

# La cytométrie en flux automatique, une nouvelle méthode pour mesurer les bactéries en ligne dans l'eau potable

**Céline Jaeger**

*Responsable marketing, bNovate Technologies SA*

**Marta Cassaro Hainard**

*Responsable environnement, Viteos SA*

Depuis plus de 100 ans, la culture sur plaque est la méthode de référence pour contrôler la qualité microbiologique de l'eau potable. Tout au long du XX<sup>e</sup> siècle elle a accompagné l'évolution des normes. L'expérience montre pourtant que le délai nécessaire pour obtenir un résultat avec le comptage sur plaque des bactéries hétérotrophes (ang. heterotrophic plate count, HPC) est beaucoup trop long et insuffisant pour éviter la propagation d'une contamination. C'est ce qu'a vécu la ville du Locle en 2015. Suite à cet incident, l'entreprise Viteos, responsable du service des eaux, a cherché des méthodes adaptées et modernisé ses installations, en installant plusieurs appareils de contrôle en continu. Viteos a collaboré avec bNovate Technologies, développeur du premier cytomètre en flux entièrement automatique appelé BactoSense. Aujourd'hui, la ville du Locle compte en tout temps sur une eau d'excellente qualité, grâce à une surveillance entièrement en ligne, un support puissant aux analyses réglementaires prévues par la législation suisse en vigueur.

La Suisse fait partie des pays pouvant se vanter d'avoir de l'eau potable dans tous les ménages. Se servir un verre d'eau du robinet est un geste simple qui n'appelle pas à la réflexion. Pourtant le chemin qu'a parcouru l'or bleu avant d'arriver dans nos chaudières est long et parsemé d'embûches. La qualité irréprochable de l'eau sortant du système de distribution n'est pas due au hasard, mais est la conséquence de minutieux trai-

tements et d'un contrôle permanent. Ceci permet de garantir que les contaminations dues à l'environnement, au climat ou à des erreurs techniques puissent être maîtrisées à temps.

## Normes légales sur l'eau potable en Suisse

C'est en 1888 que la loi sur la pêche marque la première étape de la protection des eaux

en Suisse. Au fil des années, différentes ordonnances posent les normes à suivre pour assurer la qualité de l'eau potable. En 2017, la Confédération réunit les normes microbiologiques, physico-chimiques et chimiques dans une seule ordonnance: l'OPBD, RS 817.022.11<sup>1</sup>. Dans cette nouvelle ordonnance, certains paramètres présents dans des produits de consommation courante et pouvant nuire à la santé et à l'environnement ont été ajoutés. C'est depuis la référence générale en Suisse.

### Historique des paramètres microbiologiques

Déjà pendant le XIX<sup>e</sup> siècle, on s'était rendu compte que l'eau pouvait véhiculer différents micro-organismes pathogènes et qu'il était absolument nécessaire de les déceler avant distribution. En 1804, une méthode rudimentaire de filtration par pierres et par sable faisait ses preuves en Écosse pour l'industrie de lavage de vêtements. Les premiers filtres à sable ont par la suite été développés en Angleterre dans les années 1820. À la fin du XIX<sup>e</sup> siècle, la filtration d'eau s'était déjà largement répandue. Son effet protecteur a été démontré en 1892, en Allemagne, lorsque la rivière Elbe a été contaminée par la bactérie du choléra. Plus de 7'000 personnes consommant cette eau non filtrée ont été tuées. Dans la ville d'Altona, qui consommait la même eau mais après filtration, seuls quelques décès (non liés à l'eau) ont été répertoriés. Se basant sur cette catastrophe, Robert Koch, qui venait de mettre au point une méthode de culture de colonies de

bactéries sur gélatine, a proposé un objectif pour protéger la santé publique: une limite de 100 UFC/mL (Unités formant colonies). Cette valeur reste, 125 ans plus tard, l'indicatrice de la bonne qualité d'une eau - avant traitement (Payment et al., 2003)<sup>2</sup>.

