



**HAL**  
open science

# Qualité de l'eau des zones d'activité nautique : influence sur la flore de l'écosystème buccal sur une population de surfeurs

Marie Lavaud

## ► To cite this version:

Marie Lavaud. Qualité de l'eau des zones d'activité nautique : influence sur la flore de l'écosystème buccal sur une population de surfeurs. Sciences du Vivant [q-bio]. 2019. dumas-02143394

**HAL Id: dumas-02143394**

**<https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-02143394>**

Submitted on 3 Jun 2019

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

**U.F.R. D'ODONTOLOGIE**

Année 2019

Thèse n°26

THESE POUR L'OBTENTION DU  
**DIPLOME D'ETAT de DOCTEUR EN CHIRURGIE  
DENTAIRE**

Présentée et soutenue publiquement

Par LAVAUD Marie

Né(e) le 02 Décembre 1993, à Royan

Le 30 Avril 2019

**QUALITE DE L'EAU DES ZONES D'ACTIVITE NAUTIQUE :  
INFLUENCE SUR LA FLORE DE L'ECOSYSTEME BUCCAL  
SUR UNE POPULATION DE SURFEURS**

Sous la direction du Docteur Marie-Cécile BADET

Membres du jury :

Professeur CATROS,

Sylvain

Président

Docteur SAMOT,

Johan

Rapporteur

Docteur D'Incau,

Emmanuel

Assesseur

# UNIVERSITE DE BORDEAUX

MAJ 01/02/2019

*Président* M. TUNON DE LARA Manuel  
*Directeur de Collège des Sciences de la Santé* M. PELLEGRIN Jean-Luc

## **COLLEGE DES SCIENCES DE LA SANTE UNITE DE FORMATION ET DE RECHERCHE DES SCIENCES ODONTOLOGIQUES**

*Directrice* Mme BERTRAND Caroline 58-01  
*Directeur Adjoint à la Pédagogie* Mr DELBOS Yves 56-01  
*Directeur Adjoint – Chargé de la Recherche* M. CATROS Sylvain 57-01  
*Directeur Adjoint – Chargé des Relations Internationales* M. LASSERRE Jean-François 58-01

### **ENSEIGNANTS DE L'UFR**

#### **PROFESSEURS DES UNIVERSITES**

Mme	Caroline	BERTRAND	Prothèse dentaire	58-01
Mme	Marie-José	BOILEAU	Orthopédie dento-faciale	56-01
M	Sylvain	CATROS	Chirurgie orale	57-01
M	Raphaël	DEVILLARD	Odontologie restauratrice et endodontie	58-01
Mme	Véronique	DUPUIS	Prothèse dentaire	58-01
M.	Bruno	ELLA NGUEMA	Sciences anatomiques et physiologiques - Biomatériaux	58-01
M.	Jean-Christophe	FRICAIN	Chirurgie buccale – Pathologie et thérapeutique	57-01

#### **MAITRES DE CONFERENCES DES UNIVERSITES**

Mme	Elise	ARRIVÉ	Prévention épidémiologie – Economie de la santé – Odontologie légale	56-02
Mme	Cécile	BADET	Sciences biologiques	57-01
M.	Etienne	BARDINET	Orthopédie dento-faciale	56-01
M.	Michel	BARTALA	Prothèse dentaire	58-01
M.	Cédric	BAZERT	Orthopédie dento-faciale	56-01
M.	Christophe	BOU	Prévention épidémiologie – Economie de la santé – Odontologie légale	56-02
Mme	Sylvie	BRUNET	Chirurgie buccale – Pathologie et thérapeutique	57-01
M.	Jacques	COLAT PARROS	Sciences anatomiques et physiologiques	58-01
M,	Jean-Christophe	COUTANT	Sciences anatomiques et physiologiques	58-01
M.	François	DARQUE	Orthopédie dento-faciale	56-01
M.	François	DE BRONDEAU	Orthopédie dento-faciale	56-01
M.	Yves	DELBOS	Odontologie pédiatrique	56-01
M,	Emmanuel	D'INCAU	Prothèse dentaire	58-01
M.	Dominique	GILLET	Odontologie conservatrice – Endodontie	58-01
M.	Jean-François	LASSERRE	Prothèse dentaire	58-01
M.	Yves	LAUVERJAT	Parodontologie	57-01
Mme	Odile	LAVIOLE	Prothèse dentaire	58-01
M.	Jean-Marie	MARTEAU	Chirurgie buccale – Pathologie et thérapeutique	57-01
Mme	Javotte	NANCY	Odontologie pédiatrique	56-01
M.	Adrien	NAVEAU	Prothèse dentaire	58-01
M.	Jean-François	PELI	Odontologie restauratrice – Endodontie	58-01
M.	Philippe	POISSON	Prévention épidémiologie – Economie de la santé – Odontologie légale	56-02

M.	Patrick	ROUAS	Odontologie pédiatrique	56-01
M.	Johan	SAMOT	Biologie Orale	57-01
Mme	Maud	SAMPEUR	Orthopédie dento-faciale	56-01
M.	Cyril	SEDARAT	Parodontologie	57-01
Mme	Noélie	THEBAUD	Sciences biologiques	57-01
M.	Eric	VACHEY	Odontologie conservatrice – Endodontie	58-01

#### **AUTRES ENSEIGNANTS**

Mme	Audrey	AUSSEL	Sciences anatomiques et physiologiques	58-01
Mme	Elsa	GAROT	Odontologie pédiatrique	56-01

#### **ASSISTANTS**

Mme	Mathilde	BOUDEAU	Odontologie conservatrice – Endodontie	58-01
M.	Wallid	BOUJEMAA AZZI	Odontologie conservatrice – Endodontie	58-01
Melle	Camille	BOULÉ-MONTPEZAT	Odontologie pédiatrique	56-01
Mlle	Anaïs	CAVARE	Orthopédie dento-faciale	56-01
M	Hubert	CHAUVEAU	Odontologie conservatrice – Endodontie	58-01
M,	Jean-Baptiste	CULOT	Fonctions/dysfonctions, imagerie, biomatériaux	58-01
M	Pierre-Hadrien	DECAUP	Fonctions/dysfonctions, imagerie, biomatériaux	58-01
Mme	Severine	DESCAZEAX	Odontologie conservatrice – Endodontie	58-01
Mme	Julia	ESTIVALS	Odontologie pédiatrique	56-01
M.	Cédric	FALLA	Prévention épidémiologie – Economie de la santé – Odontologie légale	56-02
Mme	Mathilde	FENELON	Chirurgie Orale	57-01
Mme	Agathe	GREMARE	Biologie orale	57-01
M	Mickaël	HYVERNAUD	Prothèse dentaire	58-01
Mme	Clémence	JAECK	Prothèse dentaire	58-01
Mme	Mathilde	JACQUEMONT	Parodontologie	57-01
Mme	Olivia	KEROUREDAN	Odontologie conservatrice – Endodontie	58-01
Mme	Claudine	KHOURY	Prévention épidémiologie – Economie de la santé – Odontologie légale	56-02
Mr	Antoine	LAFITTE	Orthopédie dento-faciale	56-01
M	Adrien	LASTRADE	Prothèse dentaire	58-01
M.	Emmanuel	MASSON REGNAULT	Chirurgie Orale	57-01
Mme	Marie	MÉDIO	Orthopédie dento-faciale	56-01
Mme	Aude	MENARD	Prothèse dentaire	58-01
M	Antoine	PEPELUT	Parodontologie	57-01
M	Florian	PITEU	Prothèse dentaire	58-01
Mr	Thibaut	ROULLAND	Prothèse dentaire	58-01
M.	François	ROUZÉ L'ALZIT	Prothèse dentaire	58-01
Mme	Rawen	SMIRANI	Parodontologie	57-01
Mme	Sophia	ZIANE	Odontologie conservatrice – Endodontie	58-01

# **REMERCIEMENTS**

**À notre Président de thèse,**

**Monsieur le Professeur CATROS;**

Professeur des Universités – Praticien Hospitalier

Sous-section Chirurgie-buccale pathologie thérapeutique 57-02

*Je vous remercie de l'honneur que vous me faites en acceptant de présider cette thèse.*

*Veillez trouver ici l'expression de ma reconnaissance, de ma gratitude, et la marque de mon profond respect.*

**À notre Directrice de thèse,**

**Mme le Docteur BADET ;**

Maître de Conférences des Universités - Praticien Hospitalier Sous  
section Sciences biologiques 57-01

*Je tiens à vous exprimer mes remerciements les plus sincères  
pour la patience, la bienveillance et la disponibilité dont vous  
avez fait preuve.*

*Votre soutien et votre rigueur ont été précieux  
tout au long de la réalisation de ce travail.*

*Veillez trouver ici l'expression de ma reconnaissance, de ma  
gratitude, et la marque de mon profond respect.*

**À notre rapporteur,**

**Monsieur le Docteur SAMOT ;**

Maître de Conférences des Universités - Praticien Hospitalier Sous  
section Sciences biologiques 57-01

*Je tiens à vous exprimer mes remerciements les plus sincères  
pour avoir accepté d'être le rapporteur de cette thèse.*

*Je vous remercie pour votre sympathie tant au laboratoire  
que lors des vacations hospitalières, ce fut un plaisir de  
travailler avec vous.*

*Veillez trouver ici l'expression de ma reconnaissance et de  
mon profond respect.*

**À notre assesseur,**

**Monsieur le Docteur D'INCAU ;**

Maître de Conférences des Universités - Praticien Hospitalier Sous  
section Prothèse dentaire 58-01

*Je tiens à vous exprimer mes remerciements les plus sincères  
pour avoir accepté de faire partie du jury de cette thèse.*

*Ce fut un plaisir de vous avoir comme professeur, tant à la  
faculté que lors des vacations hospitalières. Vous partagez vos  
connaissances avec humour et bienveillance ; je vous en  
remercie.*

*Veillez trouver ici l'expression de ma reconnaissance, de ma  
gratitude, et la marque de mon profond respect.*

# TABLE DES MATIERES

<b>INTRODUCTION</b> .....	1
<b>I. ECOSYSTEME BUCCAL</b> .....	2
<b>1. Généralités</b> .....	2
<b>2. Les pathologies bucco-dentaires</b> .....	3
1) Cariogenèse .....	3
2) Parodontopathogenèse .....	3
<b>II- LES RISQUES SANITAIRES ASSOCIES A LA QUALITE DE L'EAU</b> .....	5
<b>1. La pollution des zones d'activité nautique</b> .....	5
1) Pollution océanique .....	5
2) La législation en France et dans l'Union Européenne .....	5
a. Historique .....	5
b. La directive européenne 2006/7/CE .....	5
c. Contrôle de la qualité des eaux de baignade en France .....	7
<b>2. Exposition à la pollution des zones d'activité nautique et risques sanitaires</b> .....	8
1) Historique .....	8
2) Association entre la baignade en mer et les pathologies infectieuses .....	8
a. Pathologies infectieuses associées .....	8
b. Microorganismes pathogènes .....	11
c. Facteurs de risque concernant la pollution .....	11
d. Les limites du contrôle de la qualité des eaux .....	12
3) Antibiorésistance .....	13
4) Les microplastiques .....	14
<b>3. Le surf, une activité à risque ?</b> .....	14
1) Surf et exposition à la pollution des eaux des zones d'activité nautique .....	14
2) Ingestion d'eau .....	15

