiotiques a abouti à l'émergence de souches bactériennes résistantes. Pourtant, dès 1980, l'OMS déclarait : « *Les résistances de plus en plus fréquentes chez les bactéries posent d'ores et déjà des difficultés dans la thérapeutique humaine et vétérinaire et pourraient, si la tendance actuelle se maintient, rendre les antibiotiques beaucoup moins efficaces qu'ils ne le sont aujourd'hui, privant l'humanité d'une arme extrêmement précieuse contre de nombreuses maladies. L'apparition des souches bactériennes antibiorésistantes est étroitement liée aux problèmes d'hygiène de l'environnement* ». L'utilisation des antibiotiques, à la fois en médecine humaine et vétérinaire, exerce une pression de sélection parmi les bactéries commensales ou pathogènes de l'homme ou de l'animal qui peuvent rejoindre l'environnement naturel (eaux continentales, côtières ou le sol via les effluents d'élevages ou les eaux usées). Cela pourrait conduire à l'émergence et à la dissémination des gènes de résistance aux antibiotiques dans les communautés microbiennes de l'environnement.

L'existence de liens entre les différents compartiments écologiques conduit donc à s'intéresser aux voies d'émissions des bactéries résistantes et des gènes de résistance dans l'environnement. La plupart des études qui ont été faites sur l'incidence de la résistance des bactéries dans les eaux usées ont surtout été concentrées sur les coliformes ([Passerat et al., 2010](#)). Peu d'études ont été consacrées à l'antibiorésistance des vibrions durant le traitement des eaux usées ([Imzilin 1990](#) ; [Imzilin, et Hassani 1994](#) ; [Mezrioui et al., 1995](#) ; [Mimouni 2004](#)).

Au cours de cette étude, la comparaison des pourcentages de résistance dans les EB et les EE montre que l'épuration des eaux usées par infiltration-percolation ne modifie pas significativement le degré de résistance des souches de *Vibrio*. Ceci est en accord avec les résultats rapportés par [Imzilin \(1990\)](#), et [Mezrioui et al., \(1995\)](#). La résistance de ces souches est indépendante de leurs origines ([Toranzo et al., 1984](#)), et dont 46% des souches présentent une résistance à l'AMX et 29% sont résistant à la TIC.

La résistance des souches de *Vibrio* documentées jusqu'à maintenant aux  $\beta$ -lactamines est médiée par un plasmide codant en même temps pour de nombreux autres antibiotiques ([Olukoya et al., 1995](#) ; [Kruse et al., 1995](#)). Les pénicillinases portées par des plasmides ont souvent été retrouvées dans la plupart des bacilles à Gram négatif dont les plus connues sont

les pénicillinases à spectre étroit TEM1 et SHV1 (Matthew, 1979). Une étude réalisée par Aucher en 1998, rapporte que l'ampicilline est généralement inactive vis-à-vis de la majorité des vibrions. Selon Guévard (2006) cette résistance est due à de multiples mécanismes dont la résistance plasmidique transférable et chromosomique. De façon générale, les *Vibrio* sont habituellement sensibles aux bêta-lactamines, aminosides, quinolones, tétracyclines, chloramphénicol, sulfamides, triméthoprime, furanes, acide nalidixique et fluoroquinolones. La multirésistance acquise par l'intermédiaire d'éléments génétiques transférables (plasmides, transposons conjugatifs) au sein des *Vibrionaceae* est devenue très fréquente (Iwanaga *et al.* 2004 ; Ahmed *et al.*, 2005)

Le transfert horizontal de la résistance aux antibiotiques chez les *Vibrio* est communément associé à un plasmide : c'est le cas par exemple de *V. cholerae* O1 El Tor (Falbo *et al.* 1999). D'autres éléments conjugatifs permettent l'acquisition de cette résistance. Chez *V. cholerae*, un transposon conjugatif appelé SXT confère une résistance à plusieurs antibiotiques (Chloramphénicol, Streptomycine, Ampicilline, Néomycine, Tétracycline, Gentamicine, Sulfonamide et Furazolidone) (Waldor *et al.*, 1996 ; Beaber *et al.*, 2002 ; Thungapathra *et al.*, 2002). Contrairement aux plasmides, le génome du transposon SXT ne contient pas les gènes nécessaires à une répllication autonome et une ségrégation. Néanmoins cette structure possède tous les gènes nécessaires à son excision, sa transmission et son intégration au chromosome.

### CHAPITRE III

*Analyse génomique par électrophorèse en champ pulsé et évaluation de la spectrométrie de masse MALDI-TOF dans l'identification et la classification des souches de Vibrio.*

Dans ce chapitre, nous présentons les résultats de la caractérisation des souches de *Vibrio* isolées des eaux usées des stations d'épuration de la ville d'Agadir, en utilisant une approche spectrométrique (MALDI-TOF) en tant que méthode rapide d'identification bactérienne. Nous avons cherché à mettre au point de nouveaux outils de caractérisation spectrale pour différencier les souches isolées entre elles et entrepris une approche moléculaire (électrophorèse en champ pulsé) dans le but de réaliser des empreintes moléculaires reflet de la diversité génétique des souches.

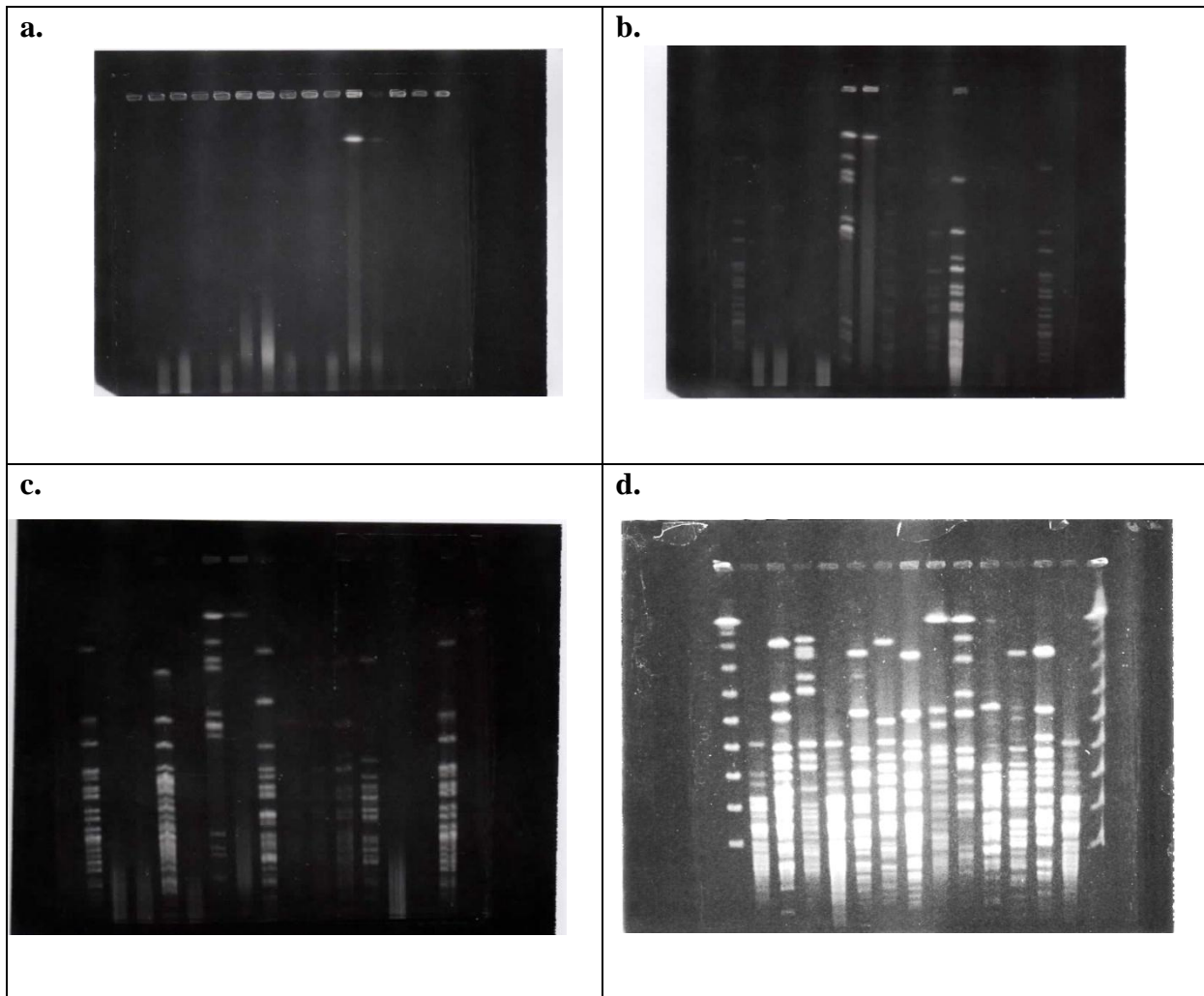
### ***I. Analyse phylogénétique des profils de l'électrophorèse en champ pulsé***

Les relations génétiques entre des souches de *Vibrio* isolées des trois stations d'épuration (L'Mzar, Drarga et Ben Sergao) ont été étudiées avec l'électrophorèse en champ pulsé (PFGE). L'étude a porté sur les 58 souches de *Vibrio*.

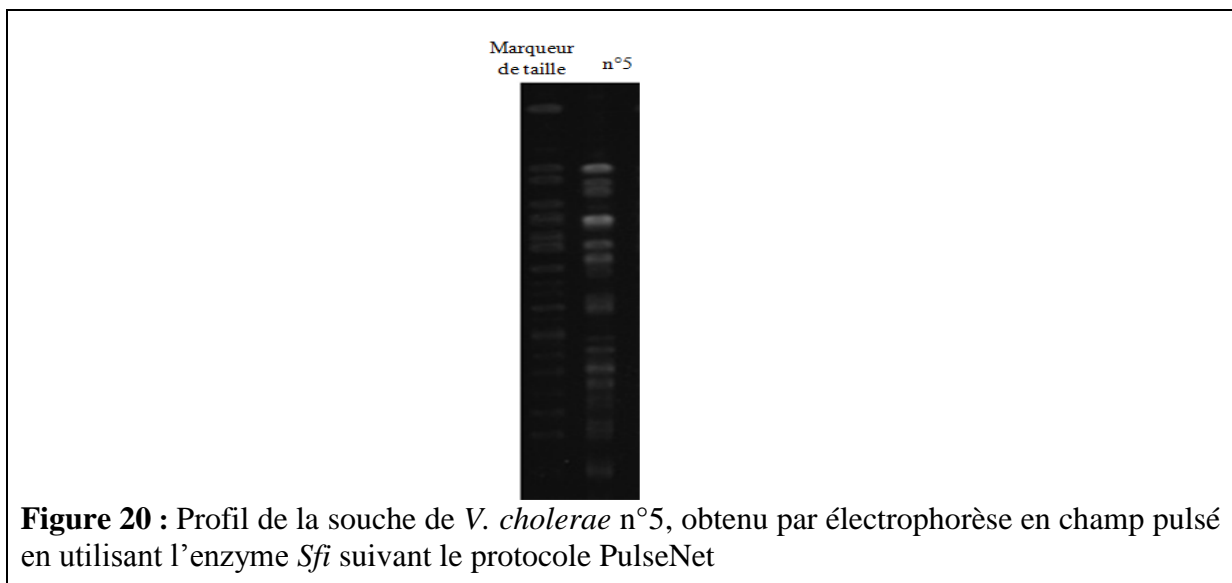
Dans un premier temps, nous avons testé les deux enzymes *Sfi* et *NotI* utilisées pour la restriction de l'ADN des *Vibrio* (Cameron *et al.*, 1994 ; Singh *et al.*, 2001) (avec et sans utilisation de la thiourée dans le bain de migration). Le résultat obtenu montre que l'enzyme *NotI* avec l'utilisation de la thiourée est préférable pour étudier les souches (**figure 19**).

Au cours de cette étude, plusieurs souches de *Vibrio* isolées des trois stations d'épuration se sont avérées non typables par l'électrophorèse en champ pulsé (par le protocole BioRad utilisé dans le cadre de notre étude): 5 souches isolées au niveau de la station de Ben Sergao et 12 souches isolées au niveau de la station de L'Mzar (**tableau X**). Les profils de ces souches ne montraient que des traces de bandes (smear) malgré les changements des différents paramètres de la technique et l'utilisation de thiourée (avec une concentration finale de 50  $\mu$ M, ajouté au tampon de migration).

L'étude de certaines souches (notamment la souche n°5), par le protocole PulseNet a donné des profils de restriction (**figure 20**).



**Figure 19** : Profils de certaines souches de *Vibrio*, obtenus par électrophorèse en champ pulsé en utilisant l'enzyme *Sfi* (avec (b) et sans thiourée (a)) et l'enzyme *NotI* (avec(d) et sans thiourée(c))



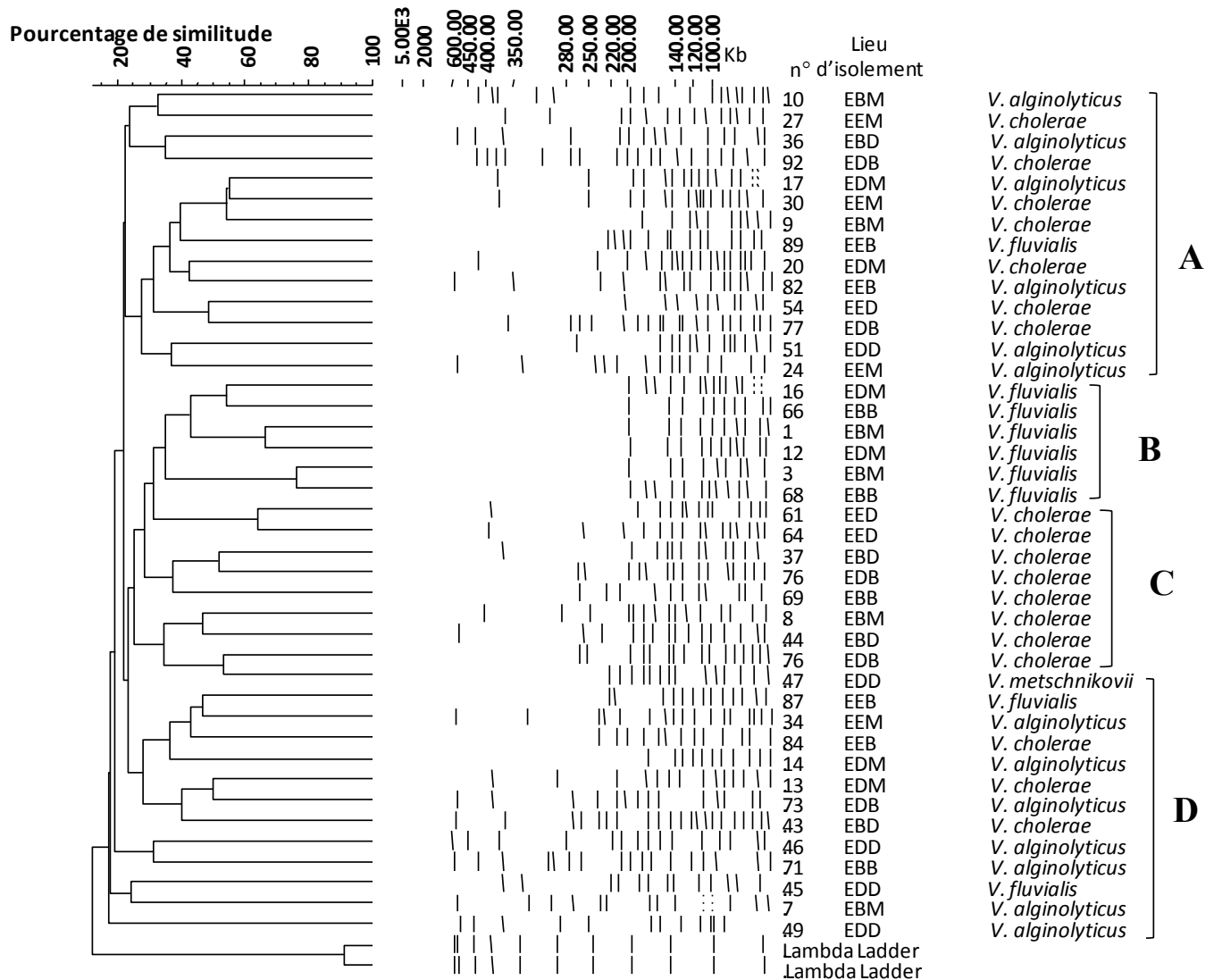
**Figure 20** : Profil de la souche de *V. cholerae* n°5, obtenu par électrophorèse en champ pulsé en utilisant l'enzyme *Sfi* suivant le protocole PulseNet

**Tableau X** : Souches de *Vibrio* non typées par l'électrophorèse en champ pulsé (EB : Eau usée brute, ED : Eau usée décantée, EE : Eau usée épurée).