Cette méthode, devenue une norme au début du siècle dernier, n'a que légèrement évolué depuis, et continue à être utilisée dans le monde entier. Ses limitations et défauts n'ont également pas changés: on sait qu'elle ne détecte qu'une partie infime (celle qui est adaptée aux conditions de culture sur plaque) du microbiote total vivant dans l'eau. Certains avancent le chiffre de 0.1% seulement de la population effective (Van Nevel et al 2017)<sup>3</sup>. Si la plupart des micro-organismes sont inoffensifs, une augmentation soudaine dans leur nombre plus que le comptage numérique lui-même peut néanmoins révéler un problème dans le traitement de l'eau. Un résultat positif reste toutefois un indicateur indéniable de la viabilité des micro-organismes. Cette méthode bénéficie d'une base de données de plus d'un siècle pour l'interprétation et la prise de décision quant aux résultats produits (Douterelo et al., 2014)<sup>4</sup>.

### Développement d'une nouvelle technologie: la cytométrie en flux en ligne

La sécurité de l'alimentation en eau potable nécessite une analyse des risques par la détermination des points critiques et leur maîtrise selon le concept « Hazard Analysis Critical Control Points » (HACCP) (ODAIIOUS,

<sup>1</sup>RS 817.022.11 - Ordonnance du DFI sur l'eau potable et l'eau des installations de baignade et de douche accessibles au public (OPBD), du 16 décembre 2016.

<sup>2</sup>Payment P., Sartory D.P. and Reasoner D.J. 2003. *The history and use of HPC in drinking-water quality management*. In *Heterotrophic Plate Counts and Drinking-water Safety: The Significance of HPCs for Water Quality and Human Health*. 272 p.

<sup>3</sup>Van Nevel, S., Koetzsch, S., et al. 2017. *Flow cytometric bacterial cell counts challenge conventional heterotrophic plate counts for routine microbiological drinking water monitoring*. *Water research*, 113, 191-206.

<sup>4</sup>Douterelo, I., Boxall, J.B., et al 2014. *Methodological approaches for studying the microbial ecology of drinking water distribution systems*. *Water Res.* 65, 134-156. *Loche, juillet 2015: investigations et perspectives*. *Aqua & Gas*, 96 (9), 22-30.

RS 817.02)<sup>5</sup>. Une partie essentielle de ce processus consiste à analyser régulièrement des points clés du réseau, selon les pratiques préconisées par l'autocontrôle. Une analyse épidémiologique permet de constater que les micro-organismes, tels que les virus, bactéries et protozoaires, sont une partie importante des vecteurs de maladies véhiculées par l'eau potable (Gutzman-Herrador, et al., 2015)<sup>6</sup>.

Vérifier de façon ponctuelle est une avancée, cela reste pourtant insuffisant pour assurer un contrôle qualité fiable. Avec le comptage sur plaque il faut en effet attendre 2 à 7 jours pour connaître le résultat. Pendant ce temps, une contamination a largement l'occasion de s'installer et de se propager dans le réseau. C'est ce qu'a réalisé à ses dépens la ville du Locle en 2015 (Montandon et al., 2016)<sup>7</sup>. Malgré un contrôle régulier de la qualité de l'eau, un fort orage a suffi pour que l'eau impropre à la consommation atteigne la population.

Au XXI<sup>e</sup> siècle il doit bien exister un moyen fiable pour éviter les contaminations de l'eau ! Cela faisait justement quelques années que bNovate Technologies – à l'époque une spin-off de l'EPFL – développait une solution pour mesurer les bactéries en continu : le BactoSense (Figure 1). Elle propose donc à Viteos de tester leur innovation – un cytomètre en flux pouvant mesurer les bactéries en ligne de façon 100% automatique. Aucune connaissance préalable en biologie n'est requise pour utiliser le BactoSense et le nombre exact de bactéries est connu en seulement 20 minutes.