3) Surf et antibiorésistance .....	16
<b>III- RECHERCHE EXPERIMENTALE</b> .....	18
<b>1. Objectifs</b> .....	18
<b>2. Matériel et méthode</b> .....	18
1) Critères d'inclusion et critères d'exclusion .....	18
2) Prélèvements .....	19
3) Traitement des échantillons .....	19
a. Mise en culture .....	19
b. Observation des géloses .....	20
c. Coloration de Gram, observation au microscope optique.....	20
4) Mise en culture en milieu liquide.....	21
5) Test de la catalase .....	21
6) Identification par méthode biochimique : les galeries API.....	21
a. Streptocoques .....	21
b. Lecture de la galerie API 20 Strep et interprétation .....	21
c. Entérocoques .....	22
d. Lecture et interprétation de la galerie .....	22
7) Identification par méthode de biologie moléculaire : Réaction en chaîne par polymérase ..	23
a. La réaction en chaîne par polymérase .....	23
b. Composition du mix <sup>(104)</sup> .....	23
8) Électrophorèse <sup>(104)</sup> .....	25
9) Révélation de l'ADN .....	25
10) Antibiotogrammes .....	25
<b>IV RESULTATS</b> .....	27
<b>1. Description de la population</b> .....	27
1) Âge, sexe et catégorie socio-professionnelle .....	27
2) Anamnèse .....	28
3) Habitudes de consommation.....	30
4) État de santé bucco-dentaire .....	30
5) Surf.....	31
<b>2. Traitement des échantillons</b> .....	32

1) Mise en culture.....	32
2) Coloration de Gram.....	33
<b>3. Étapes d'identification.....</b>	<b>37</b>
1) Résultats des galeries API 20 Strep et API 20 E.....	37
2) Résultats des PCR.....	40
<b>4. Résultats des antibiogrammes.....</b>	<b>42</b>
<b><u>DISCUSSION</u>.....</b>	<b>44</b>
<b><u>CONCLUSION</u>.....</b>	<b>46</b>
<b><u>BIBLIOGRAPHIE</u>.....</b>	<b>47</b>
<b><u>ANNEXES</u>.....</b>	<b>55</b>

# LISTE DES TABLEAUX

<b>Tableau 1</b>	Qualité de l'eau des zones de baignade d'après la directive 2006/7/CE.....	6
<b>Tableau 2</b>	Association entre la baignade et différents symptômes, avec ou sans immersion de la tête d'après Leonard.....	9
<b>Tableau 3</b>	Association entre le surf après de fortes précipitations et différents symptômes.....	10
<b>Tableau 4</b>	Principaux pathogènes pouvant être retrouvés dans les eaux de baignade, d'après Pond.....	11
<b>Tableau 5</b>	Résultat des prélèvements pendant la période de transition (A) et pour la directive européenne 2006/7/CE (B) d'après Leonard.....	16
<b>Tableau 6</b>	Composition du mix pour la PCR des streptocoques des groupes <i>salivarius</i> et <i>mutans</i> .....	23
<b>Tableau 7</b>	Amorces pour la PCR des streptocoques des groupes <i>salivarius</i> et <i>mutans</i> .....	24
<b>Tableau 8</b>	Les cycles de PCR pour les streptocoques des groupes <i>salivarius</i> et <i>mutans</i> .....	24
<b>Tableau 9</b>	Âge, sexe et catégorie socio-professionnelle du groupe « surfeurs ».....	27
<b>Tableau 10</b>	Âge, sexe et catégorie socio-professionnelle du groupe « témoins ».....	28
<b>Tableau 11</b>	Etat de santé du groupe « surfeurs ».....	29
<b>Tableau 12</b>	Etat de santé du groupe « témoins ».....	29
<b>Tableau 13</b>	Colonies conservées dans le groupe « surfeurs ».....	34
<b>Tableau 14</b>	Colonies conservées dans le groupe « témoins ».....	35
<b>Tableau 15</b>	Répartition et comptage des staphylocoques .....	37
<b>Tableau 16</b>	Résultats des galeries API 20 Strep dans le groupe « surfeurs » .....	38
<b>Tableau 17</b>	Résultats des galeries API 20 Strep dans le groupe « témoins » .....	38
<b>Tableau 18</b>	Résultats des galeries API 20 E .....	39
<b>Tableau 19</b>	Répartition et comptage des entérobactéries retrouvées dans le groupe « surfeurs » .....	39
<b>Tableau 20</b>	Colonies identifiées comme <i>Streptococcus salivarius</i> .....	41
<b>Tableau 21</b>	Résultats des antibiogrammes des staphylocoques du groupe « surfeurs ».....	42
<b>Tableau 22</b>	Résultats des antibiogrammes des staphylocoques du groupe « témoins ».....	43

# LISTE DES FIGURES

<b>Figure 1</b>	Qualité de l'eau dans l'Union Européenne : information du public.....	7
<b>Figure 2</b>	Qualité de l'eau des zones de baignade en France en 2017.....	7
<b>Figure 3</b>	Association entre la surf et différents symptômes, d'après le SCWCRP.....	10
<b>Figure 4</b>	Nombre moyen d'ECRC3G ingéré par les adultes selon le type d'exposition pour la période de transition (A) et pour la directive européenne 2006/7/CE (B) d'après Leonard.....	16
<b>Figure 5</b>	Croissance des colonies sur les différentes géloses.....	20
<b>Figure 6</b>	Galerie API 20 Strep.....	22
<b>Figure 7</b>	Galerie API 20E.....	23
<b>Figure 8</b>	Antibiogramme réalisé sur gélose au sang.....	26
<b>Figure 9</b>	Nombre de sessions de surf hebdomadaires.....	31
<b>Figure 10</b>	Symptômes ayant été ressentis après une session de surf.....	31
<b>Figure 11</b>	Répartition des colonies sur les différentes géloses.....	32
<b>Figure 12</b>	Répartition des colonies de staphylocoques.....	36
<b>Figure 13</b>	Résultat de la PCR pour <i>Streptococcus salivarius</i> .....	40
<b>Figure 14</b>	Antibiorésistance des staphylocoques.....	43

# LISTE DES ABREVIATIONS

<b>ml</b>	millilitre
<b>PAE</b>	Pellicule Acquise Exogène
<b>mg</b>	milligramme
<b>UE</b>	Union Européenne
<b>OMS</b>	Organisation Mondiale pour la Santé
<b>ARS</b>	Agence Régionale de Santé
<b>AEE</b>	Agence Européenne pour l'Environnement
<b>UFC</b>	Unité Formant Colonie
<b>SCCWRP</b>	Southern California Coastal Water Research Project
<b>BLSE</b>	Beta Lactamases à Spectre Etendu
<b>SARM</b>	<i>Staphylococcus aureus</i> résistants à la méthicilline
<b>C3G</b>	Céphalosporines de Troisième Génération
<b>ECRC3G</b>	<i>Escherichia Coli</i> Résistantes aux Céphalosporines de troisième Génération
<b>INVS</b>	Institut National de Veille Sanitaire
<b>nm</b>	nanomètre
<b>mm</b>	millimètre
<b>FFS</b>	Fédération Française de Surf
<b>µl</b>	microlitres
<b>MSA</b>	Mannitol Salt Agar
<b>TS</b>	Trypticase Soja
<b>WCA</b>	Wilkins and Chalgren Anaerobe
<b>PCR</b>	Polymerase Chain Reaction
<b>V</b>	Volt
<b>CMI</b>	Concentration Minimale Inhibitrice



# INTRODUCTION

L'écosystème buccal est un écosystème riche, complexe, dont l'équilibre est fragile. Plusieurs centaines d'espèces bactériennes cohabitent sur différentes niches écologiques. La flore de l'écosystème buccal est une flore en renouvellement constant, en équilibre avec son environnement. Les conditions locales peuvent être influencées par notre mode de vie. Véritable carrefour entre le tube digestif et le milieu extérieur, la cavité buccale est une porte d'entrée, mais aussi un réservoir potentiel pour les microorganismes pathogènes de notre environnement.

Bien qu'il soit encore mal compris, le rôle de l'environnement comme vecteur de contamination est de plus en plus étudié. Une de ces expositions environnementales pourrait provenir des eaux des zones d'activité nautique. Avec un taux estimé à plus d'un million de bactéries par millilitre d'eau de mer, et de dix à cent fois plus de particules virales, l'océan représente une source potentielle de pathologies infectieuses chez l'homme.

De nombreuses études épidémiologiques se sont intéressées aux pathologies associées à la baignade en eau de mer : gastroentérites, infections respiratoires, infections cutanées et ophtalmologiques, etc...et aux microorganismes pathogènes présents dans l'eau et potentiellement résistants aux antibiotiques (*Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*...).

Si la baignade est l'activité récréative la plus commune dans les eaux des zones d'activité nautique, certains auteurs s'intéressent à des activités comme le surf qui, de part leurs expositions fréquentes et prolongées à l'eau de mer, ainsi qu'aux nombreuses immersions de la tête pourraient être plus à risque.

Cependant, bien que la cavité buccale soit une porte d'entrée pour les microorganismes pathogènes et que l'ingestion d'eau soit une des voies de contamination principales de cette exposition, aucune étude ne s'est, à notre connaissance, penchée sur l'influence de la pollution des eaux des zones d'activité nautique sur la flore de l'écosystème buccal.

L'objectif de notre travail est de rechercher la présence de bactéries pathogènes ou marqueurs de pollution fécale présentes dans les eaux de baignade mais aussi d'étudier l'influence de cette exposition sur les bactéries associées à un bon état de santé bucco-dentaire (*Streptococcus salivarius*, *Veillonella*) ou associées à des pathologies bucco-dentaires (*Streptococcus mutans*), au sein d'une population de surfeurs comparée à un groupe témoin.

# I. ECOSYSTEME BUCCAL

## 1. Généralités

L'écosystème buccal est un écosystème complexe et à l'équilibre fragile. La flore de l'écosystème buccal est composée de différents microorganismes : plusieurs centaines d'espèces bactériennes, des parasites eucaryotes, des levures, des virus mais aussi des mycoplasmes. Cet écosystème associe différentes niches écologiques, avec des surfaces dures, comme les dents, ou des surfaces molles, comme la langue et les muqueuses, qui peuvent être kératinisées ou non. La flore buccale se modifie au cours de la vie de manière physiologique pendant la puberté, la grossesse, la ménopause, mais peut aussi se modifier en relation avec des pathologies, locales ou systémiques <sup>(1,2)</sup>.

Socranski et Manganiello ont décrit, en 1971 quatre sites écologiques majeurs au sein de la cavité buccale <sup>(3)</sup> : la salive, la langue, les muqueuses et les surfaces dentaires.

La salive est très riche en microorganismes. Près de  $10^9$  bactéries sont retrouvées par millilitres (ml) de salive, appartenant à plus de 700 espèces bactériennes mais aussi des mycoplasmes, des levures, des protozoaires et des virus <sup>(4,5)</sup>. La face dorsale de la langue présente une flore unique, constituant environ un tiers de la population bactérienne présente dans la cavité buccale <sup>(6)</sup>. La flore linguale prédominante se compose principalement de streptocoques et notamment des groupes *salivarius* et *mitis*. Certaines espèces de *Neisseria*, d'*Actinomyces*, de *Veillonella*, de *Bacteroides*, de *Fusobacterium* et de *Peptostreptococcus* sont également présentes. Enfin, plusieurs études ont montré qu'un large éventail d'espèces bactériennes dont *Treponema denticola*, *Porphyromonas gingivalis*, *Tannerella forsythia*, *Prevotella intermedia*, *Fusobacterium nucleatum* et *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* sont détectables à la surface de la langue <sup>(4)</sup>. Certaines bactéries (*Porphyromonas gingivalis*, *Tannerella forsythia* et *Prevotella intermedia*) sont d'ailleurs retrouvées plus fréquemment dans les échantillons d'enduit lingual que dans les échantillons de plaque.