	Type d'eau usée	Nombre (et numéro des souches) de <i>Vibrio</i> non typées
Station d'épuration de L'Mzar	EB	4 (2, 4, 5, 6)
	ED	4 (11, 15, 18, 19)
	EE	4 (21, 22, 23, 25)
Station d'épuration de Ben Sergao	EB	1 (90)
	ED	2 (78, 93)
	EE	2(88, 91)

Chaque profil électrophorétique compte de 10 à 20 bandes. L'analyse de la variabilité des souches de *Vibrio* isolées des différents types d'eaux usées des trois STEPs montre que toutes les souches étudiées présentent des profils de pulsotypie différents. Les résultats des profils d'ADN obtenus après digestion par l'enzyme de restriction *NotI* des différentes souches typées sont présentés dans le dendrogramme de la **figure 21**, qui représente l'arbre phylogénétique des souches de *Vibrio* isolées des eaux usées à différents points de prélèvement (eau brute, décantée et épurée), illustrant ainsi les liens de clonalité entre les différentes souches étudiées.

L'analyse du dendrogramme (figure 21) a montré que les 41 souches typées de *Vibrio* ont été classées dans 4 groupes différents. Le premier groupe (A) contient 14 souches de *Vibrio* (6 de *V. alginolyticus*, 7 de *V. cholerae*, 1 de *V. fluvialis*), le second groupe (B) contient 6 souches de *V. fluvialis*, le troisième groupe (C) contient 8 souches de *V. cholerae* le dernier groupe (D) comprend 13 souches de *Vibrio* (7 de *V. alginolyticus*, 3 de *V. cholerae*, 2 de *V. fluvialis* et la souche de *V. metschnikovii*).



**Figure 21** : Dendrogramme des profils d'ADN obtenus par électrophorèse en champ pulsé, indiquant la similarité des profils des souches de *Vibrio* (réparties en 4 groupes : A, B, C et D) prélevées des eaux usées des stations d'épuration de la Wilaya d'Agadir.

## II. Etude des souches de *Vibrio* par spectrométrie de masse MALDI-TOF

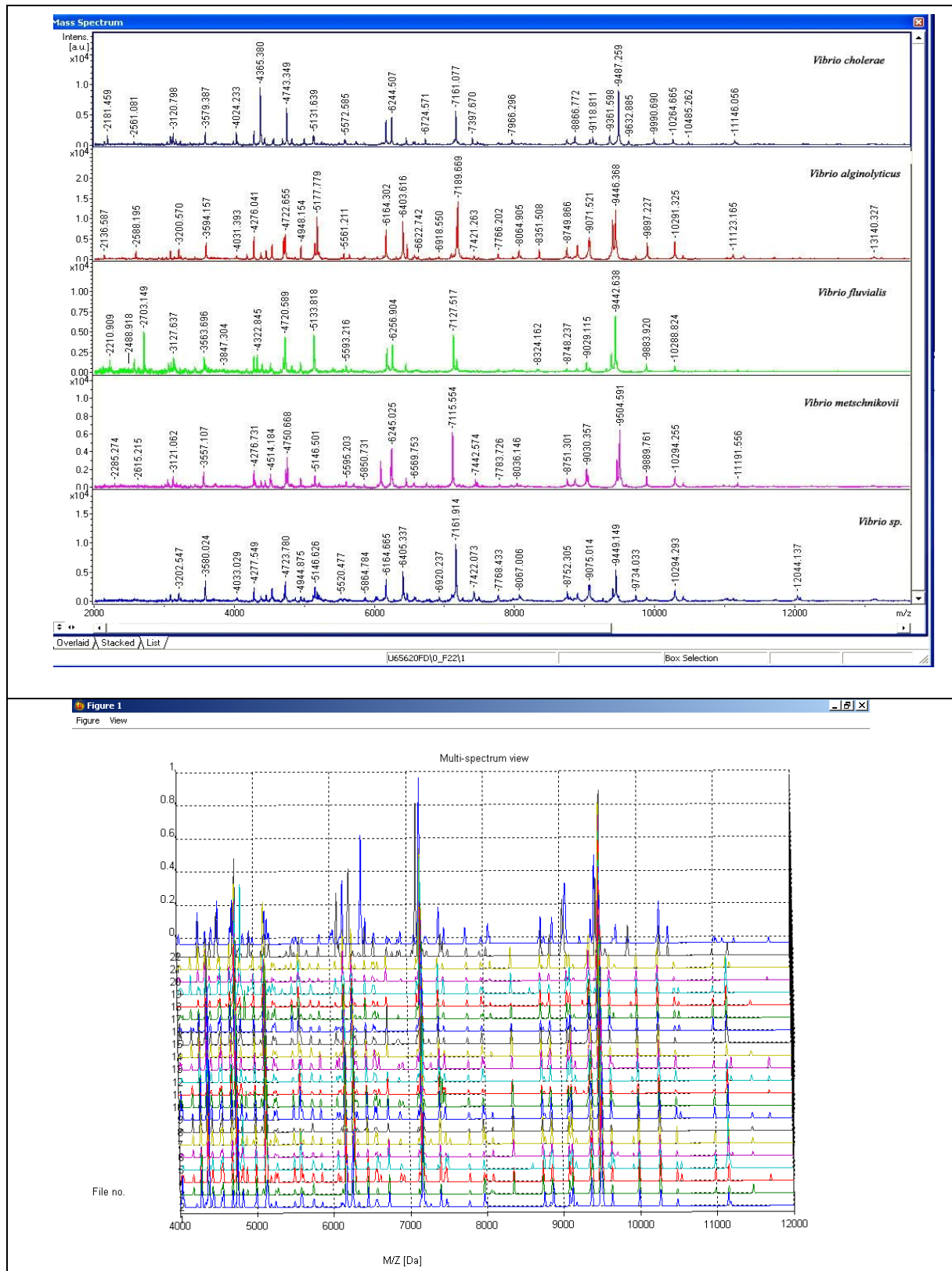
Pour l'identification, l'analyse et la classification des spectres, BioTyper™ 2 offre trois approches différentes : MSP (Main Spectra Projection) qui retient tous les spectres avec un bruit de fond égal à 0.1%, PCA (Principal Component Analysis) utilisé pour la classification des bactéries soit en dendrogrammes, soit en deux ou 3 dimensions et qui retient les 70 pics majoritaires avec un bruit de fond égal à 1% et CCI (Component Correlation Index) qui est une méthode statistique pour l'analyse des relations entre les spectres. Pour la séparation de microorganismes très proches, il est recommandé d'essayer tous les outils d'analyse.

La robustesse de la méthode MALDI TOF (la reproductibilité, la répétabilité, l'effet de la congélation et l'effet des conditions de culture) a été testée (Moussaoui, 2007).

La **figure 22** représente les spectres de masse MALDI TOF pour certaines souches de *Vibrio* isolées des stations d'épurations. Des paramètres inclus dans le logiciel BioTyper™ 2 sont définis par défaut : à chaque pic donné est attribuée une valeur arbitraire de 1, les autres pics auront une valeur correspondante relative par rapport au maximum de 1, la plus petite valeur significative sera de 0.01. Les dépôts triplés des souches de *Vibrio* (sous les mêmes conditions de culture) acquis par SM MALDI TOF montrent que les pics sélectionnés arbitrairement pour chaque souche sont très similaires ce qui montre la répétabilité de la technique, de même la reproductibilité de l'analyse des extraits protéiques est bonne (il y a une constance des pics majoritaires).

Chaque souche de *Vibrio* présente son propre spectre de masse ce qui constitue une empreinte spectrale utilisée pour l'identification des souches. Les spectres de masse sont composés typiquement de 20 à 25 pics qui peuvent servir comme biomarqueurs pour la caractérisation et le groupement des souches. Les spectres de la **figure 22** montrent plusieurs similarités inter-espèces et des biomarqueurs spécifiques à chaque espèce. Sous les conditions de l'analyse (culture sur milieu solide, matrice 50:50 acétonitrile-eau, 2.5% TFA comme solvant), certains pics ayant les mêmes masse sur charge ( $m/z$ ) : 3120, 3500, 4270, 5100, 5500, 7100, 8700, 9000, 9400 et 10200 sont communs à tous les spectres des souches de *V. cholerae*, *V. fluvialis*, *V. alginolyticus*, et *V. metschnikovii*, qui peuvent constituer des biomarqueurs pour regrouper ces espèces, il faut aussi noter que les pics présentent des intensités de l'ordre de  $10^4$  (unité arbitraire) et l'intensité de chaque pic est relativement différente pour chaque espèce





**Figure 22 :** Spectres de masse MALDI TOF représentant les souches de *Vibrio* prélevées des eaux usées des stations d'épurations de la Wilaya d'Agadir.

par exemple : le pic ayant un rapport m/z : 7100 Da a une intensité de  $1,5 \cdot 10^4$  unité arbitraire pour *V. alginolyticus* mais avec une intensité de  $0,5 \cdot 10^4$  unité arbitraire pour *V. cholerae*.

## II.1. Identification des souches de *Vibrio* par MALDI-TOF

BioTyper™ 2 effectue l'identification sur l'ensemble des pics compris entre 3000 et 15000Da en intégrant tous les pics dont les aires varient de 1 à 1000.

### II.1.1. Extraction protéique

Les résultats d'identification des souches de *V. cholerae* et *V. fluvialis*. Alors que certains pics sont spécifiques pour chaque espèce par ex. m/z : 2700 Da est spécifique pour *V. fluvialis*, 7960 Da de *Vibrio* isolées des trois stations d'épuration, en se basant sur les recherches dans la banque de données du logiciel Biotyper™ (Bruker) sont comme suit :

- Toutes les souches identifiées *V. cholerae* par le système Vitek 2® sont identifiées *V. albensis* par SM MALDI-TOF.
- Toutes les souches identifiées *V. alginolyticus* par Vitek 2® sont identifiées *V. alginolyticus* par SM MALDI-TOF.
- Sur les 9 souches de *V. fluvialis* identifiées par Vitek 2®, 4 sont identifiées par la spectrométrie de masse MALDI-TOF comme des *V. furnissii*, les 5 autres sont identifiées comme *V. fluvialis*.

### II.1.2. Technique de dépôt direct «smear»

Cette technique présente un avantage en termes de rapidité d'analyse et d'utilisation de consommable. Nous l'avons donc testé sur les souches de *Vibrio* isolées des trois stations d'épuration de la Wilaya d'Agadir en parallèle avec la technique d'extraction protéique en comparant les scores d'identification (**tableau XI**).

La technique de dépôt direct montre sa fiabilité et sa rapidité par rapport à l'extraction protéique. Alors que cette dernière demande 45 minutes de travail pour 24 échantillons en double dépôt, la technique de Smear ne demande que 20 minutes.

Aussi bien les pics que leur intensité relative sont comparés et repris dans un calcul de corrélation. Le score est le résultat de ce calcul. Si le logarithme de ce [log (score) maximal

3] est plus grand que 2, l'identification se fait au niveau de l'espèce. Si la valeur se situe entre 1,7 et 2, l'identification ne va pas plus loin que le genre. Des valeurs inférieures à 1,7 ne permettent pas une identification.

Gamme de score	Description	Symboles	Couleur
2.300 ... 3.000	Identification à l'espèce hautement probable	(+++)	Vert
1.900 ... 2.299	Identification au genre sûre, identification à l'espèce probable	(++)	Vert
1.700 ... 1.899	Probable identification au genre	(+)	Jaune
0.000 ... 1.699	Sans identification fiable	(-)	Rouge

Sachant que la banque de données du logiciel ne comprend pas l'espèce *V. cholerae*, nous avons fixé pour objectif de constituer une première banque de données comprenant 3 souches de *Vibrio* représentatives des espèces isolées des stations d'épuration (1 souche de *V. cholerae*, 1 souche de *V. fluvialis* et une souche de *V. alginolyticus*) pour l'utiliser ensuite à l'identification d'autres souches, indépendantes des premières. Les capacités d'identification ont été sollicitées sur la considération des 10 ou 100 pics les plus importants. Le **tableau XII** montre quelques résultats obtenus. Les résultats ont montré que le spectre consensus d'une souche bactérienne sélectionné par l'ACP, corrèle bien avec ses propres spectres individuels de cette même souche, indiquant ainsi la reproductibilité de l'expérience et valide la base de données.

**Tableau XI :** Scores de fiabilité d'identification de certaines souches de *Vibrio* par la technique d'extraction protéiques et la technique de dépôt direct

N° de l'isolat et nom de l'espèce identifiée	Score smear	Score extraction protéique
<b>5</b> : <i>V. cholerae</i>	2.093	2.053
<b>6</b> : <i>V. cholerae</i>	2.053	2.001
<b>8</b> : <i>V. cholerae</i>	2.351	2.436
<b>9</b> : <i>V. cholerae</i>	2.076	1.977
<b>10</b> : <i>V. alginolyticus</i>	2.122	1.514
<b>11</b> : <i>V. cholerae</i>	2.083	2.321
<b>13</b> : <i>V. cholerae</i>	2.331	2.273
<b>14</b> : <i>V. alginolyticus</i>	1.989	2.09

**Tableau XII:** Identification des souches de *Vibrio* par le logiciel BioTyper™ 2, avec prise en considération soit de 10 ou 100 pics les plus intenses. Les valeurs d'identification en terme de pourcentage de certitude sont données pour les premiers et le second choix.

N° de la souche	Espèce identifié par Vitek2	Résultats d'identification : en utilisant la banque de données de Biotyper		Résultats d'identification : en utilisant les spectres consensus
		10 pics	100 pics	100 pics
<b>8</b>	<i>V. cholerae</i>	<i>V. albensis</i>	<i>V. albensis</i>	<i>V. cholerae</i>
<b>37</b>	<i>V. cholerae</i>	<i>V. albensis</i>	<i>V. albensis</i>	<i>V. cholerae</i>
<b>49</b>	<i>V. alginolyticus</i>	<i>V. alginolyticus</i>	<i>V. alginolyticus</i>	<i>V. alginolyticus</i>
<b>71</b>	<i>V. alginolyticus</i>	<i>V. alginolyticus</i>	<i>V. alginolyticus</i>	<i>V. alginolyticus</i>
<b>16</b>	<i>V. fluvialis</i>	<i>V. furnissii</i>	<i>V. fluvialis</i>	<i>V. fluvialis</i>
<b>66</b>	<i>V. fluvialis</i>	<i>V. fluvialis</i>	<i>V. fluvialis</i>	<i>V. fluvialis</i>

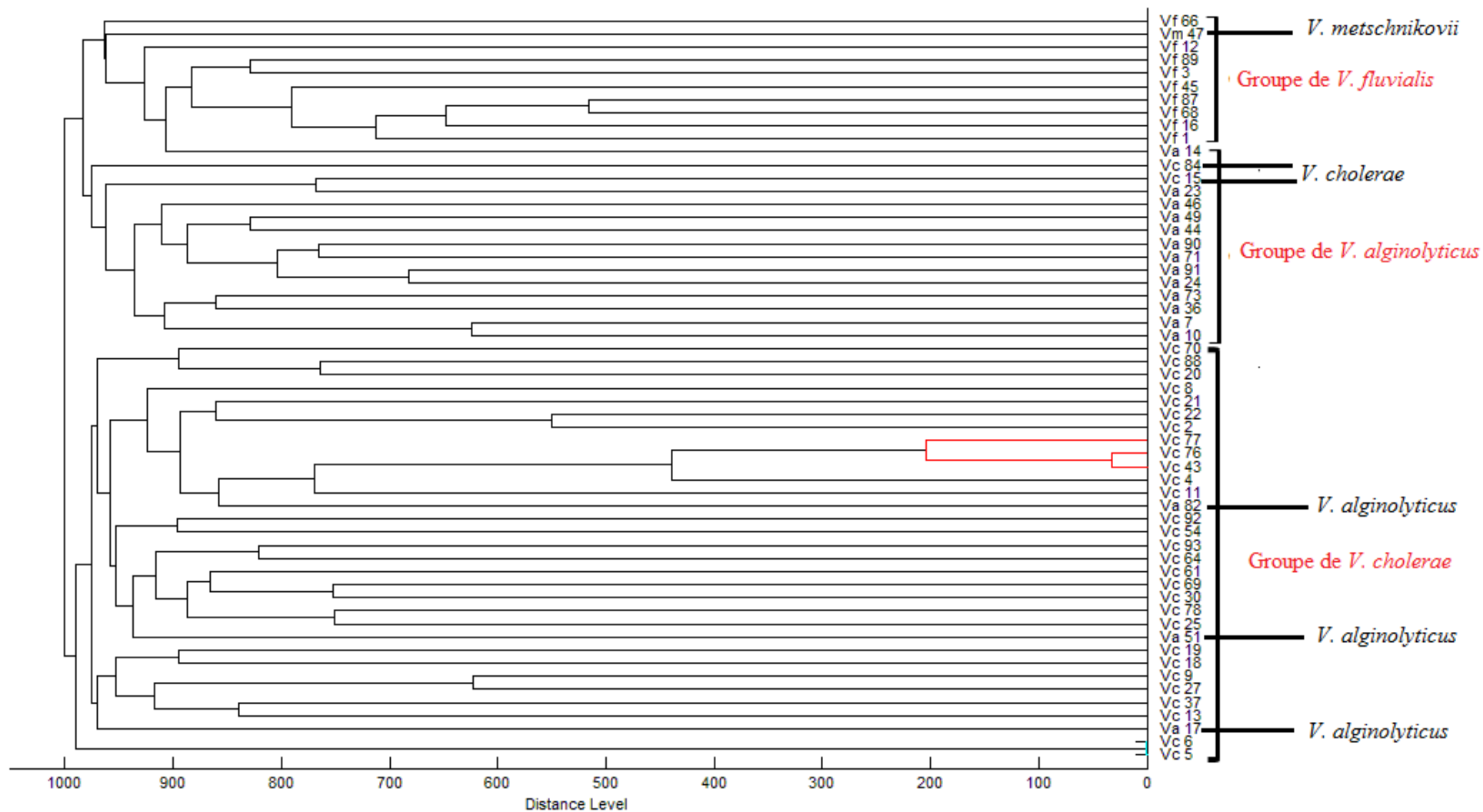
## II.2. Classification des souches de *Vibrio* par MALDI-TOF

Pour la classification, le clustering et la génération de dendrogrammes, BioTyper™ 2.0 offre une variété de fonctionnalités. La construction des dendrogrammes est basée sur les scores de similarité. De plus, une analyse multivariée basée sur l'analyse en composantes principales est possible. Une variété d'algorithmes et de visualisations de classification est accessible en utilisant le calcul de l'indice de corrélation des principaux composants.