La ville du Locle dispose de sources et captages repartis dans son territoire. Le distributeur Viteos a décidé d'installer un cytomètre en flux en continu à la sortie de la CTE (Chaîne de Traitement de l'Eau), s'assurant



Figure 1 - M. Jean-Félix Marguet et l'appareil BactoSense, installé à la Chaîne de Traitement de l'Eau (CTE) de la ville du Locle.

que la qualité de l'eau qui part aux réservoirs est irréprochable.

Il faut savoir que la cytométrie en flux (CMF) est une méthode très rigoureuse. Grâce à son principe de mesure, elle est capable de détecter plus de 99,9% des cellules microbiennes en suspension dans l'eau. Certains producteurs d'eau comme Zurich ou Bâle ont d'ailleurs déjà partiellement remplacé l'HPC par cette méthode. Utilisée depuis 1968, la CMF est une technique rapide, précise, quantitative et reproductible pour compter et mesurer le nombre total de cellules dans un échantillon. L'échantillon d'eau est mélangé avec un ou plusieurs réactifs fluorescents qui, pendant le temps d'incubation, se fixent à et colorent l'ADN ou les protéines de toutes

<sup>5</sup>RS 817.02 Ordonnance sur les denrées alimentaires et les objets usuels (ODAIUOs), du 16.12.2016.

<sup>6</sup>Guzman-Herrador, B., Carlander, A., et al. 2015. Waterborne outbreaks in the Nordic countries, 1998 to 2012. *Eurosurveillance*, 20(24), 21160.

<sup>7</sup>Montandon P-E, Cassaro-Hainard, M. & Vuille, L., 2016. Contamination de l'eau par des norovirus - réseau du Locle, juillet 2015 : investigations et perspectives. *Aqua & Gas*, 96 (9), 22-30.

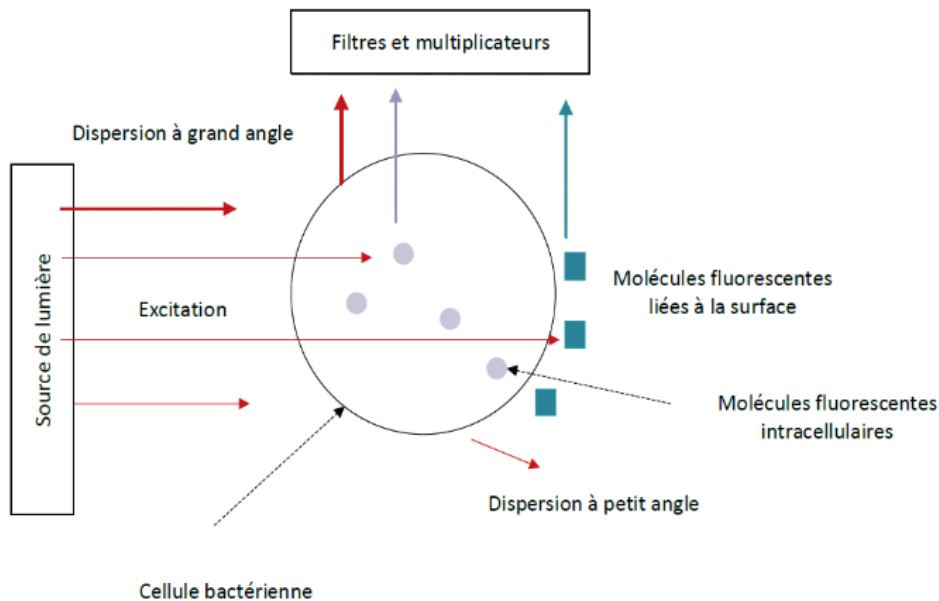


Figure 2 - Schéma de fonctionnement d'un cytomètre en flux montrant l'interaction entre une source de lumière et une particule en suspension avec la dispersion de lumière (flèches rouges) et de la fluorescence (flèches lilas et bleue). (Modifiée selon Hammes & Egli 2010).<sup>8</sup>