Le biofilm dentaire, ou plaque dentaire, se forme sur une structure particulière, la pellicule acquise exogène (PAE). En effet, peu après le brossage, un fin film organique composé de mucines, de glycoprotéines et de protéines provenant de la salive et du fluide gingival se dépose sur les surfaces dentaires. Plusieurs étapes sont indispensables à la formation du biofilm <sup>(7,8)</sup> : Ces étapes sont soumises à une chronologie particulière, dépendante des propriétés d'adhésion des différentes espèces bactériennes présentes. Des espèces pionnières dont *Streptococcus* et *Actinomyces* adhèrent à la pellicule acquise exogène. Des différences inter-espèces existent : ainsi, les streptocoques des groupes *gordonii*, *oralis* et *mitis* adhèrent plus facilement à la pellicule acquise exogène que les streptocoques du groupe *mutans* <sup>(7,9)</sup>. Grâce à des propriétés de co-adhérence bactérienne, de nouvelles espèces colonisent le biofilm <sup>(10)</sup> (*Fusobacterium*, *Haemophilus*, *Porphyromonas*, *Lactobacillus*, *Veillonella*...), et contribuent à son développement par des phénomènes de division cellulaire et de co-aggrégation. En l'absence de brossage, il atteint son équilibre en deux à trois semaines et jusqu'à  $10^9$  bactéries peuvent être retrouvées par milligramme (mg) de plaque <sup>(11)</sup>. Enfin, sous l'effet de variations environnementales, des bactéries se détachent du biofilm et colonisent d'autres surfaces.

Le biofilm, riche et complexe, est constitué d'une flore stable, en constant renouvellement, et en équilibre avec son environnement. La rupture de cette homéostasie, ou dysbiose, est liée aux pathologies microbiennes de la cavité buccale.

## **2. Les pathologies bucco-dentaires**

### **1) Cariogénèse** <sup>(12-16)</sup>

La carie dentaire est une pathologie bactérienne multifactorielle se manifestant par une déminéralisation des tissus durs de la dent. La déminéralisation est causée par la production d'acides par les bactéries fermentaires qui se trouvent dans le biofilm. La production d'acides est liée à l'alimentation, et notamment aux apports d'hydrates de carbone (saccharose, glucose, fructose...). La fermentation des sucres diminue le pH au niveau des dents. Dans des conditions normales, la baisse du pH est compensée par le pouvoir tampon de la salive. Cependant, dans des conditions de prises alimentaires fréquentes ou d'une alimentation excessivement sucrée, le pouvoir tampon de la salive ne permet plus de rééquilibrer le pH. Le pH est alors durablement diminué au sein du biofilm. Dans des conditions normales, le pH est d'environ 6,5-7. Lorsqu'il atteint la valeur critique de 5,5, l'hydroxyapatite est irrémédiablement détruite. De plus, l'acidification du milieu sélectionne les bactéries dites aciduriques. Les streptocoques du groupe mutans et les lactobacilles sont les principales bactéries profitant de ce changement. Les streptocoques *mutans*, les lactobacilles et *Actinomyces* sont les principales bactéries cariogènes. *S. mutans* devient dominant alors qu'il ne représentait qu'une faible proportion des colonisateurs précoces.

L'étiologie de la maladie carieuse est donc une rupture de l'équilibre entre déminéralisation et reminéralisation.

### **2) Parodontopathogénèse** <sup>(15,17-24)</sup>

Les maladies parodontales sont les pathologies inflammatoires affectant les tissus de soutien de la dent. Le parodonte est composé de quatre tissus de soutien de la dent : la gencive, l'os alvéolaire, le desmodonte et le cément. La gingivite correspond à une inflammation réversible limitée à la gencive. Loe a prouvé que cette inflammation était directement liée à la plaque dentaire <sup>(17)</sup>. La parodontite quant à elle correspond à une destruction irréversible de l'os alvéolaire et de l'attache épithélio-conjonctive. Cette attache détruite migre en direction apicale. Le sulcus, qui à l'état physiologique n'excède pas deux à trois millimètres de profondeur se transforme en une poche parodontale qui témoigne de la perte d'attache.

Le passage d'un parodonte sain à la maladie parodontale s'accompagne d'une transformation de la flore : la dérive anaérobie <sup>(18)</sup>. La flore devient plus riche en bactéries anaérobies et en bactéries à Gram négatif. Les espèces les plus fréquemment retrouvées dans les maladies parodontales sont *Fusobacterium nucleatum* et *Porphyromonas gingivalis*. Une co-agrégation entre ces deux espèces augmenterait leur pathogénicité <sup>(25,26)</sup>. Le sulcus sain contient une flore peu nombreuse, composée majoritairement de bactéries aérobies ou anaérobies facultatives à Gram positif. Des bactéries à Gram négatif (*Fusobacterium*, *Leptotrichia*, *Tannerella*) peuvent être présentes, mais en faible quantité. Dans une gingivite chronique, bien qu'elle reste prépondérante, la proportion des bactéries à Gram positif diminue au profit des bactéries à Gram négatif et des anaérobies strictes (*Fusobacterium nucleatum*, *Prevotella intermedia*, *Porphyromonas gingivalis*...). Le passage de la gingivite à la parodontite s'accompagne de la dérive anaérobie. La flore des poches parodontales est plus dense que

celle de la gingivite et présente une forte proportion de bactéries anaérobies à Gram négatif, de bactéries mobiles, dont 30% sont des spirochètes.

La flore de l'écosystème buccal, comme tous les microbiotes humains, varie avec son environnement. Les conditions locales peuvent être influencées par notre mode de vie <sup>(27)</sup> (hygiène, régime alimentaire, tabac <sup>(28)</sup>...), notre lieu de vie <sup>(29)</sup>... et évoluent au cours de la vie <sup>(3)</sup>. Les liens entre l'écosystème buccal et certaines pathologies systémiques ne sont plus à démontrer <sup>(30,31)</sup>. Carrefour entre le tube digestif et le milieu extérieur, la cavité buccale peut servir de réservoir pour la diffusion systémique de microorganismes pathogènes <sup>(32)</sup>. Bien qu'il soit considéré comme l'une des voies de transmission de microorganismes pathogènes possibles, le rôle de l'environnement extérieur est encore peu étudié <sup>(33)</sup>.

## **II- LES RISQUES SANITAIRES ASSOCIES A LA QUALITE DE L'EAU**

### **1. La pollution des zones d'activité nautique**

#### **1) Pollution océanique**

La pollution des océans est un problème lié à l'activité humaine. 75% de la pollution marine est d'origine continentale. Les sources de la pollution marine sont multiples :

- pollution organique : bactéries provenant des eaux usées non traitées, des rejets agricoles, des débordements des systèmes de traitement des eaux usées, des écoulements urbains...
- pollution chimique : hydrocarbures, détergents, métaux lourds... provenant des activités urbaines, domestiques et industrielles.
- pollution mécanique : pollution majoritairement constituée de macro déchets, souvent transportés par les rivières.
- pollution biologique : une espèce animale ou végétale envahit un milieu et met en danger les espèces endémiques
- pollution radioactive : éléments radioactifs provenant des centrales nucléaires.

#### **2) La législation en France et dans l'Union Européenne**

##### **a. Historique**

La première législation européenne concernant la qualité des eaux de baignade est la directive européenne n°76-160 du 8 Décembre 1975 <sup>(34)</sup> . Après une concertation dans les années 2000 <sup>(35)</sup>, une nouvelle directive, la directive 2006/7/CE <sup>(36)</sup> remplace la directive de 1975 en la renforçant et en la modernisant. La notion de profil des eaux de baignade est introduite, et ces profils ont été établis au plus tard en 2011. La directive 2006/7/CE prend effet au 1er Janvier 2015. À la fin de la saison de baignade, toutes les eaux de baignade monitorées de l'Union Européenne (UE) doivent être de qualité au moins suffisante. Cette directive sera abrogée au plus tard en 2020, sur la base du résultat de nouvelles études épidémiologiques, des recommandations de l'Organisation Mondiale pour la Santé (OMS), des progrès scientifiques et des observations des états membres.

##### **b. La directive européenne 2006/7/CE**

Le parlement européen a défini la pollution comme "*l'introduction directe ou indirecte, par suite de l'activité humaine, de substances ou de chaleur dans l'air, l'eau ou le sol, susceptibles de porter atteinte à la santé humaine ou à la qualité des écosystèmes aquatiques ou des écosystèmes terrestres dépendants directement des écosystèmes aquatiques, qui entraînent des détériorations aux biens matériels, une détérioration ou une entrave à l'agrément de l'environnement ou à d'autres utilisations légitimes de ce dernier.*" <sup>(36)</sup> .

Les normes de qualité environnementale européennes définissent la concentration d'un polluant ou d'un groupe de polluants dans l'eau, les sédiments ou le biote qui ne doit pas être dépassée, afin de protéger la santé humaine et l'environnement.

La directive européenne organise le contrôle de la qualité de l'eau des zones de baignade et a mis en place des indicateurs microbiologiques afin de mesurer la qualité de l'eau. Il s'agit de germes témoins d'une contamination fécale, qui traduisent la probabilité de la présence de germes pathogènes. Les bactéries recherchées sont les *Escherichia coli* et les entérocoques intestinaux. Les résultats des analyses sont comparés aux seuils de qualité et permettent de classer les eaux de baignade selon leur qualité. En cas de dépassement, la baignade peut être interdite par arrêté municipal ou préfectoral.

Bien que les indicateurs de pollution fécale ne permettent pas de connaître précisément les pathogènes présents, et que la corrélation entre la présence de microorganismes indicateurs de pollution fécale et la présence de pathogènes dépendent de nombreux facteurs (résistance à l'environnement, schéma de diffusion, croissance, etc...)<sup>(37)</sup>, des études épidémiologiques ont établi une relation significative entre l'exposition aux microorganismes indicateurs de pollution fécale dans les eaux des zones d'activité nautique et une baisse de la santé publique<sup>(38)</sup>, ce qui a conduit à une pression législative sur les états membres de l'UE pour maintenir et améliorer la qualité de l'eau.

Les entérocoques intestinaux et les *Escherichia coli* sont mesurés en unités formant colonie (UFC) dans 100 millilitres (ml) d'eau. Pour les eaux de qualité « excellente » et « bonne », le classement se fait par une évaluation au 95<sup>ème</sup> percentile de la fonction normale de densité de probabilité log10 des données microbiologiques. L'hypothèse est faite que les résultats des quatre années précédentes suivent statistiquement une loi normale. Le 95<sup>ème</sup> percentile est la valeur à laquelle 95% des résultats des prélèvements sont inférieurs aux seuils définis.

Les pays membres de l'Union Européenne doivent respecter un seuil maximal de 100 UFC/100ml pour les entérocoques intestinaux, et de 250 UFC/100ml pour *Escherichia coli* (Tableau 1).

Paramètres	A Excellente qualité	B Bonne qualité	C Quantité suffisante	D Qualité insuffisante
Entérocoques intestinaux (UFC/100mL)	100*	200*	185**	>185**
<i>Escherichia Coli</i> (UFC/100mL)	250*	500*	500**	>500**

\* : évaluation au 95<sup>e</sup> percentile

\*\* : évaluation au 90<sup>e</sup> percentile

Tableau 1- Qualité de l'eau des zones de baignade, d'après la directive européenne 2006/7/CE<sup>(36)</sup>

Dans une volonté d'information et d'éducation du public, la Commission Européenne a défini des symboles pour représenter la qualité des eaux de baignade par un nombre d'étoiles afin d'améliorer l'information du public. Ces symboles sont utilisés depuis 2014 (Figure 1).