Nous avons établi des dendrogrammes (**annexe 11**) pour les souches isolées dans chaque station d'épuration (L'Mzar, Drarga et Ben Sergao). Le résultat de cette étude montre que les souches isolées au niveau de chaque station d'épuration se distinguent les unes des autres, à part les souches 5 et 6 isolées au niveau de la station L'Mzar et les souches 76 et 77 isolées au niveau de la station de Ben Sergao qui montrent une certaine relation clonale.

Enfin et afin de connaître la position des espèces de *Vibrio* les unes par rapport aux autres, nous avons établi un dendrogramme qui regroupe les différentes espèces de *Vibrio* isolées des trois stations d'épuration. Elles sont représentées dans la **figure 23**, les résultats montrent que :

- les souches d'une même espèce sont regroupées au sein d'un même cluster. Mais à l'intérieur d'une même grappe il y a une grande hétérogénéité des souches. La technique SM MALDI TOF permet donc une identification taxonomique au niveau de l'espèce.
- les *V. alginolyticus* sont avec les *V. fluvialis* dans le même cluster
- on retrouve 3 souches de *V. alginolyticus* (n°: 17, 51 et 82) dans le cluster des *V. cholerae*. Et deux souches de *V. cholerae* (15 et 84) sont dans le cluster *V. alginolyticus*.
- les *V. cholerae* (n°: 43, 76 et 77) montrent un grand taux de similarité de même pour les souches 5 et 6.



**Figure 23 :** Dendrogramme de classification des souches de *Vibrio* prélevées des eaux usées des stations d'épuration de la Wilaya d'Agadir (L'Mzar, Ben Sergao et Drarga).

### III. Discussion

L'électrophorèse en champ pulsé (ECP) a pris une place importante dans les techniques d'étude des génomes (Safa *et al.*, 2005). Ces méthodes cartographiques ont bénéficié de l'utilisation d'enzymes à sites de coupures rares. L'utilisation d'enzymes de restriction à site de coupure rare, permet la segmentation des chromosomes en de très grands fragments que l'on peut réordonner (en utilisant des marqueurs que l'on peut localiser sur des cartes cytogénétiques). Ces cartes rejoignent les distances couvertes par les études génétiques c'est à dire plusieurs milliers de Kilobases. En 1997, Filetici et ses collègues ont trouvé que l'électrophorèse en champ pulsé est une méthode très discriminante pour distinguer les souches épidémiologiquement liées des souches non-liées par rapport au biotypage des *V. cholerae* non-O1 lorsque les enzymes *NotI* et *Sfi* sont utilisées et ils ont suggéré d'étendre la technique à un grand nombre de souches de *V. cholerae* environnementales afin de disposer de plus d'informations sur la technique.

Les chromosomes bactériens peuvent s'observer sous différentes formes lors d'expériences d'électrophorèse en champ pulsé et tous n'ont pas une forme circulaire (Krawiec et Riley, 1990; Lezhava *et al.*, 1995). Le génome de plusieurs espèces du genre *Vibrio* (*V. anguillarum*, *V. cholerae*, *V. fluvialis*, *V. mimicus*, *V. parahaemolyticus*, *V. vulnificus*, *V. alginolyticus*, *V. metschnikovii*...) est constitué de deux chromosomes circulaires et d'une taille inégale (Tagomori *et al.*, 2002; Okada *et al.*, 2005). Le chromosome I (3 Mb) porte les gènes des fonctions cellulaires essentielles (réplication, transcription, synthèse des protéines). Le chromosome II (de 1,1 à 1,9 Mb) porte des gènes permettant aux bactéries de s'adapter à leur environnement (gènes de virulence, gènes de transport, gènes des protéines ribosomales). Sous forme circulaire, le chromosome est retenu dans les puits du gel d'électrophorèse (Schwartz et Cantor, 1984). Dans nos expériences, nous avons observé qu'une grande quantité d'ADN est retenue dans les puits (**figure 19 d**).

L'objectif principal de l'électrophorèse en champ pulsé était de montrer les relations génétiques pouvant exister entre les différentes souches de *Vibrio* des eaux usées brutes et épurées des trois stations d'épuration. Chaque souche de *Vibrio* isolée a présenté un profil génomique propre (**figure 19**). L'analyse numérique des différentes bandes obtenues selon leurs poids moléculaire montre que le pourcentage de similitude le plus grand était de 75% (2

souches de *V. fluvialis*: n° 3 (isolée de la station de L'Mzar) et n°68 (isolée de la station de Ben Sergao).

Le résultat de l'ECP confirme l'origine non clonale de nos souches puisque le pourcentage d'homologie est nettement inférieur à 80%. Ceci prouve que les vibriions présentent une grande diversité génétique. Cette diversité peut provenir des différentes possibilités de transfert de gènes phagiques ou plasmidiques. La variabilité génétique de notre collection de souches de *Vibrio* est en accord avec la littérature, concernant les souches collectées de l'environnement (Bhanumathi *et al.*, 2003).

Plusieurs souches de *Vibrio* de l'étude se sont avérées non typables par l'électrophorèse en champ pulsé en utilisant le protocole préconisé par la fabricant BioRad (18 souches). Cette notion a été déjà rapportée par certains auteurs qui ont échoué à typer par champ pulsé des souches, phénomène probablement dû à une mauvaise dégradation de l'ADN durant le processus (Wong *et al.*, 2004) ou à sa méthylation (Xydas *et al.*, 1996).

Des travaux antérieurs ont étudié différents facteurs influençant les résultats de l'électrophorèse en champ pulsé, incluant la préparation des plugs, la lyse des cellules, la digestion enzymatique (Mulvey *et al.*, 2001; Murchan *et al.*, 2003; Zhang *et al.*, 2007), ainsi que les paramètres électrophorétiques à savoir le temps total de migration, influençant la distribution des fragments de restriction dans le gel et donc influence le pouvoir discriminatoire de la technique.

La technique dite Matrix Assisted Laser Desorption Ionisation Time Of Flight (MALDI-TOF) est une technique en plein essor mise au point au début des années 2000. La spectrométrie de masse MALDI TOF a été utilisée pour l'étude et surtout pour l'identification de plusieurs microorganismes: *Escherichia sp.* (Hollande *et al.*, 1996), *Campylobacter sp.* (Demirev *et al.*, 2001), *Clostridium sp.* (Grosse-Herrenthey *et al.*, 2008), *Salmonella sp.* (Leuschner *et al.*, 2004), *Aeromonas sp.* (Donohue *et al.*, 2006), aux levures (Stevenson *et al.*, 2010), *Vibrio parahaemolyticus* (Hazen Tracy *et al.*, 2009), en parasitologie (Papadopoulos *et al.*, 2004). La spectrométrie de masse possède de nombreuses qualités dont sa spécificité, sa grande sensibilité et la grande variété de ses applications. Le principe de base de toutes les techniques de spectrométrie de masse est l'analyse qualitative et quantitative d'un mélange complexe en séparant les molécules (préalablement ionisées) en fonction de leur rapport masse/charge (m/z). Les « signatures » moléculaires obtenues peuvent être utilisées pour l'identification



rapide des bactéries. La qualité de l'identification des souches bactériennes est fonction de la richesse de la banque de spectres enregistrés qui est mise à jour régulièrement par le fournisseur. Les spectres de la base de données sont des spectres moyens (appelés aussi spectres consensus) obtenu après plusieurs analyses et sont caractéristiques de l'espèce. Ils établissent une pondération sur la présence de certains peptides pouvant être considérés comme caractéristiques de l'espèce (Claydon *et al.*, 1996).

Les spectres de masse établis par la technique de dépôt direct 'Smear' et par la technique d'extraction protéique de la souche sont souvent riches en termes de pics. Par rapport à l'extraction protéique la technique de dépôt direct est performante, précise et plus rapide (Eigner, *et al.*, 2008). Le temps d'apprentissage du dépôt direct est relativement court pour déterminer empiriquement le ratio dépôt-matrice afin d'obtenir un spectre de masse lisible et interprétable. Pour l'identification de certains micro-organismes (mycobactéries, levures, certaines bactéries à Gram positif) et le typage des souches, l'extraction des protéines est recommandée. Cette extraction permet de mieux dissocier les microorganismes et d'obtenir un spectre plus riche (Gravet *et al.*, 2010). Cependant, le temps technique est plus long (10 à 15 minutes par extrait) par comparaison au dépôt direct (moins d'une minute par dépôt).

Selon des études antérieures, les résultats d'identification obtenus avec la spectrométrie de masse (95 % - 97,4 % d'identifications correctes) sont comparables, voir meilleurs, à ceux des systèmes automatisés utilisant des méthodes conventionnelles (75,2 % - 92,6 %) (Courcol, 2009). Cependant plusieurs paramètres qui pourraient influencer la qualité de l'identification bactérienne ont été évalués, notamment l'influence de certains milieux de culture, le temps de culture, et le temps de conservation des boîtes de culture (Moussaoui *et al.*, 2009). Les résultats antérieurs ont montré que quelque soit le milieu de culture, ils n'ont pas fait varier les scores de fiabilité d'identification des bactéries, le temps de culture cependant doit être minimal (colonies suffisamment développées), la conservation à 4°C est préférable (ralentissement de la croissance bactérienne et le vieillissement des milieux), alors que le temps de conservation (de 54 heures) n'as pas influencé la qualité d'identification.

En se basant sur la banque de données de BioTyper 2, les résultats d'identification des souches *V. fluvialis* semblent avoir été compromis par les similitudes des spectres de *V. fluvialis* avec ceux de l'espèce *V. furnissii* (normalement *V. furnissii* est le biogroupe aérogène de *V. fluvialis*), de même l'absence des spectres de masse de *V. cholerae* au niveau de la banque de données a compromis son identification. *V. cholerae* a été identifiée par MALDI-TOF comme *V. albensis* (*V. cholerae* biovar *albensis*), or pour *V. cholerae* on connaît trois

biotypes: le biotype *cholerae*, agent du choléra classique, le biotype *albensis* (luminescent, n'a qu'un intérêt nomenclatural) et le biotype *eltor*, agent du choléra. Donc la qualité de l'identification est fonction de la richesse de la banque de spectres enregistrés.

Le typage des souches de *Vibrio* par la spectrométrie de masse MALDI-TOF en se basant sur les données spectrales a permis d'affirmer que le spectre de masse fournit suffisamment d'informations pour distinguer les différentes souches par rapport à la méthode de référence, le champ pulsé (Courcol, 2009). Le dendrogramme qui a été établi à partir du rapport m/z de chacune des espèces a permis de distinguer 3 groupes : groupe de *V. cholerae*, groupe de *V. fluvialis* et le groupe de *V. alginolyticus* dont les distances sont plus de 30% de l'échelle arbitraire appliquée et de nouvelles dichotomies apparaissent dans ces sous groupes (**figure 23**).

***CONCLUSION GÉNÉRALE  
ET PERSPECTIVES***

Ce travail de thèse qui entre dans le cadre de l'étude de la qualité microbiologique des eaux usées des stations d'épuration de la ville d'Agadir avait plusieurs objectifs.

Le premier était l'étude de l'évolution des différents paramètres de qualité physico-chimique et microbiologique au niveau des trois stations épuratoires de la ville (Ben Sergao, Drarga et L'Mzar). Les résultats démontrent que les eaux usées brutes des trois STEPs sont fortement chargées en bactéries en particulier pour les EB de la STEP L'Mzar qui sont de l'ordre de  $10^6$ UFC/100mL et de  $10^5$ UFC/100mL pour Ben Sergao et Drarga. Cependant le traitement de ces eaux a permis un abattement dépassant 99% pour la charge des coliformes fécaux, des entérocoques et des spores des bactéries sulfite-réductrices entre l'entrée et la sortie des stations d'épuration de la ville d'Agadir.

Le second objectif de notre étude était l'isolement, l'identification et l'étude de la résistance des souches de *Vibrio* dans les différents types d'eaux usées (brute, décantée et épurée), des trois STEPs. Les résultats d'isolement et d'identification des souches isolées a déterminé l'existence de quatre espèces de *Vibrio* parmi les 58 souches isolées des eaux usées : *V. cholerae* non-O1, *V. alginolyticus*, *V. fluvialis* et *V. metschnikovii*, avec une prédominance de l'espèce *V. cholerae* non-O1. L'étude des profils de résistance a montré que plus de cinquante pour cent des souches sont sensibles à tous les antibiotiques testés, 46,55% sont résistants à l'AMX ; 29,31% sont résistants à la TIC ; 22,41% sont résistants à la FOX ; 17,24% sont résistants à l'AMC et à la CF ; 13,79% sont résistants à la FOS ; 8,62% sont résistants au NAL et 6,89% sont résistants à la SXT.

Le troisième objectif étant de mettre en évidence la variabilité génétique entre les souches de *Vibrio* isolées des STEPs par deux techniques : électrophorèse en champ pulsé (ECP) et la spectrométrie de masse MALDI-TOF. L'analyse des profils de macrorestriction obtenus par ECP en utilisant l'enzyme de restriction *NotI* des souches de *Vibrio* a permis de mettre en évidence l'extrême diversité génétique des souches de *Vibrio* isolées des STEPs. Dans un deuxième temps, les souches de *Vibrio* isolées ont été étudiées par la spectrométrie de masse MALDI-TOF. Les profils spectraux obtenus en MALDI-TOF MS ont un intérêt taxonomique certain, avec des empreintes hautement reproductibles, si les cultures sont effectuées dans les mêmes conditions. Une identification rapide des souches a pu être effectuée directement à partir des cellules bactériennes entières ou après l'extraction protéique, fournissant une empreinte métabolique qui peut être comparée à une base de données de profils spectraux. Enfin une classification des souches a été faite par un dendrogramme établi à partir des scores de similarité des spectres de masse des souches de *Vibrio* a permis de différencier en trois

grands groupes : le groupe de *V. cholerae* non-O1, le groupe de *V. alginolyticus* et le groupe de *V. fluvialis*.

Au terme de cette étude, dans un contexte de ressources hydriques limitées, les eaux usées au Maroc présentent non seulement une nouvelle limitation de la ressource disponible mais surtout une atteinte à la santé des populations et à la qualité de l'environnement en général. L'utilisation des eaux usées épurées permet de réduire les prélèvements dans les aquifères et les risques de salinisation à proximité des côtes, et d'atténuer les impacts sur l'environnement grâce à la suppression ou à la réduction de l'élimination des eaux usées, ce qui permet de préserver la qualité de l'eau en aval. Toutefois, cette utilisation présente des risques biologiques et chimiques. Les premiers incluent l'exposition de l'homme, de l'animal ou de la plante à des virus, bactéries, protozoaires, et helminthes.