les cellules. Il passe ensuite dans un capillaire où chaque cellule est comptée individuellement après excitation de la sonde fluorescente par un faisceau laser (Figure 2). Les signaux lumineux émis donnent des informations permettant de créer une empreinte microbiologique de l'échantillon (Figure 3). Les informations varient selon le réactif utilisé. Par exemple la combinaison de Sybr Green I (SG) et Propidium iodide (PI) permet de définir le nombre total de cellules présentes dans l'échantillon – Total Cell Count (TCC) et le nombre de cellules intactes – Intact Cell Count (ICC)<sup>9</sup>. Les avantages par

rapport à l'HPC sont nombreux. Parmi eux on peut citer le grand nombre d'informations contenues dans chaque analyse, la rapidité (le résultat est connu en quelques minutes au lieu de plusieurs jours), la mesure en continu ainsi que ses coûts raisonnables par analyse.

Tout comme les cytomètres en flux de laboratoire, le BactoSense est rapide, exact et précis. Développé pour un milieu industriel, il offre l'avantage supplémentaire d'être entièrement autonome, supprimant les besoins en personnel qualifié et les problèmes inhérents aux mesures « manuelles »

<sup>8</sup>Hammes, F., & Egli, T. (2010). Cytometric methods for measuring bacteria in water: advantages, pitfalls and applications. *Analytical and bioanalytical chemistry*, 397(3), 1083-1095.

<sup>9</sup>Nescerecka, A., Juhna, T., & Hammes, F. (2018). Identifying the underlying causes of biological instability in a full-scale drinking water supply system. *Water research*, 135, 11-21.

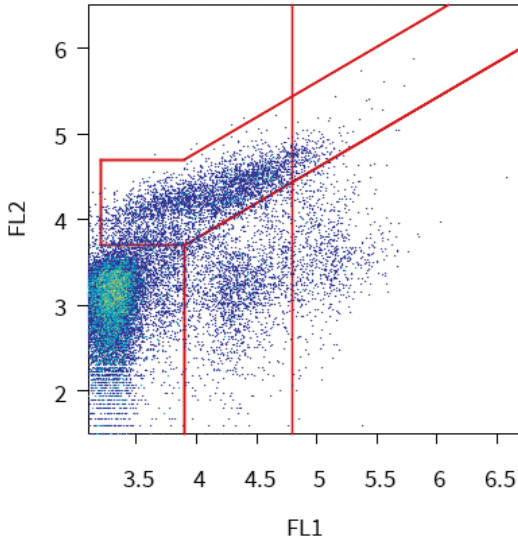


Figure 3 - Graphique de l'empreinte microbiologique de l'eau produit par un BactoSense utilisant les 2 colorants (SG et PI). Les cellules intactes (ICC) sont représentées dans la fenêtre rouge en bas à droite. La ligne verticale rouge permet de distinguer les grosses bactéries (à droite) des petites bactéries (à gauche) au sein des ICC. La fenêtre en haut à gauche contient les cellules endommagées et les débris (DCC) dénombrés par le BactoSense. L'addition du ICC et du DCC permet de calculer le TCC.

en laboratoire. La cartouche hermétique recyclable du BactoSense évite tout contact avec l'utilisateur et permet d'effectuer environ 1'000 mesures. Le principe est le même que pour les cartouches d'imprimante. Le résultat s'affiche sur un écran tactile rendant l'utilisation de l'instrument intuitive et conviviale. Produit par l'entreprise Sigrist-Photometer, le BactoSense, introduit sur le marché en 2017, a depuis reçu 4 prix d'innovation. À la première cartouche «TCC» mesurant le nombre total de cellules s'est ajouté fin 2018 une nouvelle cartouche «LDC» qui différencie les cellules intactes de celles mortes ou endommagées (Live / Dead Cells). Cette dernière est aujourd'hui utilisée au Locle.

## Analyses en continu de l'eau du Locle

Les résultats donnés par le BactoSense ont permis à Viteos de faire d'intéressantes observations et découvertes sur la microbiologie de leur réseau. Comme on le voit sur la Figure 4, un pic de cellules totales (TCC) et de cellules intactes (ICC) se forme chaque nuit. Il intervient au démarrage de la station.