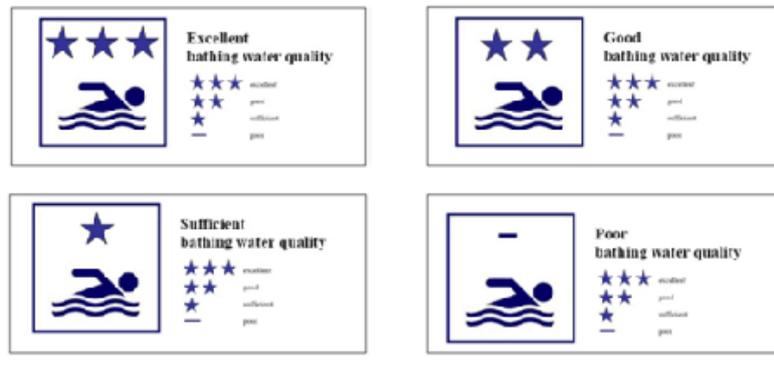


Figure 1- Qualité de l'eau dans l'Union Européenne : information du public

### c. Contrôle de la qualité des eaux de baignade en France

. En France, le contrôle sanitaire des eaux de baignade est mis en œuvre par les Agences Régionales de Santé (ARS), qui se basent sur la réglementation du ministère chargé de la santé. Les critères français sont basés sur les directives européennes <sup>(35,36,39)</sup>. Le contrôle sanitaire est réalisé sur un ensemble de sites de baignade déterminés comme des zones accessibles au public où la baignade est habituellement pratiquée par un nombre important de baigneurs, à l'exception des sites faisant l'objet d'un arrêté d'interdiction. Des échantillons sont prélevés en un point de surveillance défini par l'ARS et le gestionnaire, à un endroit où la fréquentation est maximale. Les prélèvements sont réalisés pendant la saison balnéaire uniquement, généralement du 15 juin au 15 septembre. Les prélèvements doivent être réalisés dix à vingt jours avant l'ouverture de la saison, puis au moins deux fois par mois pendant la saison de baignade. Pour les zones de baignade jugées excellentes les deux années précédentes, le contrôle peut être réduit à un prélèvement mensuel pendant la saison.

En France, le contrôle sanitaire des sites de baignade en mer concerne trente départements et 2 074 sites de baignade. 26 733 prélèvements ont été réalisés en 2017 <sup>(40)</sup>. L'évolution de la qualité des eaux de baignade en mer est positive depuis l'application de la directive européenne (Figure 2). En effet, d'après l'Agence Européenne pour l'Environnement (AEE) de 2013 à 2017, le taux de sites de qualité «excellente» a augmenté d'environ 74% à près de 80%, et le nombre de sites de qualité «insuffisante » a diminué, passant de près de 5% à moins de 3,5% <sup>(40)</sup>.

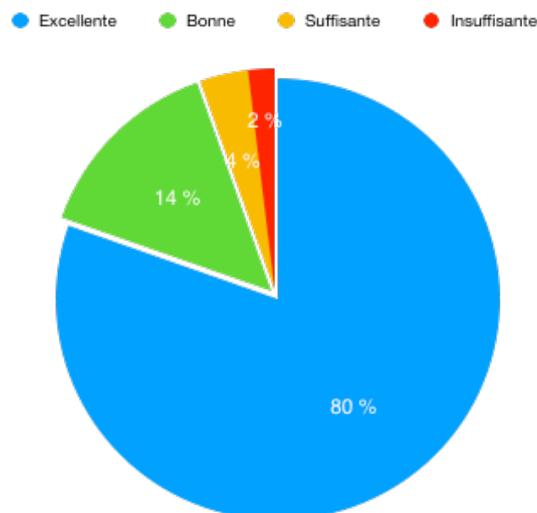


Figure 2- Qualité de l'eau des zones de baignade en France en 2017 d'après l'Agence Européenne pour l'Environnement <sup>(40)</sup>

## **2. Exposition à la pollution des zones d'activité nautique et risques sanitaires**

### **1) Historique**

L'épidémiologie des risques sanitaires associés à la baignade débute dans les années 50, notamment aux États Unis et au Royaume Uni <sup>(41)</sup>. Ces premières études établissent un lien entre l'association aux entérocoques et à *Escherichia coli* et les gastro-entérites chez les baigneurs. De ce fait, les entérocoques et *Escherichia coli* ont été largement utilisés pour monitorer la qualité des eaux de baignade. Depuis, de nouvelles études ont été menées, explorant différents indicateurs de pollution fécales, différents usages des zones d'activité nautiques et différents environnements. Les études réalisées entre les années 1990 et 2010 ont été utilisées pour développer des lignes directrices et les standards pour limiter les risques sanitaires liés à l'exposition à l'eau de mer <sup>(36,42,43)</sup>.

### **2) Association entre la baignade en mer et les pathologies infectieuses**

#### **a. Pathologies infectieuses associées**

Les pathologies infectieuses associées à la baignade dans les eaux de mer sont majoritairement des pathologies gastrointestinales. La gastroentérite, avec ses divers symptômes (mal de ventre, diarrhées, nausées, vomissement...), est l'affection la plus commune <sup>(44,45)</sup>. Sont également retrouvées des douleurs et/ou des infections sinusiennes, des douleurs ou des infections auriculaires, des infections des voies respiratoires supérieures, des conjonctivites, des infections cutanées et de la fièvre <sup>(44-46)</sup>.

En 2018, Leonard réalise une méta-analyse intitulée Is it safe to go back in the water ? <sup>(38)</sup> compilant les données de 19 études sur l'association entre l'exposition à l'eau des zones d'activité nautique et le risque de pathologie. En 2003, une revue systématique de la littérature menée par Wade <sup>(47)</sup> sur 27 études épidémiologiques avait déjà démontré que les microorganismes indicateurs de pollution fécale, *Escherichia coli* et les entérocoques étaient plus corrélés avec le risque de pathologie gastro-intestinale après exposition à l'eau de mer que les autres microorganismes indicateurs de pollution fécale ayant été étudiés (notamment les coliformes fécaux et *Pseudomonas sp...*). En se basant sur des études récentes, Leonard recherche si les baigneurs sont plus à même d'expérimenter des symptômes de pathologie infectieuse après une exposition aux eaux des zones d'activité nautique comparé à des non baigneurs.

Les résultats de cette revue de la littérature prouve qu'il existe un risque plus élevé d'expérimenter des symptômes de pathologies infectieuses, notamment gastro-intestinales mais aussi auditives chez les baigneurs que chez les non baigneurs. L'étude précise également que l'immersion de la tête renforce ce risque (Tableau 2).

Symptômes	Baigneurs Odds Ratio (95% CI)	P	Immersion de la tête Odds Ratio (95% CI)	P
<b>Symptômes de n'importe quelle pathologie</b>	1,86	0,001	1,91	<0,001
<b>Symptômes auditifs</b>	2,05	<0,001	1,79	0,006
Douleurs aux oreilles	1,77	0,004	1,64	0,02
Écoulements auditifs	1,16	0,91	/	/
<b>Symptômes de pathologie gastro-intestinale</b>	1,29	<0,001	1,35	<0,001
Diarrhée	1,44	<0,001	1,54	<0,001
Nausées	1,02	0,85	1,16	0,10
Douleurs à l'estomac	1,27	0,004	1,31	<0,001
Vomissements	1,04	0,85	1,07	0,72

Tableau 2- Association entre la baignade et différents symptômes, avec ou sans immersion de la tête, d'après Leonard <sup>(38)</sup>

Aux Etats-unis, une étude de cohorte a été menée par le Southern Californian Coastal Water Research Project (SCCWRP) pendant trois ans sur plus de 650 surfeurs et publiée en 2016. Totalisant plus de 10 000 sessions de surf, elle étudie le risque associé à l'exposition à l'eau de mer chez les surfeurs, et notamment après de fortes précipitations <sup>(48)</sup>. Plusieurs symptômes sont recherchés après une session de surf : des symptômes gastro-intestinaux tels que les diarrhées, vomissements, douleurs d'estomac, mais aussi des douleurs ou infection des sinus, de la gorge, des oreilles, des yeux, irritation cutanée, des pathologies des voies respiratoires supérieures... Pour tous ces symptômes, le risque est augmenté chez les surfeurs (Figure 3), et encore plus si la session de surf s'est déroulée pendant ou après de fortes précipitations (Tableau 3).

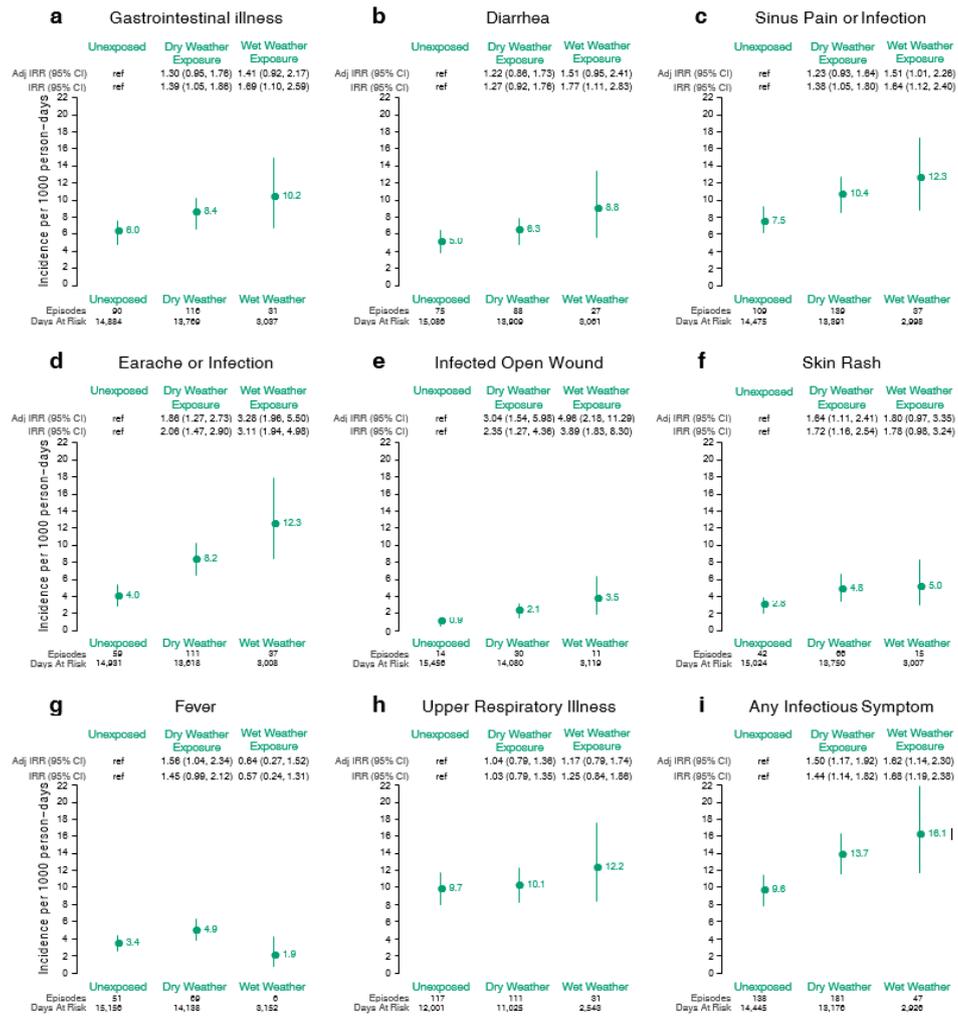


Figure 3- Association entre le surf et différents symptômes, d'après le SCCWRP <sup>(48)</sup>