Les essais conduits en matière de valorisation des eaux usées épurées au niveau de la station d'épuration L'Mzar (les eaux usées urbaines et industrielles) sont encore limités comparés à aux essais ponctuels menés à Drarga (Young *et al.*, 2000 ; Dadi, 2010 ;) et à Ben Sergao (Mimouni *et al.*, 2005) où les eaux usées sont d'origine exclusivement domestiques. Des connaissances supplémentaires sont donc nécessaires pour éclairer les décisions publiques en matière de réglementations (traitements des eaux, irrigations, modes de suivis et de contrôle de la qualité des eaux, de l'efficacité des traitements et des risques de recontamination pendant le stockage ou le transport des eaux usées traitées). C'est pour cette raison qu'il faut :

- Ces premiers résultats devront être confirmés par des analyses de la qualité des eaux usées (physico-chimique, bactériologique et parasitologique) avant et après la filière de traitement.
- Faire des dénombrements des pathogènes notamment du genre *Vibrio* et *Salmonella* cités comme généralement présents dans les eaux usées, avant et après la filière de traitement.
- Caractériser dans un ou plusieurs contextes de réutilisation d'eaux usées, le devenir des pathogènes à la surface des végétaux (évaluer la qualité sanitaire des cultures irriguées) et dans le sol suite à un ou plusieurs apports d'eau usée recyclée ;
- Etudier des pathogènes isolés dans les eaux épurées destinées à l'irrigation.

Dans un contexte environnemental, dans le cadre de la préservation de la qualité de l'eau en aval (la plage Bouadis) de la station d'épuration où les eaux usées sont rejetées par l'intermédiaire de l'émissaire sous marin, il faut faire une étude d'impact de ces eaux sur la qualité microbiologique de la mer, sachant qu'il y a un risque de remontée des bactéries présentes dans les eaux usées en surface de la mer par le courant côtier upwelling (Mimouni, 2004).

# ***BIBLIOGRAPHIE***

- Abouelouafa M., H. El Halouani, M. Kharboua and A. Berrichi.** 2002. Caractérisation physico-chimique et bactériologique des eaux usées brutes de la ville d'Oujda: canal principal et Oued Bounaïm. Actes de l'Institut Agronomique et Vétérinaire Hassan II. Vol 22, N°3
- ADEME (Dossier documentaire).** 2001. Les Boues d'épuration municipale et leur utilisation en Agriculture. Réf. 3832.
- Agence de l'Environnement et de la Maîtrise de l'Energie (ADEME).** 1996. Equipements de tri et de conditionnement des matériaux recyclables. Collection connaître pour agir ADEME / Eco-Emballages ADEME Editions, mars 1996.
- Agence Française de Normalisation (AFNOR).** 2001. Eaux-méthodes d'essai. In : Recueil de normes françaises (6ème édition). La Défense, Paris.
- Ahmed A.M., S. Shinoda and T. Shimamoto.** 2005. A variant type of *Vibrio cholerae* SXT element in a multidrug-resistant strain of *Vibrio fluvialis*. *FEMS Microbiology Lett.* **242**:241-247.
- Ahsan C.R., S.C. Sanyal, A. Zaman, P.K. Neogy and M.A. Huq.** 1988. Immunobiological relationships between *Vibrio fluvialis* and *Vibrio cholerae* enterotoxins. *Immunol. Cell. Biol.* **3**: 251-252.
- Alexandre O., C. Boutin, P. Duchène, C. Lagrange, A. Lakel, A. Liénard and D. Orditz.** 1997. Filières d'épuration adaptées aux petites collectivités. Document technique FNDAE n°22. Ministère de l'Agriculture et de la Pêche.
- Alsina M. and A.R. Blanch.** 1994. A set of keys for biochemical identification environmental *Vibrio* species.). *J. Appl. Bacteriol.* **76**: 79-85.
- Aminot A., and M. Chaussepied.,** 1983. Manuel des analyses chimiques en milieu marin. Dans Aminot A., Chaussepied M. (ed), Paris.
- Anajjar E.M.** 1997. Contribution à l'étude de la qualité microbiologique des plages de la Wilaya d'Agadir et des eaux usées brutes et épurées de la station d'épuration de Ben Sergao. Mémoire de CEA Université Ibn Zohr, Faculté des Sciences d'Agadir. 45p.
- Angelakis A.N., M.H.F. Marecos Do Monte, L. Bontoux and T.Asano.** 1999. The status of wastewater reuse practice in the Mediterranean basin: need for guidelines. *Water. Res.* **33**: 2201-2217.
- Aucher P., G. Dugaz, F. Missonnier and N. Fortas,** 1998. A propos d'un cas d'infection autochtone à *Vibrio cholerae* non O1 et non O139. *Ann. Biol. Clin.* **56** :213-214.
- Audic J.M.** 1990. Evolution des technologies d'élimination des microorganismes. In: IFREMER – actes de colloques. **11**:133-148.
- Baffone W., A. Pianetti, F. Bruscolini, E. Barbieri and B. Citterio.** 2000. Occurrence and expression of virulence-related properties of *Vibrio* species isolated from widely consumed seafood products. *Int. J. Food Microbiol.* **54**: 9–18.
- Balebona M.C., M.J. Andreu, M.A. Bordas, I. Zorrilla, M.A. Moriñigo and J.J. Borrego.** 1998. Pathogenicity of *Vibrio alginolyticus* from cultured gilt-head sea bream (*Sparus aurata*, L.). *Appl. Environ. Microbiol.* **64**:4269–4275.
- Barbierji E., L. Falzano, C. Fiorentini, A. Pianetti, W. Baffone, A. Fabbri, P. Matarrese, A. Casiere, M. Katouli, I. Kühni, R. Möllby, F. Bruscolini and G. Donelli.** . 1999. Occurrence, diversity, and pathogenicity of halophilic *Vibrio* spp. and non-O1 *Vibrio cholerae*

from estuarine waters along the Italian Adriatic coast. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**:2748–2753.

**Bauer A. W., W. M. Kirby, J. C. Sherris, and M. Turck.** 1966. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. *Am. J. Clin. Pathol.* **45**:493–496.

**Baumann P., L. Baumann and M. Mandel.** 1971. Taxonomy of marine bacteria: the genus *Beneckea*. *J. Bacteriol.* **107**: 268-294.

**Beaber J.W., V. Burrus, B. Hochhut and M. K Waldor.** 2002. Comparison of SXT and R391 two conjugative integrating elements: definition of a genetic backbone for the mobilization of resistance determinants. *Cell. Mol. Life Sci.* **59**:2065-2070.

**Ben Kahla-Nakbi A., A. Besbes, K. Chaieb, M.Rouabhia, and A. Bakhrouf.** 2007. Survival of *Vibrio alginolyticus* in seawater and retention of virulence of its starved cells. *Mar. Environ. Res.* **64**:469-478.

**Ben kahla-Nakbi A., K. Chaieb, A. Besbes, T. Zmantar and A. Bakhrouf.** 2006. Virulence and enterobacterial repetitive intergenic consensus PCR of *Vibrio alginolyticus* strains isolated from Tunisian cultured gilthead sea bream and sea bass outbreaks. *Vet. Microbiol.* **117**: 321–327.

**Benyakhlef S.** 1998. Impact de certaines pratiques culturales (irrigation par les eaux usées épurées et la fumigation) sur la microflore du sol. *Thèse Doct. Es Sci.* , Université Ibn Zohr Faculté des Sciences d'Agadir. 161p.

**Bhanumathi R., F. Sabeena, S. Renjini Isac, B.N. Shukla, and D.V. Singh.** 2003. Molecular Characterization of *Vibrio cholerae* O139 Bengal Isolated from Water and the Aquatic Plant *Eichhornia crassipes* in the River Ganga, Varanasi, India. *Appl. Environ. Microbiol.* **69**:2389-2394.

**Billaut C.** 1989. Le Rôle Epurateur du Sol, tome 1 : le sol, l'eau et les polluants - Etude de synthèse, A.F.E.E., Paris.

**Bitton, G.** 1999. Wastewater microbiology. 2e éd. John Wiley & Sons, NY. 578 p.

**Bize J., N. Nivault, B. Pivette, V. Riou, V. Schmitt.** 1989. Epuration des eaux usées par infiltration-percolation : techniques et expériences. BURGEAP. Paris, France.

**Bonhomme A.J.C.** 2003. Les bactéries du genre *Vibrio* et la santé publique vétérinaire. *Thèse Doct. Vétérinaire.* Ecole Nationale Vétérinaire d'Alfort, Faculté de Médecine de Créteil. 113p.

**Bou Saab H., Nassif N., El Samrani A.G., Daoud R., Medawar S., and Ouaini N.** 2007. Suivi de la qualité bactériologique des eaux de surface (rivière Nahr Ibrahim, Liban). *J. Water Sci.* **20**: 341-352.

**Bouchriti N., A. Hamouda, H. Karib, B. Oumokhtar B. and I. Yaakoubi.** 2000. Appréciation de la qualité bactériologique des huîtres *Crassostrea gigas* commercialisées à Rabat. *Animalis.* **2** : 26-35.

**Bourgeois C.M., J.F Mescle and J. Zucca.** 1990. Microbiologie alimentaire. Aspect microbiologique de la sécurité et de la qualité alimentaires. 2e éd., Tome 1, Paris: Lavoisier, 422 p.

**Brissaud F., F. Lefevre, C. Joseph, Z. Alamy and A. Landreau.** 1989. Waste Water, Mdtration-percolation for aquifer recharge or Water reuse, in: *Groundwater Management : Quantity and Quality* (Proceedings of the Benidorm Symposium, October 1989) - LAHS Publ. **188**:443-456.



- Bulletin Officielle n°4558 du chaoual (5fevrier 1998).** Decret N°2-97-875 du 6 chaoual 1418 (4 fevrier 1998) relatif à l'utilisation des eaux usées.
- Cameron D. N., F.M. Khambaty, I.K. Wachsmuth, R.V. Tauxe and T.J. Barrett.** 1994 Molecular Characterization of *Vibrio cholerae* O1 strains by pulsed-field gel electrophoresis. *J. Clin. Microbiol.* **32**:1685-1690.
- Campanelli A., S. Sanchez-Politta, J.H. Saurat.** 2008. Cutaneous ulceration after an octopus bite: Infection due to *Vibrio alginolyticus*, an emerging pathogen. *Ann. Dermatol. Vénéreol.* **135**:225-227.
- Centre d'Expertise en Analyse Environnementale du Quebec (CEAEQ).** 2006. Recherche et dénombrement des entérocoques : méthode par filtration sur membrane, MA. 700 – Ent 1.0, Rév. 3, Ministère du Développement durable, de l'Environnement et des Parcs du Québec. 23p.
- Chakraborty S., G.B. Nair and S. Shinoda.** 1997. Pathogenic vibrios in the natural aquatic environment. *Rev. Environ. Health.* **12**:63-80.
- Charu S., M. Thungapathra and A. Ghosh.** 1998. Molecular Analysis of Non-O1, Non-O139 *Vibrio cholerae* Associated with an Unusual Upsurge in the Incidence of Cholera-Like Disease in Calcutta, India. *J. Clin. Microbiol.* . **36**:756-763.
- Clarke K.R. and M. Ainsworth.** 1993. A method of linking multivariate community structure to environmental variables. *Mar. Ecol.* **92**:205-219.
- Clausen EM, BL Green and W Litsky.** 1977. Fecal streptococci: indicators of pollution. Dans: Hoadley, AW et BJ Dutka, édit., Bacterial Indicators/Health hazards associated with water. *Am. Soc. Test. Mat. (ASTM).* **635**: 247-264.
- Claydon M.A., S.N. Davey, V. Edwards-Jones and D.B. Gordon.** 1996. The rapid identification of intact microorganisms by MALDI mass spectrometry. *Nat. Biotechnol.* **14**:1584-1586.
- Cohen N., H. Karib, J. Ait Saïd, L. Lemee, A. Guenole and M.L. Quilici.** 2007. Prévalence des vibrios potentiellement pathogènes dans les produits de la pêche commercialisés à Casablanca (Maroc). *Revue Méd. Vét.* **158** : 562-568.
- Conseil Supérieur de l'Eau et du Climat (C.S.E.C).** 1994. Réutilisation des eaux usées en agriculture, CSEC, Rabat, Maroc.
- Conseil supérieur de l'eau et du climat (C.S.E.C).** 2001. Economie de l'eau.
- Cooper K.L., C.K. Luey, M. Bird, J. Terajima, G.B. Nair, K.M. Kam, E. Arakawa, A. Safa, D.T. Cheung, C.P. Law, H. Watanabe, K. Kubota, B. Swaminathan and E.M. Ribot.** 2006. Development and validation of a PulseNet standardized Pulsed-Field Gel Electrophoresis Protocol for Subtyping of *Vibrio cholerae*. *Foodborne Pathog. Dis.* **3**: 51–58.
- Courcol R.** 2009. Quelles utilisations de la spectrométrie de masse de type MALDI-TOF en microbiologie médicale? *Revue Fr. Lab.* **416**: 61-64.
- Dadi E.M.** 2010. L'évaluation de la possibilité de réutiliser en agriculture l'effluent traité de la commune de Drarga. Centre universitaire de formation en environnement, Université de Sherbrooke, Québec, Canada.
- Dean A.J. and D.A. Bazylinski.** 1999. Genome Analysis of Several Marine, Magnetotactic Bacterial Strains by Pulsed-Field Gel Electrophoresis. *Curr. Microbiol.* **39**:219–225

- Demirev P. A., J. Ramirez and C. Fenselau.** 2001. Tandem mass spectrometry of intact proteins for characterization of biomarkers from bacillus cereus T spores. *Anal. Chemist.* **73**:5725-5731.
- Denis F., M.C. Poly, C. Martin, E. Bingen, R. Quentin.** 2007. Bactériologie Médicale: technique usuelles. *Elsevier Masson SAS.*
- Desmarchelier P.M.** 1997. Pathogenic *Vibrios*. In A.D. Hocking, G. Arnold, I. Jenson, K. Newton and P. Sutherland, eds. *Foodborne Microorganisms of Public Health Significance 5th Edition*, p 285 -312. North Sydney, Australian Institute of Food Science and Technology Inc.
- Dieckmann R., E. Strauch and T. Alter.** 2010. Rapid identification and characterization of *Vibrio* species using whole-cell MALDI-TOF mass spectrometry. *J. Appl. Microbiol.* **109**:199–211.
- Donohue M.J., A.W. Smallwood, S. Pfaller, M. Rodgers and J.A. Shoemaker.** 2006. The development of matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry-based method for the protein fingerprinting and identification of *Aeromonas* species using whole cells. *J. Microbiol. Meth.* **65**:380– 389.
- Dosso M., Coulibaly M. and A. Kadio.** 1998. Place des diarrheas bactériennes dans les pays en développement. Manuscrit n° PF02. Journée en hommage au Pr. A. Dodin.
- Duchène P. and C. Vanier.** 2002. Réflexion sur les paramètres de qualité exigés pour les rejets de stations d'épuration. *Ingénieries.* **29**:3-16.
- Dupray E., Baleux J.L. Bonnefont, C. Guichaoua, M. Pompepy and A. Derrien.** 1990. Apport en bactéries par les stations d'épuration. In: IFREMER- actes de colloque. **11**:81-88.
- Edwards P.** 1992. *Reuse of Human Wastes in Aquaculture: A Technical Review*. Washington, DC, UNDP-World Bank Water and Sanitation Program.
- Eigner U., A. Hendel, U. Wild, F. Wild, M. Holfelder and A. Fahr.** 2008. Rapid Identification of clinical bacterial isolates using the Matrix-Assisted Laser Desorption Ionisation Time of flight mass spectrometry in a clinical laboratory. ESCMID 18<sup>th</sup> Barcelona, Spain 19-22. P1964.
- El hachimi Y.** 1999. Etude bactériologique des eaux de baignade des plages d'Agadir et des eaux usées de la station d'épuration de Ben Sergao : évolution des germes indicateurs de contamination fécale et antibiorésistance. Mémoire de DESA Université Ibn Zohr, Faculté des Sciences d'Agadir. 55p.
- Elabed L.** 2003. Impact sur l'environnement de la réutilisation des eaux usées brutes. Séminaire sur les aspects sanitaires de la gestion et la réutilisation des eaux usées traitées. Rabat, Maroc 22-26 décembre 2003.
- Elmund G.K., M.J. Allen and E.W. Rice.** 1999. Comparison of *Escherichia coli*, total coliform and fecal coliform populations as indicators of wastewater treatment efficiency. *Water Environ. Res.* **71**: 332-339.
- Emmanuel E., K. Théléys, M. Mompont, J.M. Blanchard and Y. Perrodin.** 2004. Evaluation des dangers environnementaux liés au rejet des eaux usées urbaines dans la Baie de Port-au-Prince en Haïti Submitted: Livre « Eau et Environnement » du Réseau « Droit de l'Environnement » de l'Agence Universitaire de la francophonie (AUF). Port-au-Prince, 15 p.
- Emparanza -Knorr A. and F. Torella.** 1995. Microbiological performance and *Salmonella* dynamics in wastewater depuration pond system of southeastern Spain. *Water Sci. Technol.* **31**:239-248.