À ce moment-là, environ 100'000 cellules/ml pour les TCC et 40'000 pour les ICC sont mesurées. Lorsque le pompage progresse, ces nombres descendent à environ 60'000 pour les TCC et 15'000 pour les ICC. Il s'agit d'un relargage de cellules provoqué par la mise en service quotidienne de la station. Dans l'exemple choisi, on voit un pic de TCC le 15 novembre tandis que le nombre de cellules intactes reste stable. Dernièrement, l'analyse des données engrangées pendant ces premiers mois a permis d'établir un seuil d'alarme pour les TCC et autre pour les ICC. En cas de dépassement, un SMS est envoyé à la personne de piquet qui peut réagir en temps réel.

La Figure 5 montre en détail la semaine entre le 14 et le 21 novembre. Sur ce graphique les courbes du chlore libre et de la turbidité à la sortie de la station s'ajoutent aux TCC et ICC. Le même comportement cyclique est observé, avec des pics à 0.15 mg/l de chlore libre et de 0.03 FNU de turbidité au démarrage de la station, sans changement notable le 15 novembre.

Ces mesures permettent de conclure que malgré l'augmentation significative du

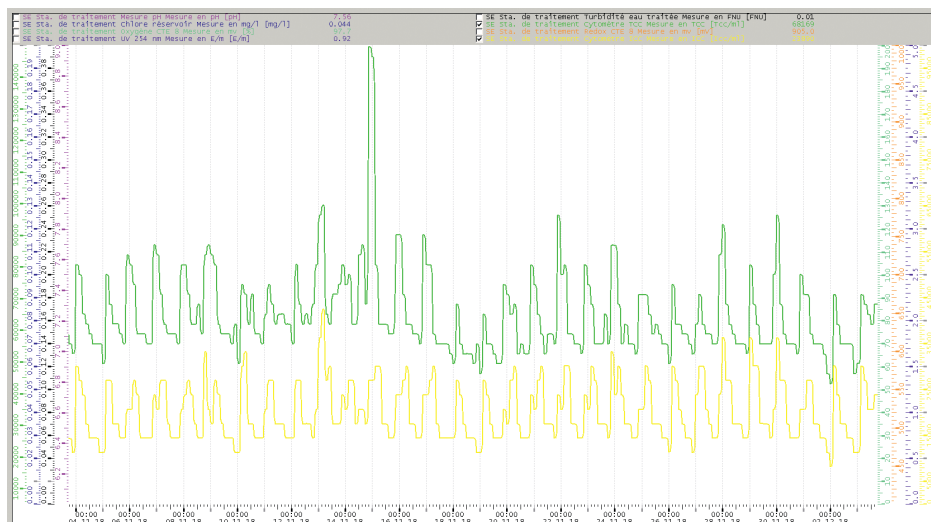


Figure 4 - Mesures en continu des cellules totales (TCC - en vert) et des cellules intactes (ICC - en jaune) enregistrées entre le 4 novembre et le 3 décembre 2018 au Locle.