	Unexposed Periods		Ocean Exposure, Past 3 Days		Unadjusted IRR (95% CI)	Adjusted <sup>b</sup> IRR (95% CI)
	Episodes/days at risk	Rate <sup>a</sup>	Episodes/days at risk	Rate <sup>a</sup>		
Gastrointestinal illness	90/14,884	6.0	147/16,806	8.7	1.45 (1.10, 1.91)	1.33 (0.99, 1.78)
Diarrhea	75/15,086	5.0	115/16,970	6.8	1.36 (1.00, 1.86)	1.29 (0.93, 1.79)
Sinus pain or infection	109/14,475	7.5	176/16,389	10.7	1.43 (1.11, 1.83)	1.28 (0.98, 1.68)
Earache or infection	59/14,931	4.0	148/16,626	8.9	2.25 (1.60, 3.16)	2.19 (1.49, 3.21)
Infection of open wound	14/15,456	0.9	41/17,199	2.4	2.63 (1.45, 4.77)	3.28 (1.68, 6.43)
Skin rash	42/15,024	2.8	81/16,757	4.8	1.73 (1.19, 2.51)	1.67 (1.15, 2.42)
Fever	51/15,156	3.4	75/17,290	4.3	1.29 (0.89, 1.87)	1.39 (0.93, 2.07)
Upper respiratory illness <sup>c</sup>	117/12,001	9.7	142/13,568	10.5	1.07 (0.83, 1.39)	1.07 (0.83, 1.37)
Any infectious symptom <sup>d</sup>	138/14,445	9.6	228/16,102	14.2	1.48 (1.19, 1.85)	1.52 (1.20, 1.93)

a Episodes per 1,000 person-days

b Adjusted for a range of covariates (see statistical methods for details)

c Only measured in year 2

d Includes gastrointestinal illness, diarrhea, vomiting, eye infections, infected cuts, and fever.

Tableau 3- Association entre le surf après de fortes précipitations et différents symptômes, d'après le SCCWRP <sup>(48)</sup>

## b. Microorganismes pathogènes

Les différentes sources de pollution de l'environnement marin conduisent à retrouver une grande variété de microorganismes pathogènes (Tableau 4) <sup>(39)</sup>. De nombreux pathogènes humains ont été identifiés dans les eaux de baignade, incluant des virus fréquemment associés aux pathologies gastrointestinales (adénovirus, norovirus, entérovirus, hépatite A...), des bactéries (*Staphylococcus aureus*, *Bacteroides spp*, *Clostridia...*), des protozoaires... Des microorganismes marins peuvent également se révéler pathogènes, comme *Vibrio spp*, *Shewanella* ou encore des mycobactéries <sup>(46)</sup>.

Dans la plupart des études épidémiologiques, les microorganismes pathogènes responsables des infections ne sont pas recherchés. Cependant, quelques études plus ciblées démontrent des liens significatifs entre des infections cutanées et des staphylocoques *aureus* et des infections urinaires causées par des *Escherichia coli* résistantes aux antibiotiques <sup>(33)</sup>.

Pathogènes pouvant être retrouvés dans les eaux de baignade		
Bactéries	Protozoaires et trématodes	Virus
<ul style="list-style-type: none"><li>• <i>Campylobacter</i></li><li>• <i>Escherichia coli</i></li><li>• <i>Helicobacter pylori</i></li><li>• <i>Legionella</i></li><li>• <i>Leptospira</i></li><li>• <i>Mycobacterium avium complex</i></li><li>• <i>Salmonella typhi</i></li><li>• <i>Shigella</i></li><li>• <i>Vibri vulnificus</i></li><li>• <i>Staphylococcus aureus</i></li></ul>	<ul style="list-style-type: none"><li>• <i>Cryptosporidium parvum</i></li><li>• <i>Giardia duodenalis</i></li><li>• <i>Microsporidia</i></li><li>• <i>Naegleria fowleri</i></li><li>• <i>Trematode worm</i></li></ul>	<ul style="list-style-type: none"><li>• Adénovirus</li><li>• Norovirus</li><li>• Coxsackievirus</li><li>• Echovirus</li><li>• Hépatite A</li><li>• Hépatite E</li></ul>

Tableau 4- Principaux pathogènes pouvant être retrouvés dans les eaux de baignade, d'après Pond <sup>(39)</sup>

## c. Facteurs de risque concernant la pollution

Si les sources de pollution les plus évidentes sont les rejets d'eaux usées, des études plus récentes se sont concentrées sur les zones de baignade sans source de pollution ponctuelle, locale <sup>(49)</sup>. La pollution peut alors provenir de différentes causes : la fréquentation de la zone, les précipitations, les contaminations animales...

Non seulement les baigneurs remettent le sable et les sédiments pollués, <sup>(50)</sup> augmentant la turbidité <sup>(51)</sup> et la concentration en microorganismes pathogènes dans l'eau, mais ils pourraient eux-même agir comme une source de pollution, en diffusant des microorganismes. Les études de Plano <sup>(50)</sup> et d'Elmir <sup>(50,52)</sup> démontrent que des *Enterococci*, des staphylocoques *aureus*, pathogènes opportunistes cutanés fréquents, mais aussi des staphylocoques résistants aux antibiotiques peuvent être diffusés par les nageurs et constituer une source de pollution. Des études californiennes remarquent des *Enterococci* dans 91% des échantillons de sable, des *Escherichia coli* dans 62% de ces échantillons mais aussi des *Staphylococcus aureus* dans 53% des échantillons de sable <sup>(53,54)</sup>.

Papastergiou démontre lui en 2011 l'association entre la densité de baigneurs et des symptômes gastrointestinaux et respiratoires suivant la baignade <sup>(55,56)</sup>. Turbow renforce dans une étude de près de 3 ans l'hypothèse que le risque le plus élevé de gastroentérite liée à l'exposition à l'eau de mer survient non pas aux périodes où les indicateurs bactériens de pollution sont les plus élevés, mais lorsque la densité de baigneurs est la plus importante <sup>(57)</sup>.

Les précipitations importantes augmentent le taux d'indicateurs de pollution fécale. Une étude menée par Arnold <sup>(58)</sup> en Californie pendant 4 ans mesure le taux de symptômes associés à l'exposition à l'eau de mer chez les surfeurs en fonction des conditions climatiques: par temps sec et lors de fortes précipitations. Les bactéries indicatrices de pollution fécale ne représentent un marqueur de risque pour la santé humaine que 3 jours à la suite des précipitations. En effet, les entérocoques ne sont un bon marqueur que dans les cas où le site a une source de pollution locale <sup>(41,42)</sup>. L'incidence des symptômes gastro-intestinaux, sinusiens, auditifs... est plus élevée dans les jours suivant les fortes précipitations, corroborant ainsi l'hypothèse infectieuse de ces symptômes <sup>(76)</sup>.

#### **d. Les limites du contrôle de la qualité des eaux**

Suivant les recommandations de l'OMS, de nombreux pays monitorent régulièrement les eaux de baignade, afin d'assurer que les niveaux de pollution fécale sont assez faibles pour ne pas causer un excès de risque pour la santé des baigneurs et pour informer le public sur la qualité de l'eau.

Néanmoins, le coût de ce monitoring conduit les agences de surveillance à réaliser des prélèvements sur un nombre limité de sites et ce uniquement pendant la saison estivale. Ne prendre en compte que les zones de baignade excluent les zones moins fortement fréquentées où sont pratiquées d'autres activités nautiques, comme le surf, la plongée, le canoë... Pourtant potentiellement plus à risque du fait d'expositions plus fréquentes et prolongées <sup>(33,42)</sup>, les pratiquants de ces activités sont donc exposés à des eaux dont la qualité est inconnue et dont la pollution n'est pas surveillée. Bien que la directive européenne prévoit la réalisation d'un contrôle visuel visant à détecter la présence de résidus goudronneux, de verre ou de plastique, ainsi qu'une surveillance des cyanobactéries, des macroalgues et du phytoplancton, la présence de ces éléments n'est pas prise en compte dans le classement des eaux de baignade.

Les méthodes actuelles d'évaluation de la qualité de l'eau sont focalisées sur les risques de pathologie gastro-intestinale pour les baigneurs. Si ces symptômes sont effectivement le problème de santé le plus fréquemment associé avec l'exposition aux eaux de surface, cette exposition a aussi été reliée à d'autres pathologies telles que les infections respiratoires, dermatologiques, oculaires et auditives <sup>(44,60,61)</sup>.

D'autre part, la densité des microorganismes indicateurs de pollution fécale étant très variable dans le temps et l'espace, des prélèvements hebdomadaires ne sont pas à même d'enregistrer les pics de contamination pouvant survenir entre deux prélèvements <sup>(58)</sup>. Un événement comme une houle importante ou de fortes précipitations provoquant le débordement du système de traitement des eaux usées peut conduire à un pic temporaire de pollution <sup>(62,63)</sup>. De plus, bien qu'il soit reconnu comme pathogène présent tant dans l'eau que dans le sable, et pouvant être fortement résistant aux antibiotiques, *Staphylococcus aureus* n'est pas recherché <sup>(62-64)</sup>.

Les indicateurs choisis comme marqueurs de la pollution fécale sont discutables. En effet, les virus survivent plus longtemps dans les eaux de baignade qu'*Escherichia coli* <sup>(65)</sup> et résistent également mieux au processus de traitement des eaux usées. Gerba retrouve des virus dans environ 40% des échantillons d'eaux traitées <sup>(66)</sup>. Les entérocoques fécaux comme *Enterococcus faecalis* ou *Enterococcus faecium* survivent plus longtemps qu'*Escherichia coli*. Les microorganismes pathogènes peuvent persister dans les sédiments. Ils ne sont alors pas détectés lors des prélèvements.

Des études récentes rapportent que même dans des eaux considérées de bonne qualité (faible proportion de microorganismes indicateurs de pollution fécale), les baigneurs étaient plus à risque que les non baigneurs d'avoir des symptômes de pathologies gastro-intestinales, respiratoires, oculaires et auditives <sup>(44,55,67)</sup>. En 2012, Papastergiou réalise une étude de cohorte sur plus de quatre mille personnes réparties sur trois plages <sup>(55)</sup>.

Chacune de ces plages est répertoriée comme d'excellente qualité selon les normes européennes, ce que les prélèvements réalisés pour l'étude corroborent. Les baigneurs présentent un risque augmenté d'infection gastro-intestinale (OR = 3,60), d'infection respiratoire (OR = 1,92) mais aussi d'infections oculaires et auditives comparés aux non baigneurs. L'étude révèle aussi un risque plus important de contracter des symptômes de ces pathologies lorsque le temps de baignade dépasse les soixante minutes.

### 3) Antibiorésistance

L'usage de plus en plus répandu et le mésusage des antibiotiques pour la prévention et le traitement des infections bactériennes ont contribué à l'émergence et à la diffusion de gènes de résistance aux antibiotiques parmi les bactéries<sup>(68)</sup>. La résistance aux antibiotiques est devenue une inquiétude concernant la santé humaine puisque des infections auparavant facilement soignables nécessitent maintenant des traitements plus complexes et plus onéreux. Une augmentation de la morbidité et de la mortalité causée par les bactéries résistantes aux antibiotiques est attendue d'après le rapport de l'OMS sur l'antibiorésistance publié en 2014<sup>(68)</sup>.