- Environment Protection Agency (E.P.A).** 1981. Process Design Manual Land Treatment of Municipal Waste Water – EPA Document PA - 62511-81-013, U.S.
- Falbo V., A. Carattoli, F. Tosini, C. Pezzella, A.M. Dionisi and I. Luzzi.** 1999. Antibiotic resistance conferred by a conjugative plasmid and a class 1 integron in *Vibrio cholerae* O1 El Tor strains isolated in Albania and Italy. *Antimicrob. Agents Chemother.* **43**: 693–696.
- Farrow J.A.E., J. Kruze, B.A. Phillips, A.J. Bramley and M.D. Collins.** 1984. Taxonomic studies of *S. bovis* and *S. equinus*: description of *S. alactolyticus* sp. no. and *S. saccharolyticus* sp. nov. *System. Appl. Microbiol.* **5**: 467-482.
- Fatta D., Z. Salem, M. Mountadar, O. Assobhei and M. Loizidou.** 2004. Urban wastewater treatment and reclamation for agricultural irrigation: the situation in Morocco and Palestine. *The Environmentalist.* **24**:227-236.
- Fenn J. B., M. Mann, C.K. Meng, S.F. Wong and C.M. Whitehouse.** 1989. Electrospray ionization for mass spectrometry of large molecules. *Sci.* **246**:64-71.
- Filetici E., L. Bonadonna, M. Ciccozzi, M.P. Anastasio, M. Fantasia and T. Shimada.** 1997. Phenotypic and Genotypic Biotyping of Environmental Strains of *Vibrio cholerae* Non-O1 Isolated in Italy. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**:4102–4106.
- Finch G.R. and Smith D.W.** 2003. Batch coagulation of a lagoon for fecal coliform reductions. *Water Res.* **20**:105-112.
- Fischer-le Saux M., D. Hervio-Heath, S. Loaec, R.R. Colwell and M. Pommepuy.** 2002. Detection of Cytotoxin-Hemolysin mRNA in Nonculturable Populations of Environmental and Clinical *Vibrio vulnificus* Strains in Artificial Seawater. *Appl. Environ. Microbiol.* **68**:5641-5646.
- Fotedar R.** 2000. Vector potential of houseflies (*Musca domestica*) in the transmission of *Vibrio cholerae* in India. *Acta Tropica.* **78**: 31-34.
- Fournier J.M. and M.L. Quilici.** 2002. Infections à vibrions non cholériques. *Encyclopédie Médico-Chirurgicale (Editions Scientifiques et Médicales Elsevier SAS, Paris, tous droits réservés), Maladies infectieuses.* 8-026-F-15, 7 p.
- Gay M.** 2004. Infection expérimentale chez *Crassostrea gigas* : étude de deux souches pathogènes apparentées à *Vibrio splendidus*. *Thèse Doct. Es. Sci.* Université de la Rochelle. P.179.
- Geldreich E.E. and B.A. Kenner.** 1969. Concepts of fecal streptococci in stream pollution. *J. Water Poll. Cont. Fed.* **41**:R336-R341.
- Gerba C.P. and G. Bitton.** 1984. Microbial pollutants: Their survival and transport pattern to groundwater, dans *Groundwater pollution microbiology.* G. Bitton et C.P. Gerba (dir. de pub.). *John Wiley & Sons*, New York, NY. p. 65-88.
- Gleeson, C. and N. Gray.** 1997. The coliform index and waterborne disease. E & FN Spon, 194 p.
- Gómez-León J., L. Villamil, M.L. Lemos, B. Novoa and A. Figueras.** 2005. Isolation of *Vibrio alginolyticus* and *Vibrio splendidus* from aquacultured carpet shell clam (*Ruditapes decussatus*) larvae associated with mass mortalities. *Appl. Environ. Microbiol.* **71**: 98–104.
- Gravet A., G. Camdessouens-Miehé, M. Gessier, A.-R. Peluso, B. Vogelsperger-Fuchs, C. Lohmann, F. Schmitt and J.-M. Delarbre.** 2010. Bilan de l'utilisation en routine de la spectrométrie de masse dans un laboratoire hospitalier de microbiologie. *Pathol. Biol.* doi:10.1016/j.patbio.2010.08.008.

- Grimont P.A.** 1984. Use of DNA reassociation in bacterial classification. *Can. J. Microbiol.* **34**:541-546.
- Grosse-Herrenthey A., T. Maier, F. Gessler, R. Schaumann, H. Böhnel, M. Kostrzewa and M. Krüger.** 2008. Challenging the problem of clostridial identification with matrix-assisted laser desorption and ionization–time-of-flight mass spectrometry (MALDI–TOF MS). *Anaerobe.* **14**:242– 249.
- Guessab M., J. Bize, J. Schwarzbrod, A. Maul, N. Nivault and L. Schwarzbrod.** 1993. Wastewater treatment by infiltration-percolation on sand: results in Ben Sergao, Morocco. *Water Sci. Technol.* **27**: 91-95.
- Guévart E., J. Solle, A. Mouangue, J. Noeske, A. Bitá, M.-C. Fonkoua and M. Ndayo Wouafo.** 2006. Évolution de la sensibilité de *Vibrio cholerae* 01 après utilisation prolongée d’antibiotiques en traitement et en prophylaxie au cours de l’épidémie de choléra de Douala (Cameroun) 2004. *Méd. Mal. Infect.* **36**:329–334.
- Halpern M., D. Raats, R. Lavion, S. Mittler.** 2006. Dependent population dynamics between Chironomids (non-biting midges) and *Vibrio cholerae*. *FEMS Microbiol. Ecol.* **55**: 98–104.
- Han J.H., J.H. Lee, Y.H. Choi, J.H. Park, T.J. Choi and I.S. Kong.** 2002 Purification, characterization and molecular cloning of *Vibrio fluvialis* hemolysin. *Biochim. Biophys. Acta.* **1599**: 106–114.
- Haut Commissariat au Plan (H.C.P),** Rabat, Maroc. 2006. Statistiques environnementales au Maroc. 108p.
- Hazen Tracy H.; J. Martinez Robert; C. Yanfeng, P.C. Lafon, N.M. Garrett, M.B. Parsons C.A. Bopp, M.C. Sullards and P.A. Sobecky.** 2009. Rapid Identification of *Vibrio parahaemolyticus* by Whole-Cell Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry. *Appl. Environ. Microbiol.* **75**: 6745-6756.
- Henze M., M.C.M. van Loosdrecht, G. Ekama and D. Brdjanovic.** 2008. Biological wastewater treatment: principles, modelling and design. *Technol Eng.* 511p.
- Holland R.D., J.G. Wilkes, F. Rafii, J.B. Sutherland, C.C. Persons and K.J. Voorhees.** 1996. Rapid identification of intact whole bacteria based on spectral patterns using matrix assisted laser desorption ionization with time of flight mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **10**:1227-1232.
- Howard-Jones N.** 1984. Robert Koch and the cholera *Vibrio*: a centenary. *BMJ.* **288**:379-381.
- Huq A., P A West, E B Small, M I Huq, and R R Colwell.** 1984. Influence of water temperature, salinity, and pH on survival and growth of toxigenic *Vibrio cholerae* serovar 01 associated with live copepods in laboratory microcosms. *Appl. Environ. Microbiol.* **48**: 420-424.
- Igbinosa E.O. and A.I. Okoh.** 2010. *Vibrio fluvialis*: An Unusual Enteric Pathogen of Increasing Public Health Concern. *Int. J. Environ. Res. Public Health.* **7**:3628-3643.
- Imzilin B.** 1990. Traitement des eaux usées par lagunage anaérobie et aérobie facultative à Marrakech: Etude bactériologique et quantitative et qualitative, antibiorésistance des bactéries d’intérêt sanitaire. Thèse de troisième cycle. Université Cadi Ayyad Faculté des Sciences de Marrakech. Maroc.

- Imzilen B. and L. Hassani.** 1994. Antimicrobial Susceptibility of Non-O1 *Vibrio cholerae* isolated from wastewater before and after treatment in stabilization ponds. *World J. Microbiol. Biotechnol.* **10**: 230-231.
- Institut Méditerranéen de l'Eau (IME).** 1987. Appréciation des risques sanitaires liés à la réutilisation des Eaux Usées, in : Recherche sur la mise au point d'un protocole d'appréhension des risques sanitaires liés à l'utilisation des Eaux Usées - Ministère de l'Environnement, p. 1-16.
- Institut National de Santé Publique du Québec (INSPQ).** 2009. Position du Comité sur les infections nosocomiales du Québec sur les risques associés à l'utilisation des robinets électroniques en milieux de soins. ISBN : 978-2-550-57495-8.
- Islam M.M., M.G. Kabir, A.F.M. Tariqul-Islam and. M. Abdur-Rakib.** 2004. Coagglutination: A rapid and sensitive assay method for detection of *Vibrio cholerae* O1 and O139 serogroups directly from stool specimens. *Pak. J. Biol. Sci.* **7**:1360-1364.
- Islam M.S.** 1990. Effect of various biophysicochemical conditions on toxigenicity of *Vibrio cholerae* O1 during survival with a green alga, *Rhizoclonium fontanum*, in an artificial aquatic environment. *Rev. Can. Microbiol.* **36**: 464-468.
- Iwanaga M, C. Toma, T. Miyazato, S. Insisiengmay, N. Nakasone and M. Ehara.** 2004. Antibiotic resistance conferred by a class I integron and SXT constin in *Vibrio cholerae* O1 strains isolated in Laos. *Antimicrob. Agents Chemother.* **48**: 2364-2369.
- Jemali A., Kefati A.** 2002. Réutilisation des eaux usées au Maroc. Forum sur la gestion de la demande en eau. 33p.
- Karas M., D. Bachmann, U. Bahr and Hillenkamp.** 1987. Matrix-assisted ultraviolet laser desorption of non-volatile compounds. *Int. J. Mass Spectrom. Ion Proc.* **78**: 53-68.
- Karas M., U. Bahr, A. Ingendoh and F. Hillenkamp.** 1989. Laser desorption ionization mass spectrometry of proteins of mass 100000 to 250000 Daltons. *Angew. Chem. Int.* **28**:760-761.
- Kita-Tsukamoto K., H. Oyaizu, K. Nanba and U. Simidu.** 1993. Phylogenetic relationships of marine bacteria, mainly members of the family *Vibrionaceae*, determined on the basis of 16S rRNA sequences. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **43**:8-19.
- Krawiec S. and M. Riley.** 1990. Organization of the bacterial chromosome. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **54**: 502-539.
- Kruse H., H. Sorum, FC. Tenover and Ø Olsvik.** 1995. A transferable multiple drug resistance plasmid from *Vibrio cholerae* O1. *Microbial Drug Resistance.* **1**: 203-210.
- Lay Jr.J.O.** 2001. MALDI-TOF mass spectrometry of bacteria. *Mass. Spectrom. Rev.* 172–194, 2001.
- Lay Jr.J.O.** 2002. MALDI-TOF mass spectrometry and bacterial taxonomy. *Trends In Anal. Chemist.* **19**:507-516.
- Lee J.V. and T.J. Donovan.** 1985. *Vibrio, Aeromonas and Plesiomonas*; p.13-33. In C.H. Collins and J.M. Grange (ed.), Isolation and identification of microorganisms of medical and veterinary importance. Academic Press Inc. Ltd., London.
- Lesne J., B. Baleux, A. Bousaid and L. Hassani.** 1991: Dynamics of non O1 *Vibrio cholerae* in experimental sewage stabilization ponds under arid Mediterranean climate. *Water Sci. Technol.* **22**: Part 2.

- Leuschner R.G.K., J. Beresford-Jones and C. Robinson.** 2004. Difference and consensus of whole cell *Salmonella enterica* subsp. Enteric serovars matrix-assisted laser desorption/ionization time of flight mass spectrometry spectra. *Lett. Appl. Microbiol.* **30**:24-31.
- Lezhava A., T. Mizukami, T. Kajitani, D. Kameoka, M. Redenbach, H. Shinkawa, O. Nimi and H. Kinashi.** 1995. Physical map of the linear chromosome of *Streptomyces griseus*. *J. Bacteriol.* **177**: 6492-6498.
- Lipp E.K., A. Huq, and R.R Colwell.** 2002: Effects of global climate on infectious disease: the cholera model. *Clin. Microbiol. Rev.* 757-770.
- Lipp E.K., I.N.G. Rivera, A.I. Gil, E. Espeland, N. Choopun and V.R. Louis.** 2003. Direct detection of *Vibrio cholerae* and ctx by PCR in Peruvian coastal water and plankton. *Appl. Environ. Microbiol.* **69**: 3676–3680.
- Maiden M. C. J., J.A. Bygravesdagger, E. FeilDagger, G. Morelli, J.E. Russelldagger, R. Urwin, Q. ZhangDagger, J. Zhou, K. Zurth, D.A. Caugant, I.M. Feaversdagger, M. Achtman and B.G. Spratt.** 1998. Multilocus sequence typing: A portable approach to the identification of clones within populations of pathogenic microorganisms. *Proc. Nat. Acad. Sci. (PNAS).* **95**: 3140-3145.
- Makni H.** 1995. L'oxydation et la décontamination en infiltration percolation. Thèse Doc. Université de Montpellier II.
- Man K.K., C.K.Y. Luey, M.B. Parsons, K.L.F. Cooper, G.B. Nair, M. Alam, M.A. Islam, D.T.L. Cheung, Y.W. Chu, T. Ramamurthy, G.P. Pazhani, S.K. Bhattacharya, H. Watanabe, J. Terajima, E. Arakawa, O-A. Ratchtrachenchai, S. Huttayanant, E.M. Ribot, P. Gerner-Smidt and B. Swaminathan.** 2008. Evaluation and validation of a PulseNet standardized pulsed-field gel electrophoresis protocol for subtyping *Vibrio parahaemolyticus*: an international multicenter collaborative study. *J. Clin. Microbiol.* **46**:2766-73.
- Maresca B.** 1979. L'Épandage des Eaux Usées : mariuel et recommandations techniques - La Documentrition Française, Paris.
- Matthew M.** 1979. Plasmid-mediated  $\beta$ -lactamases of Gram-negative bacteria: properties and distribution. *J. Antimicrob. Chemother.* **5**: 349-358.
- Mezrioui N. and B. Baleux.** 1994. Resistance patterns of *Escherichia coli* strains isolated from domestic sewage before and after treatment in both aerobic lagoon and activated sludge. *Water Res.* **28**:2399-406.
- Mezrioui N., K. Oufdou and B. Baleux.** 1995. Dynamics of non-O1 *Vibrio cholerae* and fecal coliforms in experimental stabilization ponds in the arid region of Marrakech, Morocco, and the effect of pH, temperature, and sunlight on their experimental survival. *Can. J. Microbiol.* **41**:489-498.
- Mimouni R.** 2004. Etude microbiologique des eaux usées dans le Grand Agadir: épuration par infiltration-percolation, impact sur l'environnement marin et réutilisation en agriculture. *Thèse Doct. Es Sci.* Université Ibn Zohr Faculté des Sciences d'Agadir. 172p.
- Mimouni R., B. Yacoubi and R. Eddabra.** 2011. Physicochemical quality of wastewater purified by infiltration-percolation: case of the plant of Ben Sergao (South-western morocco) after ten years of running. *R. Microbiol. Ind. Sanit. Environ. (REMISE).* **5**:101-114.