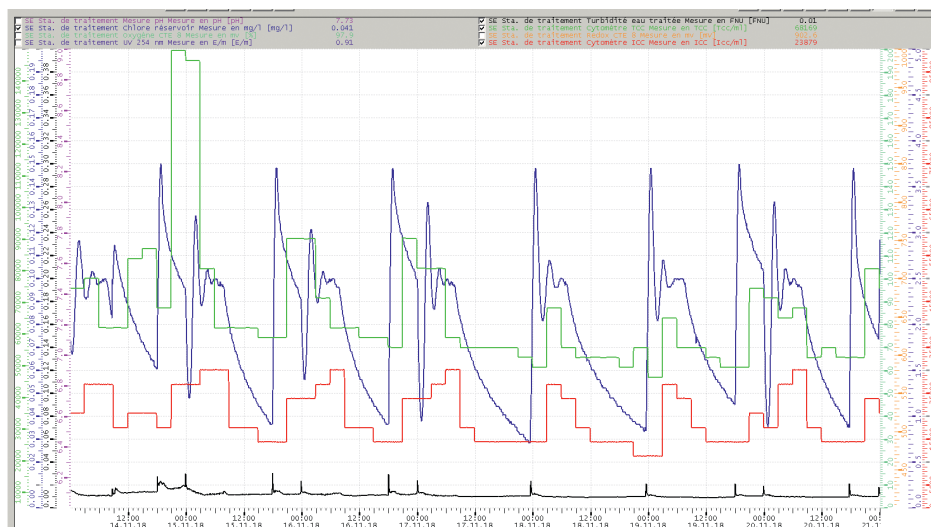


Figure 5 - Mesures en continu des cellules totales (TCC - en vert), des cellules intactes (ICC - en rouge), du chlore libre (bleu) et de la turbidité (noir) enregistrées entre le 14 et le 21 novembre 2018.

nombre de cellules la nuit du 15 novembre il n'y a pas eu de contamination. Les mesures élevées se sont normalisées et le niveau du chlore est remonté assez vite. Avant de prendre une décision, il est important de ne pas isoler un résultat, mais de combiner et interpréter l'ensemble des paramètres mesurés.

À défaut d'identifier spécifiquement des bactéries indicatrices de contamination fécale, le BactoSense permet de quantifier très exactement les cellules présentes dans l'eau et ainsi de révéler immédiatement une contamination ou un déficit dans le processus de traitement. L'analyse en continu des cellules donne la possibilité d'évaluer l'évolution de l'empreinte microbiologique et d'avertir dès qu'un changement survient dans l'eau. Si le nombre total de bactéries contenues dans une eau n'est pas inquiétant - il peut varier de 10'000 à plus de 1 million en fonction de sa source - une augmentation ou une modification de l'empreinte sur le graphique peut annoncer une potentielle contamination.

## Conclusion

Aujourd'hui la ville du Locle est équipée pour les imprévus et les situations exceptionnelles. Elle a combiné l'avancée de la technologie et les avantages de l'observation en continu pour transformer ses installations. Les différents appareils installés peuvent mesurer en ligne plusieurs paramètres dont la microbiologie en utilisant un cytomètre en flux automatique, le BactoSense (Figure 6). La ville délivre ainsi une eau irréprochable quelles que soient les conditions. En cas de dépassement des seuils prédéfinis, ces appareils déclenchent automatiquement des alarmes qui permettent de réagir en temps réel et de prendre immédiatement les mesures nécessaires. Une contamination majeure de l'eau reste improbable, mais les risques subsistent malgré ces précautions. C'est pourquoi la détection rapide à travers des appareils de mesure en continu avec l'émission d'alarmes dès que certains seuils sont

atteints est une composante indispensable de la gestion de l'eau. Dans ce sens, l'analyse microbiologique en ligne présente une bonne complémentarité à celle des paramètres physico-chimiques, tels que le pH, la conductivité, la turbidité et l'absorbance 254 nm.

L'utilisation depuis la fin du XIX<sup>e</sup> siècle de l'HPC a fait ses preuves jusqu'à présent. Maintenant qu'une solution plus exacte, précise et plus rapide existe, il serait judicieux d'adapter les normes en y intégrant la cytométrie en flux comme mesure de contrôle reconnue par la législation.

---

### Pour plus d'informations :

Pour toute question et pour d'autres références sur des développements ou applications de cytométrie de flux en réseau d'eau potable, vous pouvez contacter les auteurs :

[celine.jaeger@bnovate.com](mailto:celine.jaeger@bnovate.com)

[Marta.Cassarohainard@viteos.ch](mailto:Marta.Cassarohainard@viteos.ch)

bNovate Technologies SA  
[www.bNovate.com](http://www.bNovate.com)

Sigrist-Photometer AG  
[www.photometer.com](http://www.photometer.com)