L'une des préoccupations majeures dans le domaine de l'antibiorésistance concerne les entérobactéries produisant des bêta-lactamases à spectre étendu (BLSE)<sup>(69)</sup>. Les bêta-lactamases sont des enzymes qui inactivent les antibiotiques de la famille des bêta-lactamines. De nombreux plasmides codant pour différentes sortes de BLSE sont disséminés parmi les bactéries grâce au transfert d'éléments génétiques mobiles. L'émergence et la diffusion rapides de ces BLSE posent un problème majeur de santé publique puisque les infections causées par ces bactéries résistent aux principaux antibiotiques utilisés, et notamment aux céphalosporines de troisième génération (C3G)<sup>(70)</sup>. Les carbapénèmes sont le traitement de dernier recours pour les infections sévères causées par les bactéries produisant des BLSE. Bien qu'il n'y ait pas de diffusion, des entérobactéries résistantes à ces traitements ont déjà été observées<sup>(70,71)</sup>.

*Escherichia coli* est une cause majeure de septicémie, causant en Angleterre en 2013 près de 100 fois plus d'infections que les *Staphylococcus aureus* résistants à la méthicilline (SARM)<sup>(72,73)</sup>. La hausse du nombre d'infections causées par les *Escherichia coli* résistantes aux céphalosporines de troisième génération (ECRC3G) ces dernières années représente une menace pour la santé publique, et plus particulièrement pour les personnes les plus vulnérables. En France, d'après l'Institut National de Veille Sanitaire (INVS)<sup>(74)</sup>, la résistance des entérobactéries aux antibiotiques augmente. En 2006, 11% des souches d'*Escherichia coli* étaient résistantes aux céphalosporines de troisième génération alors que moins d'un pourcent des souches présentait cette caractéristique en 2002.

Les hommes pourraient être infectés par des bactéries résistantes aux antibiotiques par différentes voies de transmission : le contact de personne à personne, l'ingestion d'eau ou de nourriture contaminée... L'environnement naturel a peu été étudié comme potentiel cadre d'exposition aux bactéries résistantes aux antibiotiques. Cependant, l'environnement naturel comme les sédiments, les eaux de surface (mer, rivière, lac...) comporte des communautés microbiennes complexes et divers métagénomés et est de plus en plus considéré comme un important réservoir de bactéries résistantes aux antibiotiques ainsi que de gènes d'antibiorésistance. En effet, les activités humaines (eaux usées, écoulements agricoles, écoulements industriels...) introduisent dans l'environnement des bactéries qui peuvent héberger un large éventail de gènes d'antibiorésistance<sup>(75)</sup>. Les eaux côtières polluées par des matières fécales pourraient être un point de contact critique où les individus seraient exposés à des gènes d'antibiorésistance lors d'une pratique sportive ou de loisir dans les eaux de surface<sup>(76)</sup>.

Avec la popularité croissante des sports nautiques et la présence de millions d'utilisateurs sur les plages, de nombreuses personnes pourraient être potentiellement exposées à des souches bactériennes présentant des résistances aux antibiotiques <sup>(39)</sup>.

#### **4) Les microplastiques**

La pollution par les débris plastiques des écosystèmes marins est un problème actuel et bien documenté <sup>(77-81)</sup>. Capables de résister à la dégradation, les plastiques sont ubiquitaires dans l'environnement. En 2015, la quantité de plastique flottant dans l'océan est estimée à plus de 250 000 tonnes. Les plastiques polluants l'océan sont divisés en trois catégories selon leur taille : les nanoplastiques (moins de 100 nm), les microplastiques (de 100 nm à 5 mm), et les macroplastiques (dont la taille excède 5 mm). Dans l'eau, le plastique est un vecteur de polluants organiques et inorganiques. Des polluants organiques comme les hydrocarbures polycycliques aromatiques peuvent être absorbés par le plastique. D'autre part, le plastique peut aussi être colonisé par des colonies microbiennes, devenant ainsi un vecteur pour la sélection et la diffusion des bactéries. L'ensemble des écosystèmes se formant sur les débris plastiques est appelé la plastisphère. Récemment, des études ont montré que les microplastiques influençaient l'évolution de la communauté microbienne et augmentaient les échanges de gènes, y compris les gènes de résistance aux antibiotiques entre différentes bactéries <sup>(82)</sup>.

Dans une étude publiée en 2019, Yang <sup>(79)</sup> démontre qu'il n'y a pas de différence significative entre l'abondance relative de gènes d'antibiorésistance dans les macroplastiques et dans les microplastiques. Cependant, l'abondance relative des gènes d'antibiorésistance dans les débris plastiques est significativement supérieure à leur abondance dans l'eau de mer.

La pollution océanique par les débris plastiques, et notamment par les microplastiques, plus difficile à maîtriser, pourrait donc potentialiser les effets de la pollution par des microorganismes pathogènes, et augmenter le risque d'exposition à des bactéries ayant acquis des résistances aux antibiotiques.

### **3. Le surf, une activité à risque ?**

#### **1) Surf et exposition à la pollution des eaux des zones d'activité nautique**

Le surf est une activité dont la popularité est croissante en France comme dans le monde. La Fédération Française de Surf (FFS) estime le nombre de licenciés à 80 000 mais le nombre total de pratiquants serait bien plus élevé, puisqu'il est estimé à 680 000 en 2017 <sup>(83)</sup>.

Des études comme celles de Cabelli <sup>(45)</sup>, Fleisher <sup>(84,85)</sup>, Kay <sup>(62)</sup>, Papastergiou <sup>(55)</sup>, Soller <sup>(86)</sup> ou encore celle du SCCWRP <sup>(48)</sup> ont démontré que des taux plus élevés de pathologies gastro-intestinales sont retrouvés chez les baigneurs versus les non baigneurs et un lien entre l'immersion de la tête et des taux plus élevés de pathologies gastro-intestinales

Il est donc admis que l'exposition à l'eau de mer peut être liée avec des symptômes de pathologies infectieuses, et notamment de pathologies gastro-intestinales. La voie de transmission des pathogènes responsables est l'ingestion. Cependant, dans les études sur les pathologies liées à l'exposition à l'eau de mer, si l'exposition inclut généralement l'immersion de la tête, la fréquence de cette immersion ou la quantité d'eau ingérée sont rarement analysées <sup>(47)</sup>. Dans ses lignes directrices de 2003, l'OMS <sup>(42)</sup> retient la quantité de 20 à 50 mL

d'eau ingérée par heure de baignade. Néanmoins cette valeur semble arbitraire et n'est pas appuyée par des études. Or, l'estimation de cette variable semble nécessaire pour évaluer l'exposition des surfeurs. Les expositions plus fréquentes, et prolongées, pourraient être un facteur de risque pour les pathologies infectieuses associées à l'exposition aux eaux des zones d'activité nautique <sup>(87,88)</sup>.

## 2) Ingestion d'eau

Pour estimer la quantité d'eau ingérée par des nageurs, Dufour <sup>(89)</sup> reprend la méthode exploitée par Allen en 1982 <sup>(90)</sup>. Le chloroisocyanurate, un composant utilisé pour stabiliser le chlore des piscines, se décompose en acide cyanurique et en chlore. 98% de l'acide cyanurique ingéré par les baigneurs est retrouvé dans le prélèvement d'urine fait sur 24 heures. Dufour utilise cette méthode sur un groupe de 53 nageurs ayant nagé pendant au moins 45 minutes. Chez les adultes, la quantité d'eau ingérée allait de 0 à 53 mL toutes les 45 minutes de baignade. La moyenne d'eau ingérée chez les adultes était de 16 mL pour une durée de baignade de 45 minutes. L'auteur précise que si ces résultats obtenus en piscine peuvent être appliqués aux baignades en eaux de rivières, ils ne sont pas valables pour la baignade en mer.

En 2008, l'étude menée par Stone <sup>(91)</sup> est la première à évaluer l'ingestion d'eau parmi une population de surfeurs. L'étude se base sur un questionnaire en ligne demandant à une population de surfeurs d'estimer la quantité d'eau qu'ils ingèrent accidentellement par la bouche ou par le nez, en s'appuyant sur des volumes types déjà utilisés par Schijven chez les plongeurs <sup>(92)</sup>. Les sujets peuvent choisir entre des volumes de quelques gouttes, 1 à 3 cuillères à café, le volume d'un verre à shooter (30 à 60 ml), ou le volume d'un verre (115 ml). La fréquence des sessions de surf était également relevée.

100% des 519 volontaires interrogés ont déclaré ingérer accidentellement de l'eau, et environ 90% parviennent à estimer le volume ingéré. 16,6% des surfeurs rapportent ingérer quelques gouttes, 51,3% 1 à 3 cuillères à café, 21,1 % entre 30 et 60 ml et 1,8% 115 ml à chaque ingestion. Ces surfeurs sont 61,8% à rapporter avaler de l'eau 1-2 fois par session de surf, 21,6% 3 à 4 fois, 10,5 % 5 à 6 fois, 3,7% 7-8 fois et 2,5% 9 fois ou plus par jour. L'ingestion moyenne est de 170,6 ml par jour. La fréquence de jours de surf par an est en moyenne de 77 jours. L'étude montre qu'il n'existe pas de différence significative sur la quantité d'eau ingérée basée sur l'âge ou le nombre d'années de pratique des surfeurs.

Dans son étude, Stone évalue donc la quantité d'eau moyenne ingérée par session de surf à environ 170 ml, ce qui est supérieur à la moyenne d'eau ingérée par les nageurs en piscine estimée par Dufour (16 ml) et chez les plongeurs par Schijven (10ml par plongée).

Les surfeurs semblent donc ingérer plus d'eau que les nageurs et pourraient donc être une population plus à risque concernant l'exposition aux eaux de surfaces polluées.

### 3) Surf et antibiorésistance

Leonard s'interroge en 2015 <sup>(33)</sup> sur la prévalence d' ECRC3G parmi les *Escherichia coli* présentes dans les eaux des zones d'activité nautique au Royaume-Uni. L'auteur rappelle les normes concernant *Escherichia coli* établies par la directive européenne de 1976 et les nouvelles normes s'appliquant au Royaume-Uni depuis la directive européenne de 2006. Des prélèvements dans les eaux côtières de l'Angleterre et du Pays de Galles pendant l'été 2012. La majorité des échantillons prélevés satisfont la nouvelle norme (Tableau 5).

	Water quality indicator	Guideline	Mandatory	Fail
A)	<i>Escherichia coli</i> (CFU/100 ml)	8391 (83.3%)	1553 (15.8%)	134 (1.3%)
B)	<i>Escherichia coli</i> (CFU/100 ml)	9238 (91.7%)	388 (3.9%)	452 (4.5%)

Tableau 5- Résultats des prélèvements pendant la période de transition (A) et pour la directive européenne 2006/7/CE (B) d'après Leonard <sup>(33)</sup>

En se basant sur l'ingestion d'eau par les surfeurs et les baigneurs, respectivement définie par Dufour en 2006 <sup>(89)</sup> et Stone en 2008 <sup>(91)</sup>, Leonard estime la quantité moyenne ECRC3G ingérée par baignade mais aussi par session de surf (Figure 4).