- Mimouni R., N.E. Chaouqy, J. Touti and A. Moukrim.** 2005. Qualité microbiologique des cultures maraîchères irriguées par les eaux usées épurées par infiltration-percolation. *Rev. Biol. Biotechnol.* 8-11.
- Mimouni R., R. Eddabra, L. Ben Zine and D. Araab.** 2009. Microbiological quality of Ben Sergao wastewater purified by infiltration percolation: 15 years of experience. *Rev. Biol. Biotechnol.* Vol 8, No 1.
- Ministère de l'Environnement du Maroc.** 2002. Normes marocaines, Bulletin officiel du Maroc. N° 5062 du 30 ramadan 1423. Rabat.
- Monjour L.** 1997. Les pathologies d'origine hydrique et la potabilité de l'eau. Les Cahiers du MURS n°33 - 2ème trimestre 1997.
- Moreau R.** 1993. Les mouvements des bactéries et des virus dans les sols - *Ac. Agric. France.* 101.
- Morris J.G. Jr.** 1990. Non-O group 1 *Vibrio cholerae*: a look at the epidemiology of an occasional pathogen. *Epidem. Rev.* 12:179-191.
- Moussaoui Louardi.** 2007. Identification et classification de microorganismes basées sur la spectrométrie de masse de type MALDI TOF. Rapport DEA. Faculté de Médecine de l'Université Louis Pasteur Strasbourg.
- Moussaoui W., C. Bouakaze and G. Prevost.** 2009. Applications de la spectrographie de masse MALDI TOF à l'identification bactérienne. *Bull. Soc. Fr. Microbiol.* 24:293-302.
- Mulvey M.R., L.Chui, J. Ismail, L. Louie, C. Murphy, N. Chang, M. Alfa and the Canadian Committee for the Standardization of Molecular Methods.** 2001. Development of a Canadian standardized protocol for subtyping methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* using Pulsed-Field Gel Electrophoresis. *J. Clin. Microbiol.* 39:3481–3485.
- Murchan S., M.E. Kaufmann, A. Deplano, R. Ryck, M. Struelens, C.E. Zinn, V. Fussing, S. Salmenlinna, J. Vuopio-Varkila, N.E. Solh, C. Cuny, W. Witte, P.T. Tassios, N. Legakis, W. Leeuwen, A. Belkum, A. Vindel, I. Laconcha, J. Garaizar, S. Haeggman, B. Olsso-Liljequist, U. Ransjo, G. Coombes and B. Cookson.** 2003. Harmonization of Pulsed-Field Gel Electrophoresis Protocols for Epidemiological Typing of Strains of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*: a single approach developed by consensus in 10 european laboratories and its application for tracing the spread of related strains. *J. Clin. Microbiol.* 41:1574–1585.
- National Research Council (NRC).** 1998. Issues in Potable Reuse: The Viability of Augmenting Drinking Water Supplies With Reclaimed Water. Washington, DC, *National Academy Press.*
- Nigim H.H., W.A. Hashlamoun, J.Y. Al-Dadah, and A. Abu-Marasa.** 2002. Potential implementation of subsurface drip irrigation with primary treated wastewater. IWA Regional Symposium on Water Recycling in Mediterranean Region. Iraklio, Greece, 26-29 September 2002. Preprint Book. 2: 171-174.
- Okada K, T. Iida, Kumiko Kita-Tsukamoto, and T. Honda.** 2005. Vibrios Commonly Possess Two Chromosomes. *J. Bacteriol.* 187:752–757.
- Oliver J. D. and J.B. Kaper.** 1997. *Vibrio* Species. In M. P. Doyle, L. R. Beuchat, and T. J. Montville, eds. *Food Microbiology: Fundamentals and Frontiers*, p228-264. Washington, D.C., ASM Press.

- Oliver J.D.** 2005. Wound infections caused by *Vibrio vulnificus* and other marine bacteria. *Epidemiol. Infect.* **133**: 383-391.
- Olukoya D.K., A.A. Ogunjimi and A.M. Abaelu** 1995. Plasmid profiles and antimicrobial susceptibility patterns of *Vibrio cholerae* O1 strains during a recent outbreak in Nigeria. *J. Diarrhoeal Dis. Res.* **13**: 118-121.
- OMS (Organisation Mondiale de la Santé).** 1989a. Guidelines for safe use of wastewater and excreta in agriculture and aquaculture. Measures for public health protection. Duncan Mara and Sandy Cairncross. 30p.
- OMS (Organisation Mondiale de la Santé).** 1989b. Technical Report Series No 778. Health guidelines for the Use of Wastewater in Agriculture and Aquaculture, Rapport d'un Groupe Scientifique de l'OMS. Geneve: Organisation Mondiale de la Santé, 74 p. **21**:119-124.
- OMS (Organisation Mondiale de la Santé).** 2010. Weekly epidemiological record. **85**:293–308.
- OMS (Organisation Mondiale de la Santé).** 2004. Guidelines for safe recreational water environments: Volume 1: Coastal and fresh waters. 15p.
- Omura T., Onuma M., Aizawa J., Umita T. and T.Yagi.** 1989. Removal efficiencies of indicator microorganisms in sewage treatment plants. *Water Sci. Technol.* **21**: 119-124.
- Papadopoulos M.C., P.M. Abel, D. Agranoff, A. Stich, E. Tarelli and B.A. Bell.** 2004. A novel and accurate diagnostic test for human African trypanosomiasis, *Lancet.* **363**:1358–1363.
- Parsons M.B., K.L.F. Cooper, K.A. Kubota, N. Puhr, S. Simington, P.S. Calimlim, D. Schoonmaker-Bopp, C. Bopp, B. Swaminathan, P. Gerner-Smidt, and E.M. Ribo.** 2007. PulseNet USA Standardized Pulsed-Field Gel Electrophoresis Protocol for Subtyping of *Vibrio parahaemolyticus*. *Foodborne Pathog. Dis.* **4**: 285–292.
- Passerat J., Tamtam F., Le Bot B., Eurin J., Chevreuil M. and P. Servais.** 2010. Antimicrobials and faecal bacteria resistant to antimicrobials in the rivers of the Seine River watershed: impacts of hospital effluents. *Eur. J. Water Qual.* 10.1051/water/2010004.
- Payement P.** 2003. Enlèvement des microorganismes pathogènes et des bactéries indicatrices par les stations de traitement des eaux usées municipales situées sur la rivière des Mille Îles. Rapport présenté au Ministère de l'Environnement du Québec.
- Pérez-Vázquez M., A. Oliver, B. Sánchez del Saz, E. Loza, F. Baquero and R. Cantón.** 2001. Performance of the VITEK2 system for identification and susceptibility testing of routine Enterobacteriaceae clinical isolates. *Int. J. Antimicrob. Agents.* **17**:371-376.
- Pimbley D. and P. Patel.** 1998. A review of analytical methods for detection of bacterial toxins. *J. Appl. Microbiol. (Symp. Supp).* **84**:98-109.
- Plan Directeur d'Assainissement (PDA).** 2008. Traitement des eaux usées et possibilités de leur réutilisation dans le grand Agadir. Atelier Méditerranéen sur les nouvelles technologies de recyclage des eaux non conventionnelles dans les cultures protégées.
- Quilici M.L., A. Guenole, L. Lemeé and B. Bidault.** 2007. Rapport annuel d'activité. 42p.
- Rabhi M.** 1988. La Réutilisation des Eaux Usées, Infiltration-Percolation sur Sable : recherche des conditions de dénitrification - *Mémoire de fin d'étude*, Institut National Agronomique de Tunisie.



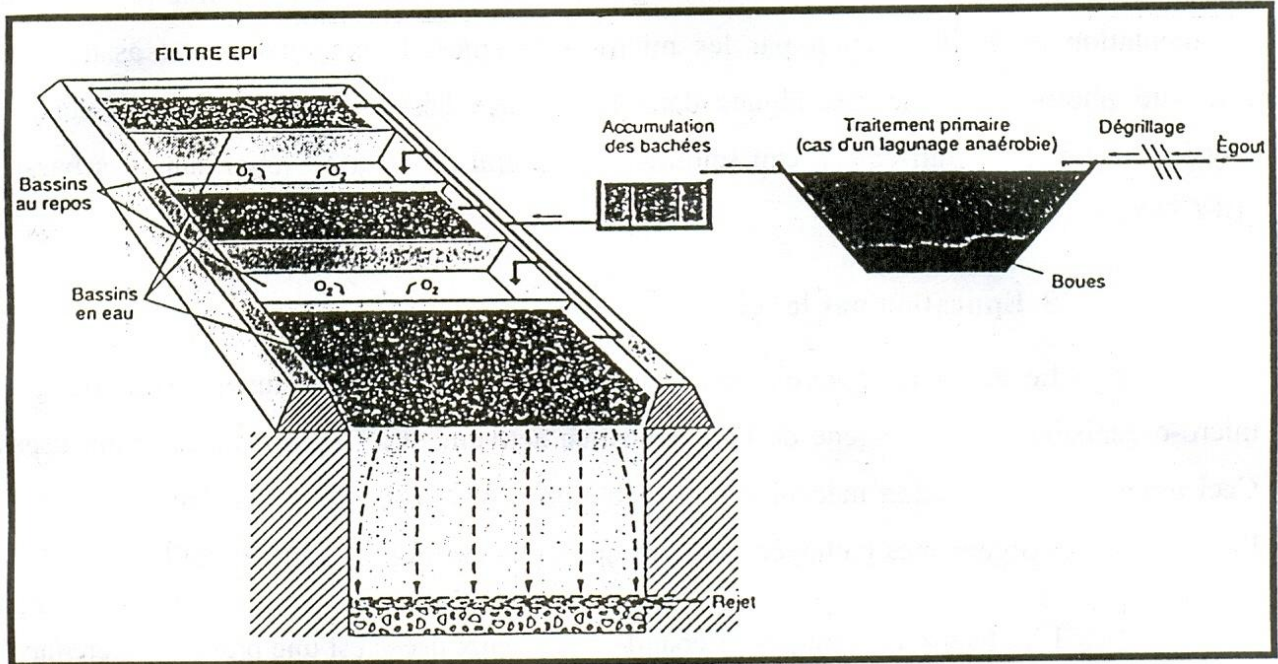
- RAMSA** (Régie Autonome Multi-Service d'Agadir). 2001. Note de synthèse : Etude des problèmes d'environnement et de pollution dans le Grand Agadir. 29p.
- Raoult D.** 1998. Dictionnaire de maladies infectieuses : diagnostic, épidémiologie, répartition géographique, taxonomie, symptomatologie. Editions Elsevier. 1162p.
- Reynaud Y.** 2008. Identification de marqueurs génétiques de la virulence chez *Vibrio nigrripulchritudo*, un pathogène de crevettes pénelides en Nouvelle-Calédonie. Thèse de Doctorat de l'Université Paris 6 – Pierre et Marie Curie.
- Robert-Pillot A.** 2006. Développement de méthodes moléculaires pour l'identification et le dénombrement de souches de *Vibrio cholerae* et de *Vibrio parahaemolyticus* dans l'environnement hydrique et les produits de la mer. Diplôme post-doctoral. Ecole pratique des Hautes Etudes. Paris.
- Rodier J.** 1996. L'analyse de l'eau, 8ème édition; DUNOD, Paris, 1383p.
- Rubin S.J. and R.C. Tilton.** 1975. Isolation of *Vibrio alginolyticus* from Wound Infections. *J. Clin. Microbiol.* **2**:556–558.
- Safa A., N.A. Bhuiyan, M. Alam, D.A. Sack and G.B. Nair.** 2005. Genomic relatedness of the new Matlab variants of *Vibrio cholerae* O1 to the classical and El Tor biotypes as determined by pulsed-field gel electrophoresis. *J. Clin. Microbiol.* **43**:1401-1404.
- Sagik B.P., B.E. Moor and C.A. Sorber.** 1978. Infectious disease potential of land application of wastewater. In: State of Knowledge in Land Treatment of Wastewater. *Vol. 1., Proceedings of an International Symposium*, Hanover, New Hampshire, U.S. Army Corps of Engineers, Cold Regions Research and Engineering Laboratory.
- Scheftel J.M., K. Ashkar, C. Boeri and H. Monteil.** 2006. Phlegmon au doigt à *Vibrio alginolyticus* consécutif à une blessure chez un patient de retour du Maroc. Journées Francophones de Microbiologie des Milieux Hydriques, 23-24 novembre 2006, Agadir, Maroc.
- Schwartz D.C. and C.R. Cantor.** 1984. Separation of yeast chromosome-sized DNAs by pulsed field gradient gel electrophoresis. *Cell.* **37**: 67-75.
- Sears, C.L. and J.B. Kaper.** 1996. Enteric bacterial toxins: mechanisms of action and linkage to intestinal secretion. *Microbiol. Rev.* **60**: 167-215.
- Shah H.N.** 2005. MALDI-TOF-mass spectrometry: hypothesis to proof of concept for diagnostic microbiology. *Bacteriol. As published in CLI Novembre 2005.*
- Shahalam A.B.M.** 1989. Wastewater effluents vs safety in its reuse: state-of-the art. *J. Environ. Sci.* sept.-oct. 35-42.
- Siméon D., A. Lozniewski, Ph.Canton and M. Weber.** 1997. Typage moléculaire par électrophorèse en champ pulsé des souches d'*Enterobacter cloacae* isolées d'infections ostéo-articulaires au CHU de Nancy de 1990 à 1994. *Ann. Biol. Clin.* **55**:465-469.
- Singh D.V., M.H. Matte, G.R. Matte, S. Jiang, F. Sabeena, B.N. Shukla, S.C. Sanyal, A. Huq and R.R. Colwell.** 2001. Molecular Analysis of *Vibrio cholerae* O1, O139, non-O1, and non-O139 Strains: Clonal Relationships between Clinical and Environmental Isolates. *Appl. Environ. Microbiol.* **67**:910–921.
- Slifko T. R., H.V. Smith and J. B. Rose.** 2000. Emerging parasite zoonoses associated with water and food. *Int. J. Parasitol.* **30**:1379-1393.

- Snoussi M., E. Noumi, D. Usai, L.A. Sechi, S. Zanetti, A. Bakhrouf.** 2008. Distribution of some virulence related-properties of *Vibrio alginolyticus* strains isolated from Mediterranean seawater (Bay of Khenis, Tunisia): investigation of eight *Vibrio cholerae* virulence genes. *World J. Microbiol. Biotechnol.* **24**:2133–2141.
- Stackebrandt E., W. Frederiksen, G. Garrity, PAD. P. Grimont, Kampfer; M. Maiden, X. Nesme, R. Rossello-Mora, J. Swings, H.G. Truper, L. Vauterin, A.C. Ward, and W.B. Whitman.** 2002. Report of the ad hoc committee for the re-evaluation of the species definition in bacteriology. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **52**: 1043-1047.
- Stevenson L.G., S.K. Drake, Y.R. Shea, A.M. Zelazny and P.R. Murray.** 2010. Evaluation of Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry (MALDI-TOF) for the identification of clinically important yeast species. *J. Clin. Microbiol.* **48**:3482–3486.
- Stover E., Ch. Haas, K. Rakness and O. Scheible.** 1986. Design Manuel. Municipal Wastewater Disinfection. EPA/625/1-86/021. Cincinnati. OH. 45268. Preprint Book 2: 171-174.
- Tagomori K., T. Iida, and T. Honda.** 2002. Comparison of genome structures of *Vibrios*, bacteria possessing two chromosomes. *J. Bacteriol.* **184**: 4351–4358.
- Takashi A.** 1998. Wastewater reclamation and reuse (water quality management library, 10). 1528p.
- Tanaka K., H. Waki, Y. Ido, S. Akita, Y. Yoshida and T. Yoshida.** 1988. Protein and polymer analyses up to m/z 100,000 by laser ionization time-of-flight mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2**:151-153.
- Tenover F.C., R.D. Arbeit, R.V. Goering, P.A. Mickelsen, B.E. Murray, D.H. Persing, and B. Swaminathan.** 1995. Interpreting Chromosomal DNA Restriction Patterns Produced by Pulsed-Field Gel Electrophoresis: Criteria for Bacterial Strain Typing. *J. Clin Microbiol.* **33**:2233–2239.
- Tholozan J.L. and J. Lorquin.** 2009. Spectrométrie de masse: Principe, applications en biologie et microbiologie. *Bull. Soc. Fr. Microbiol.* **24**:282-286.
- Thompson C.C., F.L. Thompson, K. Vandemeulebroecke, B. Hoste, P. Dawyndt and J. Swings.** 2004b. Use of recA as an alternative phylogenetic marker in the family *Vibrionaceae*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **54**: 919-924.
- Thompson F. L., T. Iida and J. Swings.** 2004 a. Biodiversity of *Vibrios*. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **68**: 403-431.
- Thungapathra M., K.K. Amita Sinha, S.R. Chaudhuri, P. Garg, T. Ramamurthy, G.B. Nair and A. Ghosh.** 2002. Occurrence of Antibiotic Resistance Gene Cassettes *aac(6')-Ib*, *dfrA5*, *dfrA12* and *ereA2* in Class I Integrons in Non-O1, Non-O139 *Vibrio cholerae* Strains in India. *Antimicrob. Agents Chemother.* **46**: 2948-2955.
- Toranzo A.E., P. Combarro, M.L. Lemos and J.L Barja.** 1984. Plasmid coding for transferable drug resistance in bacteria isolated from cultured Rainbow trout. *Appl. Environ. Microbiol.* **165**: 301-303.
- Touyer O.** 1997. Eaux usées dans le Grand Agadir : Impact sur l'environnement et épuration dans le système infiltration-percolation de Ben Sergao (étude physico-chimique et parasitologique). *Thèse DES*. Université Ibn Zohr, Faculté des Sciences d'Agadir. 183p.