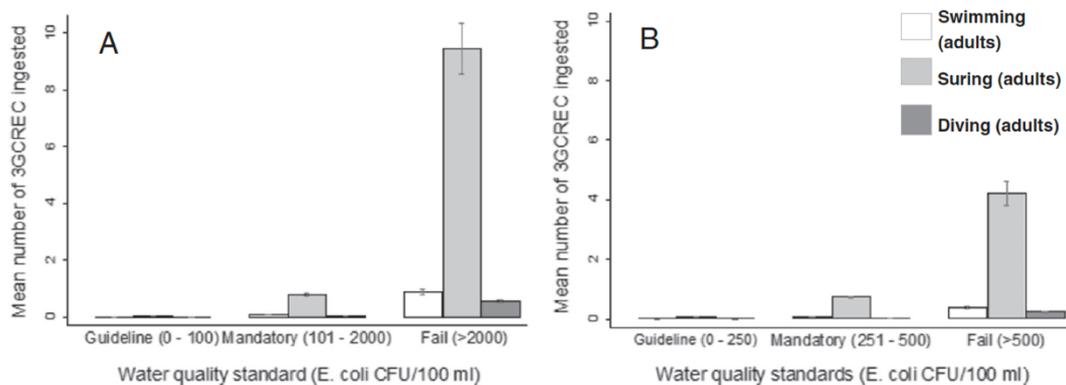


Figure 4- Nombre moyen d'ECRC3G ingéré par les adultes selon le type d'exposition pour la période de transition (A) et pour la directive européenne 2007/6/CE d'après Leonard <sup>(33)</sup>

L'auteur rappelle que la méthode d'évaluation de la qualité de l'eau par échantillonnage ne permet pas de tenir compte des variations spatiales et temporelles entre les différents relevés <sup>(33)</sup>. De plus, les personnes pratiquant des activités nautiques en dehors des périodes d'évaluation ou sur des plages non analysées comme le sont souvent les spots de surf, sont exposées à des niveaux inconnus d'*Escherichia coli*. Plus de 164 millions de sessions d'activité nautique (natation, surf, plongée...) se sont déroulées en Angleterre et au Pays de Galles en 2012, et sur ces 164 millions de sessions, plus de 6,3 millions ont résulté en une ingestion d'ECRC3G. Dans cette même étude de Leonard, seule la résistance aux céphalosporines de troisième génération a été étudiée, conduisant à une sous estimation du résultat. Si la prévalence d'antibiorésistance chez *Escherichia coli* démontrée par Blaak en 2011 <sup>(93)</sup> est

retenue (27,6%), c'est plus de 109 millions de sessions d'activité nautique qui, en 2012, ont conduit à l'ingestion d'*Escherichia coli* résistantes à au moins un antibiotique.

Ces résultats suggèrent que l'ingestion d'eau contenant des *Escherichia coli* résistantes aux antibiotiques est associée avec une colonisation intestinale par ces bactéries résistantes, qui peuvent porter plusieurs gènes d'antibiorésistance et persister pendant plusieurs mois dans la flore de l'hôte <sup>(76)</sup>. Par conséquent, il existe un risque que les porteurs sains transmettent ces bactéries à des personnes plus vulnérables aux infections (personnes âgées, nourrissons, personnes immunodéprimées...).

En 2018, dans une autre étude, Leonard s'interroge sur l'existence d'une association entre la pratique du surf et la colonisation intestinale par un type d'*Escherichia coli* résistant aux antibiotiques <sup>(94)</sup>. Plus de 300 volontaires, dont près de 150 surfeurs réguliers ont été recrutés. Il a été demandé aux volontaires de réaliser un prélèvement rectal grâce à un écouvillon. Les bactéries entériques collectées sur les prélèvements ont été testées pour leur résistance à différents antibiotiques. Au total, l'intestin d'environ 15,5% des surfeurs a été colonisé par des *Escherichia coli* résistantes aux antibiotiques contre environ 4,5% des témoins.

Les surfeurs semblent donc être une catégorie plus à risque concernant l'exposition à la pollution des zones d'activité nautique, et pourraient donc être plus à risque d'être colonisés par des bactéries ayant acquis des résistances aux antibiotiques.

# **III- RECHERCHE EXPERIMENTALE**

## **1. Objectifs**

La littérature démontre que les surfeurs sont une catégorie à risque concernant l'exposition à la pollution des zones d'activité nautique. Cette pollution représente un risque pour la santé puisqu'elle est associée à un risque augmenté de pathologies infectieuses, notamment gastro-intestinales. La cavité buccale constitue une porte d'entrée et un réservoir pour ces bactéries. Il n'existe pas à ce jour, à notre connaissance, d'étude sur l'influence de ces bactéries sur l'écosystème de la flore buccale.

L'objectif de ce travail est de rechercher la présence de bactéries potentiellement pathogènes suite à l'exposition à la pollution des eaux des zones d'activité nautique. Un deuxième objectif de ce travail est d'étudier si l'exposition prolongée via le surf à l'eau de mer engendre ou non une différence quantitative et/ ou qualitative significative sur la flore de l'écosystème buccal.

Des prélèvements de salive et d'enduit lingual sont réalisés sur un groupe de surfeurs ainsi que sur un groupe témoin. Deux types d'espèces bactériennes sont ciblés : des bactéries associées à un bon état de santé bucco-dentaire, *Streptococcus salivarius*, et des bactéries associées à un aspect des pathologies bucco-dentaires, la maladie carieuse, dont *Streptococcus mutans*, sera le témoin. D'autre part, deux espèces bactériennes pathogènes associées à l'exposition à la pollution des eaux de baignade seront recherchées, *Staphylococcus aureus* et *Escherichia coli*. Des techniques d'identification par méthode biochimique puis par biologie moléculaire seront utilisées. Enfin, la présence d'antibiorésistance sera également recherchée.

## **2. Matériel et méthode**

Des prélèvements ont été réalisés sur 15 surfeurs et 15 témoins.

### **1) Critères d'inclusion et critères d'exclusion**

Pour intégrer l'étude, les surfeurs devaient pratiquer au moins deux fois par semaine pendant une durée supérieure ou égale à une heure dans l'eau. Les surfeurs devaient être âgés d'au moins 18 ans, ou avoir 18 ans dans l'année. Le groupe « témoins » est constitué d'étudiants en chirurgie-dentaire de la faculté de Bordeaux ne s'étant pas baignés depuis au moins un mois, et ne pratiquant pas le surf ou un autre sport nautique.

Pour éviter des biais concernant la composition quantitative ou qualitative de la flore buccale, les personnes présentant une pathologie systémique comme le diabète, des troubles digestifs ou ORL ou ayant subi une radiothérapie ou chimiothérapie ont été exclues de l'étude. Les femmes enceintes ont également été exclues. Dans le même but, les personnes ayant utilisées des bains de bouche antiseptiques deux semaines avant le prélèvement, ou ayant suivi une antibiothérapie un mois avant le prélèvement ont aussi été exclues. Enfin, les personnes polycariées, les personnes porteuses d'un appareil orthodontique ou d'une prothèse amovible l'ont également été.

## **2) Prélèvements**

Les prélèvements du groupe « surfeurs » ont été réalisés le 29 et le 30 Septembre 2018 sur la plage des Estagnots, à Seignosse (40510) tandis que les prélèvements du groupe « témoins » ont été réalisés le 15 et le 16 Octobre dans les services odontologiques de l'hôpital Pellegrin et de l'hôpital Saint-André à Bordeaux (33000).

Préalablement au prélèvement, une fiche d'informations et de consentement a été remise aux volontaires (Annexe 1). Un questionnaire a été remis aux surfeurs et aux témoins (Annexe 2 et Annexe 3). Le questionnaire permettait de relever les antécédents médicaux et chirurgicaux ainsi que les traitements médicamenteux des participants. Les habitudes de consommation alimentaire et d'hygiène étaient également interrogées, tout comme le suivi bucco-dentaire. Enfin, une partie réservée aux surfeurs les questionnait sur leur pratique du surf.

Un examen bucco-dentaire a été réalisé succinctement en amont des prélèvements afin de relever la présence ou non de plaque dentaire, de tartre, d'inflammation gingivale ainsi que le nombre de dents cariées, absentes ou obturées pour cause de carie (indice CAO)<sup>(95)</sup>.

Pour chaque prélèvement, un set d'examen, un flacon stérile vide, un flacon contenant 5 ml d'eau distillée stérile et une brosse à dents Inava 15/100ème préalablement stérilisée<sup>(96)</sup> ont été utilisés. Le prélèvement a été réalisé par le même opérateur et le protocole des prélèvements (Annexe 4) a été identique pour chaque volontaire. Chaque sujet a été invité à cracher environ 1 ml de salive dans le flacon vide, et l'enduit lingual a été récupéré grâce à la brosse à dents Inava préalablement stérilisée puis placé dans le flacon contenant 5 ml d'eau distillée stérile. Les prélèvements ont été transportés au laboratoire pour être congelés, le jour même ou le lendemain des prélèvements.

## **3) Traitement des échantillons**

### **a. Mise en culture**

Les échantillons de salive et d'enduit lingual ont été mis en culture sur différentes géloses. 100 microlitres ( $\mu$ l) des prélèvements de salive et d'enduit lingual ont été prélevés et dilués dans de l'eau distillée stérile, à des concentrations de  $10^{-2}$  et  $10^{-4}$ . Ces différentes concentrations permettent d'obtenir sur chaque gélose des colonies dénombrables et isolables pour permettre ultérieurement leur identification<sup>(97)</sup>.

Les milieux utilisés sont :

- gélose Columbia au sang de mouton

50  $\mu$ l des échantillons de salive et d'enduit lingual dilués à  $10^{-4}$  sont prélevés et sont placés sur une gélose au sang. Cette gélose, peu sélective, permet d'apprécier l'hémolyse effectuée par certaines bactéries. Ce milieu permet un bon développement des streptocoques. L'étalement se fait en nappe.

- gélose Chapman

50 µl des échantillons de salive et d'enduit lingual dilués à  $10^{-2}$  sont prélevés et sont placés sur une gélose mannitol salt agar (MSA). Ce milieu est utilisé pour l'isolement des staphylocoques. Sa forte concentration en chlorure de sodium inhibe la croissance de la plupart des autres espèces. L'étalement sur cette gélose se fait en nappe.

- gélose Drigalski

50 µL des échantillons de salive et d'enduit lingual non dilués sont prélevés et sont placés sur une gélose Drigalski. Cette gélose permet d'isoler les bacilles et colibacilles Gram négatif de culture facile. L'ensemencement en stries se fait par quadrants. Cette méthode d'ensemencement permet à la fois une estimation semi-quantitative du nombre de germes contenus dans le prélèvement et l'obtention de colonies isolées.

Les boîtes de culture sont ensuite déposées dans un incubateur à température maîtrisée de 37 °C, dans des conditions d'anaérobiose (grâce à des sachets « Anaerogen », Oxoid) et ce pendant au moins 48 heures, afin de permettre la croissance des bactéries.

### b. Observation des géloses

Chaque colonie visible à la surface de la gélose est décrite (diamètre, forme, couleur, relief, éventuel halo d'hémolyse...).

Toutes les colonies sont comptabilisées. Le nombre de colonies est rapporté en unité formant colonies par millilitre (UFC/ ml) grâce à la formule : nombre de colonies multiplié x le facteur de dilution x20, puis soumis à un changement en log.

Sur chaque gélose, un exemple de chaque variété de colonie est prélevé et mis en suspension dans 500 µl d'eau distillée stérile.



Figure 5- Croissance des colonies sur les différentes géloses

### c. Coloration de Gram, observation au microscope optique

La coloration de Gram permet de déterminer la composition de la paroi de la bactérie mais aussi de déterminer sa morphologie. La préparation devant être pure, les colonies présentant plusieurs types de bactéries sont éliminées.

#### **4) Mise en culture en milieu liquide**

Les colonies présentant des bactéries à Gram positif sont remises en culture dans un milieu liquide, le bouillon trypticase soja (TS). Les colonies présentant des bactéries à Gram négatif sont, quant à elles, remises en culture dans un milieu Wilkins and Chalgren Anaerobe (WCA) <sup>(97)</sup>.

Les tubes à essai sont placés à l'étuve à 37°C pendant au moins 48 heures.