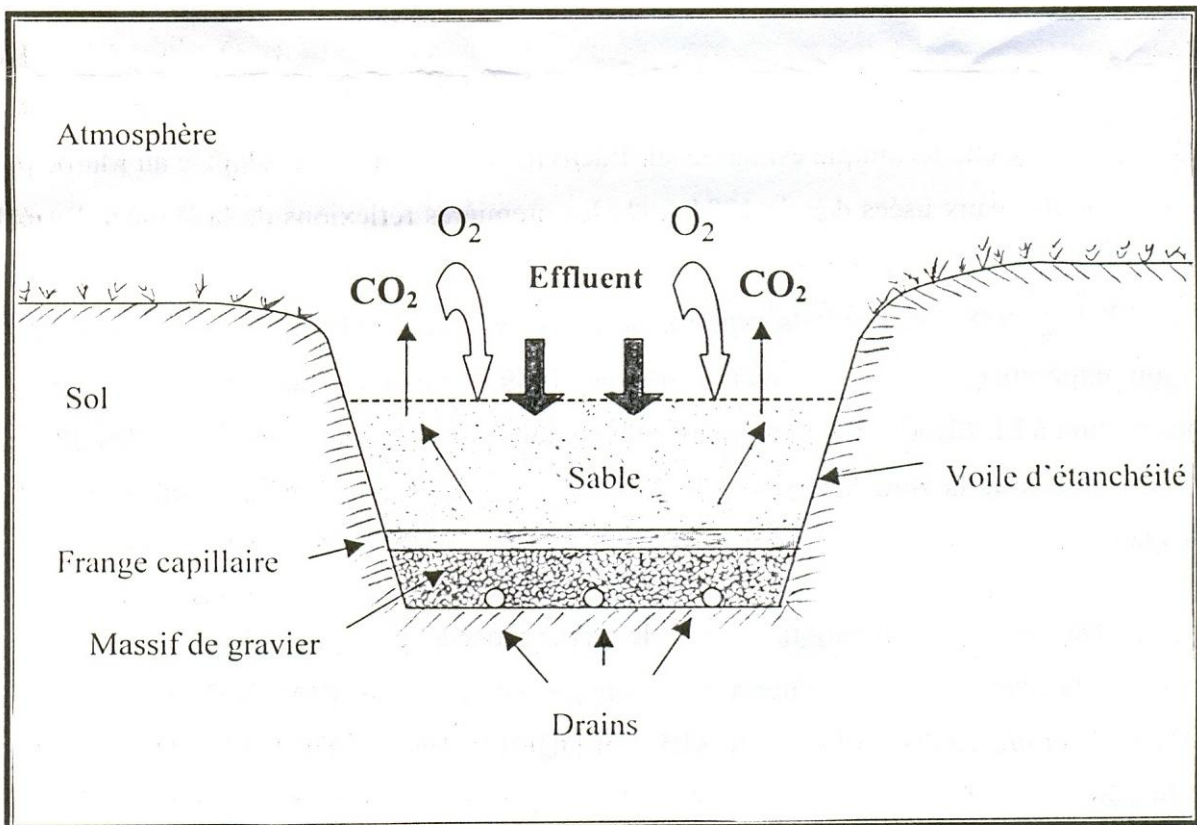
- Trad Rais M.** 1989. Surveillance bactériologique et parasitologique des eaux usées brute et traitées de la ville de Tunis. *Archive Institut Pasteur Tunis*. **66**:275-287.
- United States Agency for International Development (USAID).** 2002. Marketing strategy For Drarga wastewater and reuse pilot project. *Environmental Alternatives Unlimited*.
- Vandamme P., B. Pot, M. Gillis, P. de Vos, K. Kersters and J. Swings.** 1996. Polyphasic taxonomy, a consensus approach to bacterial systematic. *Microbiol. Rev.* **60**: 407-438.
- Véron M.M.** 1965. La position taxonomique des *Vibrio* et de certaines bactéries comparables. *Comptes Rendus Acad. Sci.* **261**: 5243-5246.
- Voahanginirina B.M.S.** 1998. Contribution à l'analyse des *Vibrio spp.* En élevage larvaire des crevettes *Penaeus monodon*. Mémoire de fin d'études, département Elevage, ESSA. 104p.
- Waldor M.K., H. Tschape and J.J. Mekalanos.** 1996. A new type of conjugative transposon encodes resistance to sulfamethoxazole, trimethoprim, and streptomycin in *Vibrio cholerae* O139. *J. Bacteriol.* **14**:4157-4165.
- Wanko A., R. Mose and A. Lienard.** 2005. Capacities of infiltration-percolation processes for the treatment of a synthetic effluent. *Rev. Sci. Eau.* **18**:165-175.
- Werther, J. and T. Ogada.** 1999. Sewage sludge combustion. *Prog. Energy Comb. Sci.* **25**:55-116.
- West, P.A. and R.R Colwell.** 1984. Identification and classification of Vibrionaceae – An overview; *In Vibrios in the environment. Environ. Sci. Technol.* 285-363.
- Wintgens T., T. Melin, A. Schäfer, S. Khan, M. Muston, D. Bixio and C. Thoeye.** 2005. The role of membrane processes in municipal wastewater reclamation and reuse. *Desal.* **178**:1-11.
- Wong H.C, S.Y. Chen, M.Y. Chen, J.D. Oliver, L.I. Hor and W.C. Tsai.** 2004. Pulsed-Field Gel Electrophoresis Analysis of *Vibrio vulnificus* Strains Isolated from Taiwan and the United States. *Appl. Environ. Microbiol.* **70**:5153-5158.
- Wong H.C., K.T. Lu, T.M. Pan, C.L. Lee and D.Y. Shih.** 1996. Subspecies typing of *Vibrio parahaemolyticus* by pulsed-field gel electrophoresis. *J. Clin. Microbiol.* **34**:1535-1539.
- Xydas S., C.S. Lange, D. Phil and H.C. Naimark.** 1996. Effect of methylation on the electrophoretic mobility of chromosomal DNA in pulsed-field agarose gels. *Appl. Theor. Electrophor.* **6**:43-47.
- Yamaichi Y., T. Iida, K.S. Park, K. Yamamoto and T. Honda.** 1999. Physical and genetic map of the genome of *Vibrio parahaemolyticus*: presence of two chromosomes in *Vibrio* species. *Mol. Microbiol.* **31**:1513-1521.
- Yamashita M. and J Fenn.** 1984b. Negative Ion Production with the electrospray Ion Source. *J. Phys. Chem.* **88**:4671-4675.
- Yamashita M. and J. Fenn.** 1984a. Electrospray ion source. Another variation on the Free-jet theme. *J. Phys. Chem.* **88**:4451-4460.
- Young T.A., Kerby M., Choukr-Allah R., Hurdus A.R.** 2000. Domestic Wastewater Treatment and Agricultural Reuse in Drarga, Morocco. *American Water Works Association.* 14p.

**Zhang J., B. Diao, N. Zhang, Z. Cui, L. Zhang, J. Xu and B. Kan.** 2007. Comparison of different electrophoretic parameters of Pulse-Field Gel Electrophoresis for *Vibrio cholerae* subtyping. *J. Microbiol. Meth.* **71**:15–22.

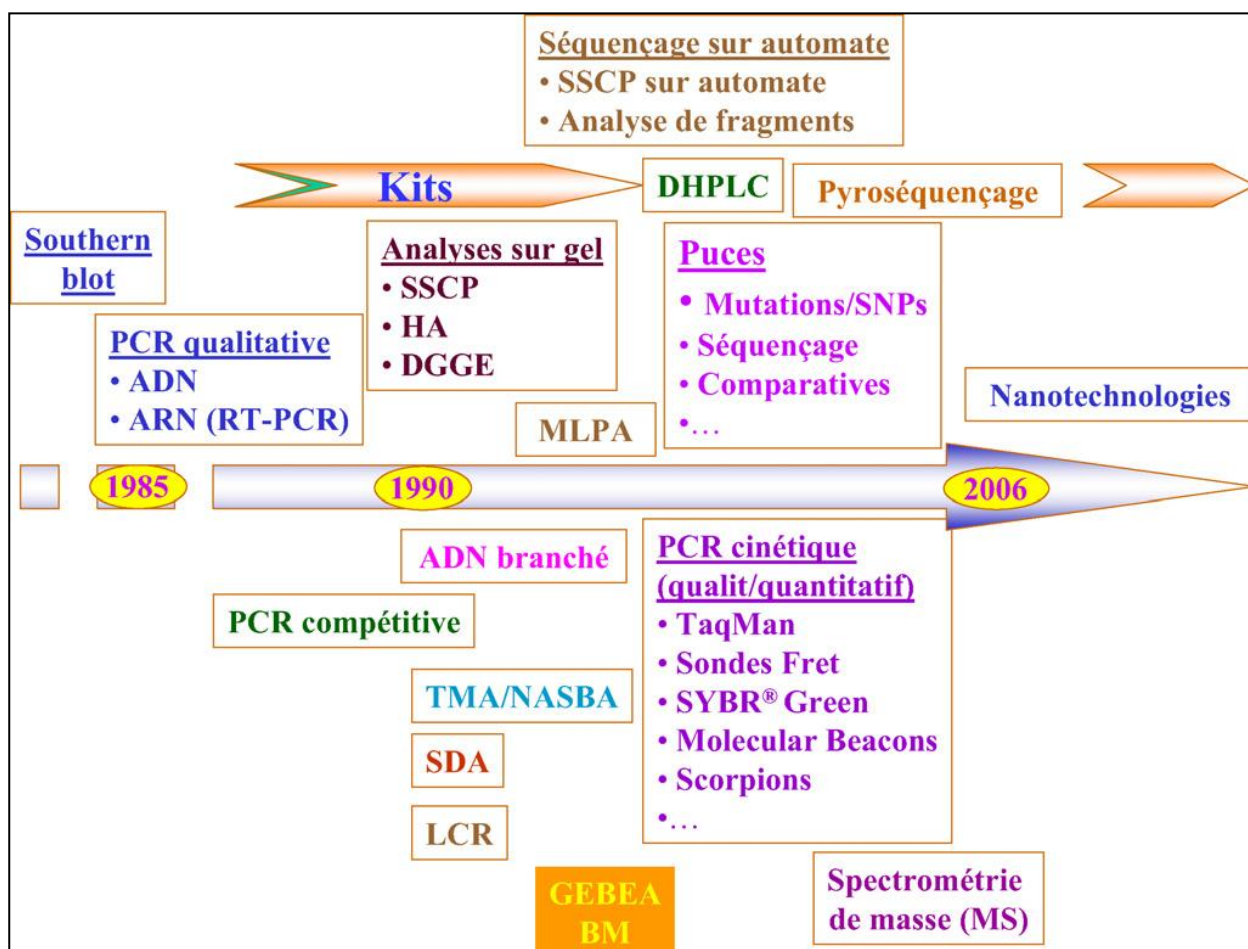
# ***ANNEXES***



**Annexe 1** : station type pour le traitement des eaux usées par infiltration-percolation (Bize *et al.*, 1989)



**Annexe 2** : Principe de fonctionnement des bassins d'infiltration-percolation (Mimouni, 2004)



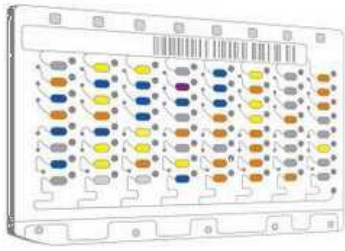
**Annexe 3.** Évolution des techniques de biologie moléculaire depuis la PCR à nos jours (Lamoril *et al.* 2007).

**SSCP:** single strand conformation polymorphism; **DGGE:** denaturing gradient gel electrophoresis; **HA:** heteroduplex analysis; **DHPLC:** denaturing high performance liquid chromatography. **SDA:** strand displacement amplification; **LCR:** ligase chain reaction

<p><b>Dénombrement des coliformes fécaux dans les eaux usées brutes et décantées.</b></p> <p>Echantillon ↓ Dilutions en eau physiologique 0.9% de Na cl ↓ Étalement de 2 x 0.1 ml sur gélose lactosée au tergitol-7+TTC ↓ Incubation 24h à 44.5 C° ↓ Comptage des colonies caractéristiques colonies oranges ou jaunes avec halo jaune ↓ Expression des résultats en CFU/100ml</p>	<p><b>Dénombrement des coliformes fécaux dans les eaux épurées</b></p> <p>Prise d'essai 2 x 10 ml, 2 x 100 ml ↓ Filtration sur membrane Q=0.45 µm ↓ Dépôt des membranesensemencées sur gélose lactosée au tergitol-7 + TTC ↓ Incubation 24 h à 44.5 C° ↓ Comptage des colonies caractéristiques colonies oranges ou jaunes avec halo jaune ↓ Expression des résultats en CFU/100ml</p>
<p><b>Dénombrement des entérocoques dans les eaux usées brutes et décantées.</b></p> <p>Echantillon brut ↓ Dilutions en eau physiologique 0.9% NaCl ↓ Incorporation de 2 x 0.1 ml dans la gélose à la bile à l'esculine et à l'azide de sodium ↓ Incubation 48 h à 37C° ↓ Comptage des colonies caractéristiques : Colonies noires avec halo noir ↓ Expression des résultats en CFU/100ml</p>	<p><b>Dénombrement des entérocoques fécaux dans l'eau épurée</b></p> <p>Prise d'essai 2 x 10 ml, 2 x 100 ml ↓ Filtration sur membrane Q=0.45 µm ↓ Dépôt des membranesensemencées sur gélose à la bile, à l'esculine et l'azide de sodium Filtration sur membrane Q=0.45 µm ↓ Incubation 48 h à 37C° ↓ Comptage des colonies caractéristiques : Colonies noires avec halo noir ↓ Expression des résultats en CFU/100ml</p>

**Annexe 4 :** Protocole expérimental suivi pour le dénombrement de coliformes fécaux et des entérocoques dans les eaux usées (brutes, décantées et épurées) des trois stations d'épuration du grand Agadir





**Schéma d'une carte du système Vitek®**  
(d'après <http://www.biomerieux-diagnostics>)



**Station Compacte Satellite**



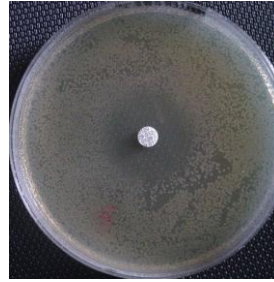
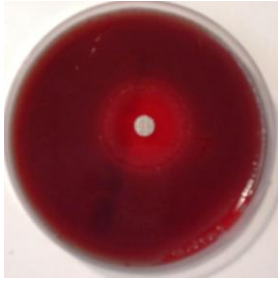
**Automate Vitek® 2**

**Annexe 5** : les différents constituants d'un système Vitek® 2

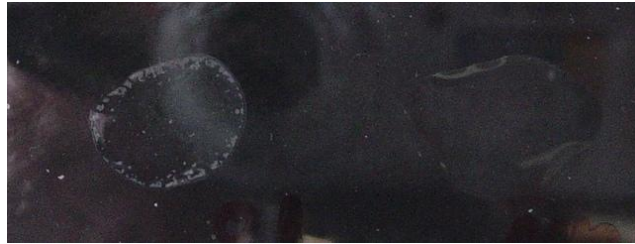
**Annexe 6 :** Normes de qualité des eaux destinées à l'irrigation et normes de rejet dans le milieu naturel

<b>Paramètres</b>	<b>Valeurs limites générales des eaux destinées à l'irrigation</b>	<b>Valeurs limites générales de rejet dans le milieu naturel</b>
<b>PARAMETRES BACTERIOLOGIQUES</b>		
<b>Coliformes fécaux</b>	1000/100mL	
<b>Salmonelle</b>	Absence dans 5L	Absence dans 5L
<b>Vibron cholérique</b>	Absence dans 450mL	Absence dans 5L
<b>PARAMETRES PARASITOLOGIQUES</b>		
<b>Parasites pathogènes</b>	Absence	Absence
<b>Œufs, Kystes de parasites</b>	Absence	Absence
<b>Larves d'ankylostomide</b>	Absence	Absence
<b>Fluococercaires de <i>Schistosoma hoematobium</i></b>	Absence	Absence
<b>PARAMETRES PHYSICO-CHIMIQUES</b>		
<b>Salinité (mg/L)</b>	7680	
<b>Conductivité électrique <math>\mu\text{S/cm}</math> à 25°C</b>	1200*	2700
<b>pH</b>	6.5-8.4	6.5-9
<b>Température (°C)</b>	35	30

\* A partie d'une conductivité de 3mS/cm, une eau nécessite des restrictions sévères pour l'irrigation, mais des rendements de 50% du rendement potentiel peuvent être réalisés avec des eaux de 8,7% mS/cm (cas de l'orge)



**Annexe 7** : Sensibilité des *Vibrio* à l'agent vibriostatique O/129



**Annexe 8** : Recherche de *V. cholerae* O1 par agglutination sur lame avec un antisérum polyvalent anti-O1 (à droite *V. cholera* O1 (témoin), à gauche isolat de *V. cholerae* non O1)

**Annexe 9** : Profils de résistance des souches de *Vibrio* isolées des eaux usées de la STEP de L'Mzar (CBN : céphalosporinase bas niveau, PBN : pénicillinase bas niveau, PS : phénotype sauvage).

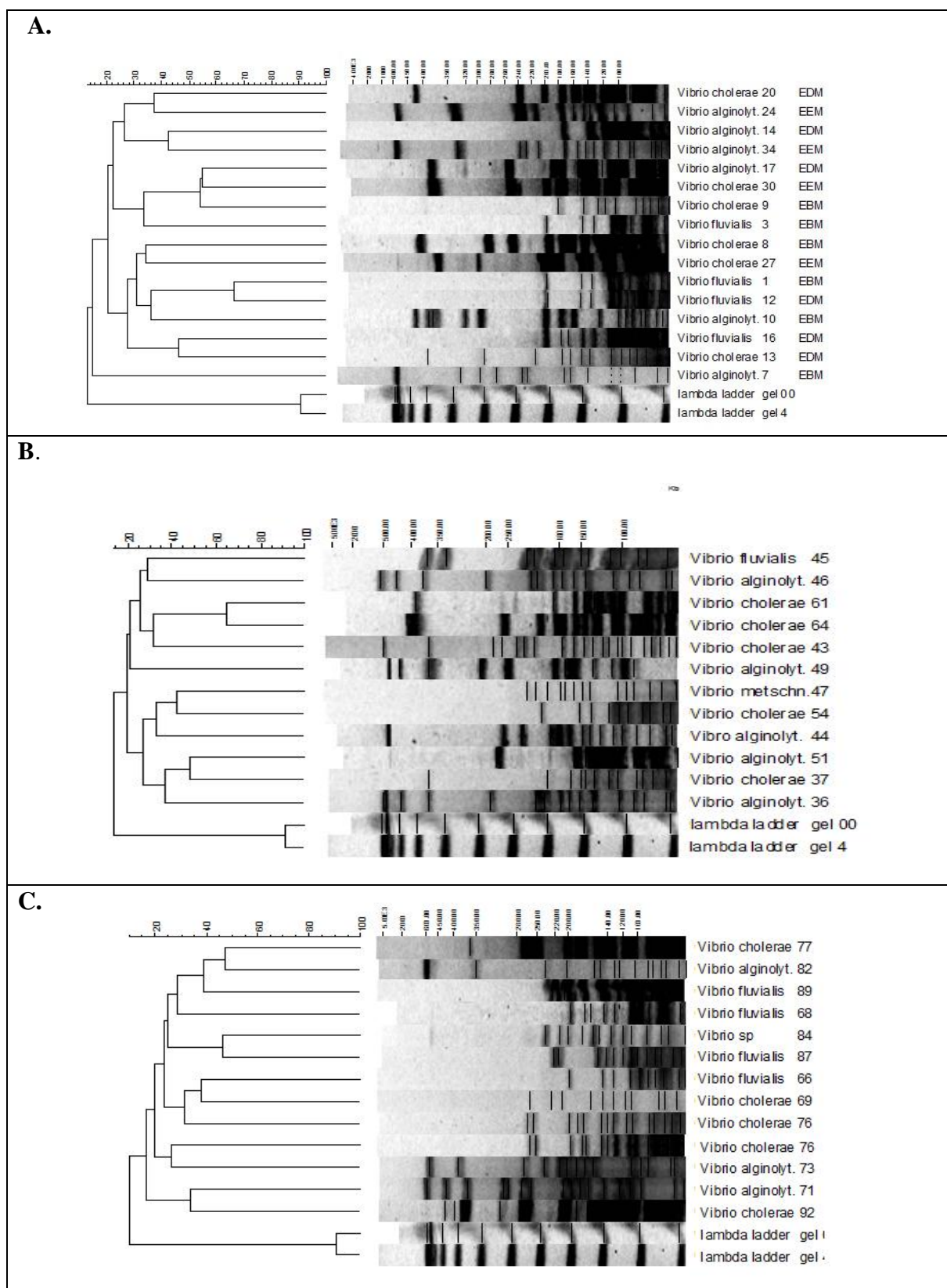
Date	Eaux usées	N°	Identification	Phénotype de résistance	Autres résistance
18/12/06	EB	1	<i>V. fluvialis</i>	CBN	
18/02/06		2	<i>V. cholerae</i>	PS	
05/02/07		3	<i>V. fluvialis</i>	CBN	
08/01/07		4	<i>V. cholerae</i>	PS	
13/02/07		5	<i>V. cholerae</i>	PBN	
12/03/07		6	<i>V. cholerae</i>	PBN	
10/04/07		7	<i>V. alginolyticus</i>	céfuroximase	FOS
16/04/07		8	<i>V. cholerae</i>	PBN	
07/05/07		9	<i>V. cholerae</i>	PS	FOS
14/05/07		10	<i>V. alginolyticus</i>	PBN	
11/12/06	ED	11	<i>V. cholerae</i>	PS	
11/12/06		12	<i>V. fluvialis</i>	CBN	
18/12/06		13	<i>V. cholerae</i>	PS	FOS
08/01/07		14	<i>V. alginolyticus</i>	PBN	
05/02/07		15	<i>V. cholerae</i>	PS	
13/02/07		16	<i>V. fluvialis</i>	CBN	
12/03/07		17	<i>V. alginolyticus</i>	PS	FOS
12/03/07		18	<i>V. cholerae</i>	PBN	
16/04/07		19	<i>V. cholerae</i>	PS	
16/04/07		20	<i>V. cholerae</i>	PS	
08/01/07	EE	21	<i>V. cholerae</i>	PS	
13/02/07		22	<i>V. cholerae</i>	PS	
12/03/07		23	<i>V. alginolyticus</i>	PS	
11/12/06		24	<i>V. alginolyticus</i>	PBN	
18/12/06		25	<i>V. cholerae</i>	PS	
05/02/07		27	<i>V. cholerae</i>	PS	SXT, NA
26/03/07		30	<i>V. cholerae</i>	PS	SXT, NA, FOX
14/05/07		34	<i>V. alginolyticus</i>	PBN	

**Annexe 10** : Profils de résistance des souches de *Vibrio* isolées des eaux usées de la STEP de Drarga (PS : phénotype sauvage, PBN : pénicillinase bas niveau, CBN : céphalosporinase bas niveau).

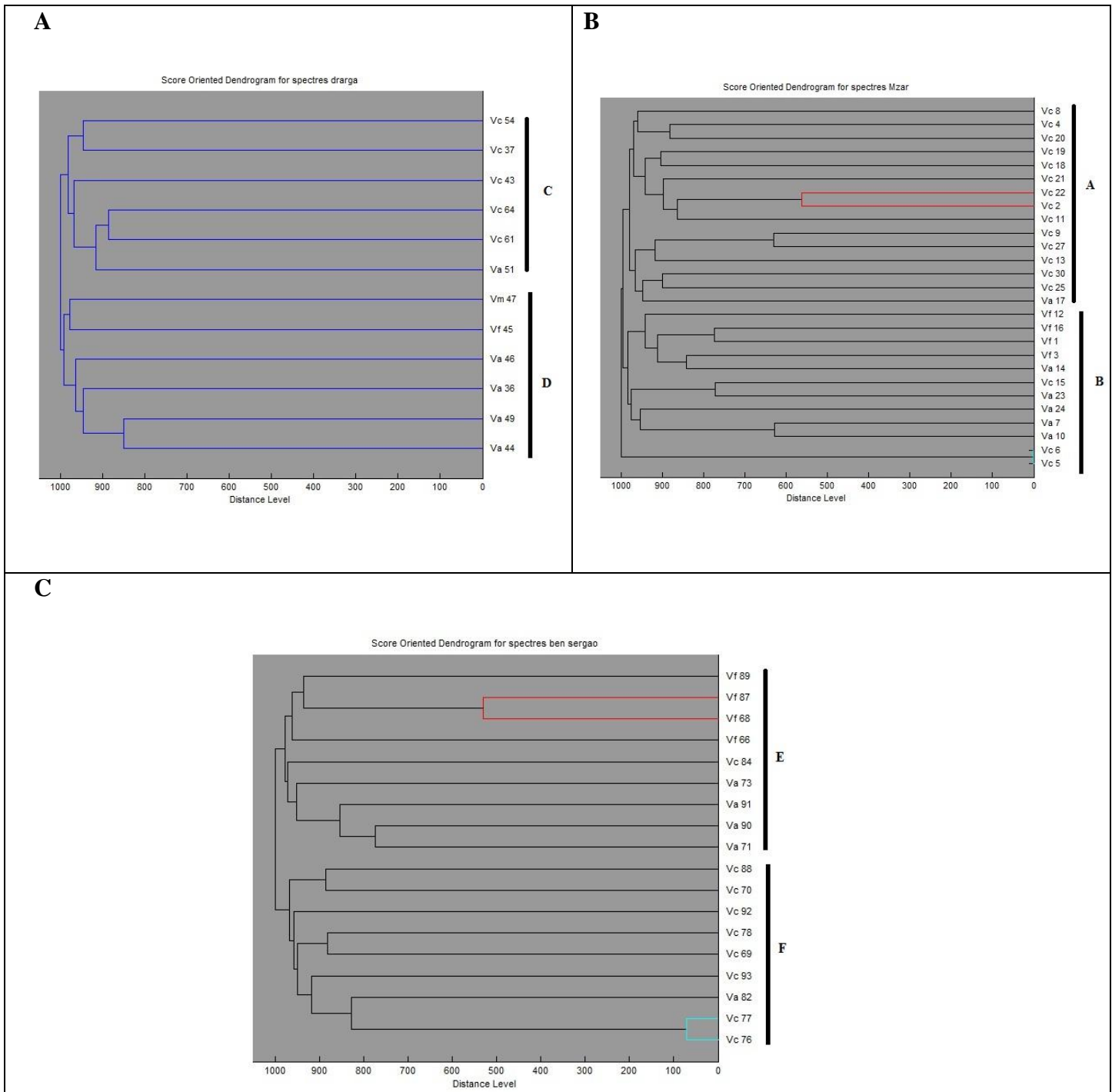
Date	Eaux usées	N°	Identification	Phénotype de résistance	Autres résistance
05/02/07	EB	36	<i>V. alginolyticus</i>	PS	FOX
13/02/07		37	<i>V. cholerae</i>	PS	
14/05/07		43	<i>V. cholerae</i>	PS	
05/06/07		44	<i>V. alginolyticus</i>	PBN	
18/12/06	ED	45	<i>V. fluvialis</i>	CBN	FOX
05/02/07		46	<i>V. alginolyticus</i>	PBN	FOX
13/02/07		47	<i>V. metschnikovii</i>	PBN	FOX
26/03/07		49	<i>V. alginolyticus</i>	PBN	
16/04/07		51	<i>V. alginolyticus</i>	PBN	NA
11/12/06	EE	54	<i>V. cholerae</i>	PBN	FOS, FOX
10/04/07		61	<i>V. cholerae</i>	PS	FOS
14/05/07		64	<i>V. cholerae</i>	PS	FOS

**Annexe 11** : Profils de résistance des souches de *Vibrio* isolées des eaux usées de la STEP de Ben Sergao (CBN : céphalosporinase bas niveau, PS : phénotype sauvage, PBN : pénicillinase bas niveau).

Date	Eaux usées	N°	Identification	Phénotype de résistance	Autres résistance
08/01/07	EB	66	<i>V. fluvialis</i>	CBN	FOX
12/03/07		68	<i>V. fluvialis</i>	CBN	FOX
16/04/07		69	<i>V. cholerae</i>	PS	
07/05/07		70	<i>V. cholerae</i>	PS	
14/05/07		71	<i>V. alginolyticus</i>	PS	
05/06/07		90	<i>V. alginolyticus</i>	PS	
08/01/07	ED	73	<i>V. alginolyticus</i>	PBN	FOX
12/03/07		76	<i>V. cholerae</i>	PS	SXT, NAL
26/03/07		77	<i>V. cholerae</i>	PS	SXT, NA
10/04/07		78	<i>V. cholerae</i>	PS	
14/05/07		92	<i>V. cholerae</i>	PS	
05/06/07		93	<i>V. cholerae</i>	PS	
08/01/07	EE	82	<i>V. alginolyticus</i>	PBN	FOX
13/02/07		91	<i>V. alginolyticus</i>	PS	
12/03/07		84	<i>V. cholerae</i>	PBN	FOS, NA
16/04/07		87	<i>V. fluvialis</i>	CBN	FOX
07/05/07		88	<i>V. cholerae</i>	PS	
05/06/07		89	<i>V. fluvialis</i>	CBN	FOX



**Annexe 12 :** Dendrogramme des profils d'ADN obtenus par électrophorèse en champ pulsé, indiquant la similarité des profils des différentes souches. (A) : STEP L'Mzar, B : STEP Ben Sergao, C : STEP Drarga.



**Annexe 13 :** Dendrogramme de classification des souches de *Vibrio* prélevées des eaux usées des stations d'épuration de la Wilaya d'Agadir (L'Mzar, Ben Sergao et Drarga)

**A**



**B**



**C**



**Annexe 14 : A et B** : Rejet des eaux usées de la station L'Mzar au niveau de la plage Bouadisse (lors de la période de prélèvements de nos échantillons d'eaux usées et avant la construction de l'émissaire sous marin en 2007), **C** : Travaux de construction de l'émissaire sud



## COMPOSITION DES MILIEUX DE CULTURE

### Milieu : Gélose lactosée au Tergitol-7 et au TTC

Peptone de viande	5 g
Extrait de levure	3 g
Lactose	10 g
Heptadéclysulfate de Na (Tergitol-7)	0.1 g
Bleu de bromothymol	0.025 g
Agar	12 g
pH : 6.8 – 7	

### Milieu : Gélose à la bile, à l'esculine et à l'azide de sodium

Tryptone	17 g
Peptone pepsique de viande	3 g
Extrait autolytique de levure	5 g
Bile de bœuf	10 g
NaCl	5 g
Citrate de sodium	1 g
Esculine	1 g
Citrate ferrique ammoniacal	0.5 g
Azide de sodium	0.25 g
Agar	13.5 g

### Milieu : Gélose glucosée viande-foie

Peptone viande-foie	30,0 g
Glucose.	2,0 g
Amidon soluble	.2,0 g
Sulfite de sodium	2,5 g
Citrate de fer ammoniacal	0,5 g
Agar agar bactériologique	11,0 g
pH: 7,6 ± 0,2.	

### Milieu : Mueller-Hinton

Infusion de viande de boeuf	300 mL
Peptone de caséine	17,5 g
Amidon de maïs	5 g
Agar	17 g
pH = 7,4	

### Eau peptonée alcaline

#### - simple concentration

Peptone	20g
Chlorure de sodium	30g
Eau	1000ml

**-double concentration (hypersalée)**

Peptone	40g
Sodium chlorure	60g
Eau	1000ml

**Milieu : TCBS**

Peptone	10 g.
Extrait de levure	5 g.
Saccharose	20 g.
Citrate de sodium	10 g.
Citrate de fer III	1 g.
Bile de bœuf	8 g.
Bleu de bromothymol	40 mg.
Bleu de thymol	40 mg.
Thiosulfate de sodium	10 g.
Chlorure de sodium	10 g.
Agar	14 g.
pH = 8,6	

**Milieu : Gélose TSA**

Tryptone	15g
Peptone papainique de soja	5g
Chlorure de sodium	5g
Agar bactériologique	15g
pH = 7,3 ± 0,2	

**Bouillon Coeur Cervele**

Protéose-peptone	10,0 g
Infusion de cervelle de veau	12,5 g
Infusion de cœur de bœuf	5,0 g
Glucose	2,0 g
Chlorure de sodium	5,0 g
Hydrogénophosphate de sodium	2,5 g
pH = 7,4	

**Milieu CAYE**

Peptone de caséine	20,0 g
Chlorure de sodium	2,5 g
Extrait de levure	6,0 g
Phosphate dipotassique	8,7g
Glucose	2,5g
Chlorure ferrique	0,005 g
Chlorure de manganèse	0,005 g
Sulfate de magnésium	0,05 g
pH 8,5	