#### **5) Test de la catalase**

Le test de la catalase <sup>(97)</sup> permet de différencier deux cocci Gram positif, les streptocoques et les staphylocoques puisque la coloration ne permet pas cette précision. Une goutte de peroxyde d'hydrogène est déposée sur une lame. Une colonie est prélevée de la gélose et mise en contact avec le peroxyde d'hydrogène. La formation de bulles gazeuses traduit une catalase positive ; il s'agit d'un staphylocoque. Dans le cas contraire, la catalase est négative, il s'agit d'un streptocoque.

Enfin, les souches sont conservées dans du glycérol et congelées à une température de - 80°C en attendant les étapes d'identification.

#### **6) Identification par méthode biochimique : les galeries API**

##### **a. Streptocoques**

Les galeries API 20 strep sont un système standardisé associant 20 tests biochimiques et permettant le diagnostic d'espèce pour la plupart des streptocoques, des entérocoques et des germes apparentés les plus courants.

Les souches bactériennes sont tout d'abord décongelées puis remises en culture dans le milieu liquide TS. Les tubes sont placés à l'étuve à 37°C pendant 48 heures. Lorsque la culture est suffisamment riche, le culot est prélevé grâce à une pipette pasteur stérilisée, et quelques gouttes sont déposées sur une gélose au sang. L'ensemencement se fait en râteau. Les géloses sont à leur tour placées à l'étuve à 37°C pendant 48 heures, en anaérobiose.

Les bactéries sont récupérées grâce à un écouvillon sur la gélose au sang et sont dispersées dans une solution fournie dans le kit de galeries pour obtenir une suspension très dense, riche en bactéries. La première moitié des microtubes de la galerie est remplie à l'aide d'une pipette pasteur stérile. Le reste de la suspension est versé dans l'ampoule d'API GP Medium fournie avec le kit. Après homogénéisation, cette nouvelle suspension est répartie dans les microtubes restants. Les tubes des tests ADH à GLYC sont scellés avec de l'huile de paraffine. Enfin, les galeries sont placées en incubation à 37°C en aérobie pendant environ 4 heures pour une première lecture, puis 24 heures pour une deuxième lecture.

##### **b. Lecture de la galerie API 20 Strep et interprétation**

Après 4 heures d'incubation, il convient d'ajouter les réactifs : 1 goutte de VP1 et de VP2 dans le test VP ; 2 gouttes de NIN dans le test HIP ; 1 goutte de ZYM A puis de ZYM B dans les tests PYRA, alphaGAL, betaGUR, PAL et LAP. Après 10 minutes, une première lecture est possible. Le tableau de lecture permet d'interpréter les virages colorés qui se sont produits

dans les microtubes (Figure 6). Une deuxième lecture peut être réalisée après une incubation supplémentaire de 24 heures.

À l'issue de ces tests, une succession de résultats positifs et négatifs est obtenue pour chaque souche analysée. Le profil biochimique obtenu permet, par comparaison avec des profils types, l'identification de l'espèce bactérienne.



Figure 6- Galleries API 20 Strep

### c. Entérocoques

Les galeries API 20 E sont un système standardisé pour l'identification des *Enterobacteriaceae* et autres bacilles à Gram négatif non fastidieux. Les galeries API 20 E comprennent elles aussi 20 microtubes comprenant des substrats déshydratés qui, après addition de la suspension bactérienne et incubation, montrent des virages colorés spontanés ou révélés par l'adjonction de réactifs.

Comme pour l'identification des streptocoques, les souches bactériennes sont décongelées puis remises en culture dans le milieu liquide TS. Les tubes sont placés à l'étuve à 37°C pendant 48 heures. Lorsque la culture est suffisamment riche, le culot est prélevé grâce à une pipette pasteur stérilisée, et quelques gouttes sont déposées sur une gélose au sang. Compte tenu des tapis de colonies obtenus lors de la mise en culture de certains échantillons, l'ensemencement est réalisé en stries afin d'obtenir des colonies isolées. Les géloses sont à leur tour placées à l'étuve à 37°C pendant 48 heures, en anaérobiose.

Une unique colonie est prélevée à l'aide d'une pipette stérile et est déposée dans un tube contenant 5mL d'eau distillée stérile. Les bactéries sont homogénéisées dans le milieu pour obtenir une suspension bactérienne. Cette suspension bactérienne est utilisée pour remplir les microtubes suivant les instructions. Pour les tests ADH, LDC, ODH, H<sub>2</sub>C et URE, une anaérobiose est créée en remplissant les cupules avec de l'huile de paraffine. Enfin, les galeries sont placées en incubation à 37°C pendant 18 à 24 heures.

### d. Lecture et interprétation de la galerie

Après incubation, si au moins 3 des tests sont positifs et ce quel que soit le résultat du test GLU, les réactifs sont ajoutés : 1 goutte de réactif TDA pour le test TDA ; 1 goutte de réactif JAMES pour le test IND et 1 goutte des réactifs VP 1 puis VP 2 dans le test VP. Le test de la recherche de production d'indole libérant des gaz pouvant altérer l'interprétation des autres tests de la galerie, il est donc réalisé en dernier. Après une attente d'au moins 10 minutes, les virages colorés peuvent être relevés et traduits en une suite de résultats positifs et négatifs (Figure 7).

La comparaison avec des profils biochimiques types permet de déterminer l'espèce bactérienne de la souche testée.



Figure 7- Galleries API 20 E

## 7) Identification par méthode de biologie moléculaire : Réaction en chaîne par polymérase <sup>(98-100)</sup>

### a. La réaction en chaîne par polymérase

Lorsque le profil biochimique obtenu ne correspond pas aux profils types proposés, ou afin de confirmer l'identification d'une espèce bactérienne, une nouvelle étape d'identification est utilisée : la réaction en chaîne par polymérase (de l'anglais, *polymerase chain reaction*, PCR). La PCR sur colonie est un protocole qui permet d'amplifier de façon simple de l'ADN de micro-organisme en inoculant directement la colonie dans le milieu réactionnel de la PCR.

### b. Composition du mix <sup>(101,102)</sup>

La composition du mix est propre à l'espèce à identifier (Tableaux 6 et 7).

Espèce bactérienne	Composition du mix, pour 50 l	Volume
<b><i>Streptococcus salivarius</i></b>	10 X : tris HCL 100 mM (pH=8,3), KCL 500 mM	5µl
	Amorces spécifiques : GTFB F 100 µM GTFB R100 µM	1µl 1µl
	dnTPS (10 mM de chaque)	1µl
	Taq polymérase 5u/µl	0,26µl
	eau ultrapure stérile (mQ)	39,74µl
<b><i>Streptococcus mutans</i></b>	10 X : tris HCL 100 mM (pH=8,3), KCL 500 mM	5µl
	Amorces spécifiques : Sal F 100 µM Sal R 100 µM	1µl 1µl
	dnTPS (10 mM de chaque)	1µl
	Taq polymérase 5u/µl	0,26µl
	eau ultrapure stérile (mQ)	39,74µl

Tableau 6- Composition du mix pour la PCR des streptocoques des groupes *salivarius* et *mutans* <sup>(101,102)</sup>

Chaque espèce bactérienne est soumise à un programme spécifique dans le thermocycleur afin d'atteindre et d'amplifier l'ADN (Tableau 8). Chaque cycle de PCR est constitué de trois étapes : une dénaturation de l'ADN par chauffage pour dissocier les deux brins d'ADN, une hybridation des amorces aux extrémités de la séquence recherchée et enfin une élongation grâce à l'action d'une ADN polymérase. Les amorces, en s'hybridant à l'ADN, délimitent la région à amplifier, et leur extrémité 3'OH permet l'action de l'ADN polymérase. La Taq polymérase a permis l'élongation des brins d'ADN.

Le cycle est répété à plusieurs reprises pour obtenir une multiplication exponentielle de la séquence d'ADN ciblée.

Espèce bactérienne	Amorces (5'-3')	Taille de l'amplicon
<b><i>Streptococcus salivarius</i></b>	Sal F : AAC GTT GAC CTT ACG CTA GC	2271 pb
	Sal R : GAT TCT GTC AAA GAA GCC	
<b><i>Streptococcus mutans</i></b>	GTFB-F : ACT ACA CTT TCG GGT GGC TTG G	517 pb
	GTFB-R : CAG TAT AAG CGC CAG TTT CAT C	

Tableau 7- Amorces pour la PCR des streptocoques *salivarius* et *mutans* <sup>(101, 102)</sup>

Espèce bactérienne	Programme		Nombre de cycles
<b><i>Streptococcus salivarius</i></b>	Dénaturation	1mn à 94°C	26
	Hybridation	1mn à 54°C	
	Synthèse	1mn à 72°C	
	Retour à 4°C		
	Fin		
<b><i>Streptococcus mutans</i></b>	Dénaturation	30 sec à 95°C	30
	Hybridation	30 sec à 59°C	
	Synthèse	1mn à 72°C	
	Retour à 4°C		
	Fin		

Tableau 8- Les cycles de la PCR pour les streptocoques *salivarius* et *mutans* <sup>(101,102)</sup>

## 8) Électrophorèse <sup>(103)</sup>

L'électrophorèse, réalisée sur gel d'agarose, permet de faire migrer les acides nucléiques au travers du gel. Du bromure d'éthidium est ajouté au gel ; en effet ce produit s'intercale entre les bases des acides nucléiques et donne une fluorescence orange visible sous illumination ultraviolette à l'ADN. La technique de l'électrophorèse au gel d'agarose est basée sur la séparation des acides nucléiques (chargés négativement) sous l'effet d'un champ électrique. Les molécules de petite taille se déplacent plus rapidement que les molécules de taille supérieure, elles migreront donc plus loin sous l'effet du courant électrique. La cuve est soumise à un courant de 150 volts (V) pendant une heure.

## 9) Révélation de l'ADN

À l'issue de l'électrophorèse, le gel est placé sous un rayonnement ultra-violet pour observer les bandes d'ADN fluorescente. L'estimation de la taille des fragments se fait par comparaison avec l'échelle de marqueurs de taille moléculaire, le "DNA-ladder", qui a été mis en place dans un des puits lors de la migration. En comparant le nombre de bases de l'amplicon testé et le "DNA ladder", on peut déterminer si l'échantillon appartient ou non à l'espèce recherchée.

## 10) Antibiogrammes

Les staphylocoques ont été identifiés par les observations au microscope optique après coloration de Gram et croissance sur une gélose sélective.

Différents antibiotiques ont été testés : l'amoxicilline, la spiramycine, la gentamicine et l'ofloxacine. Les concentrations minimums inhibitrices (CMI) des solutions antibiotiques en antibiotiques ont été définies par le Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie. La CMI représente la plus faible concentration de l'antibiotique inhibant la croissance bactérienne. Pour l'amoxicilline, la concentration retenue est de 1mg/ml. Pour la spiramycine, la gentamicine et l'ofloxacine elles sont respectivement de 0,2 mg/ml, 4mg/ml et de 0,4mg/ml <sup>(104)</sup>.

2 ml d'une culture overnight de staphylocoques sont étalés en nappe sur une gélose au sang pour l'ensemencer. Chaque gélose est divisée en quadrant ; sur chaque quadrant, un disque de papier imbibé de 25 µl de solution antibiotique est placé. Chaque gélose contient donc les quatre antibiotiques. Les géloses sont ensuite placées à l'étuve à 37°C en anaérobiose pendant 48 heures. Si la bactérie est sensible à l'antibiotique testé, un halo d'inhibition apparaît sur la gélose (Figure 8).

Pour que les bactéries soient considérées comme sensibles à l'antibiotique testé, il ne doit pas y avoir de colonies autour du disque dans un diamètre de : 19 à 25mm pour l'amoxicilline, 18 à 26mm pour la spiramycine, 19 à 27mm pour la gentamicine et de 21 à 28 mm pour l'ofloxacine.

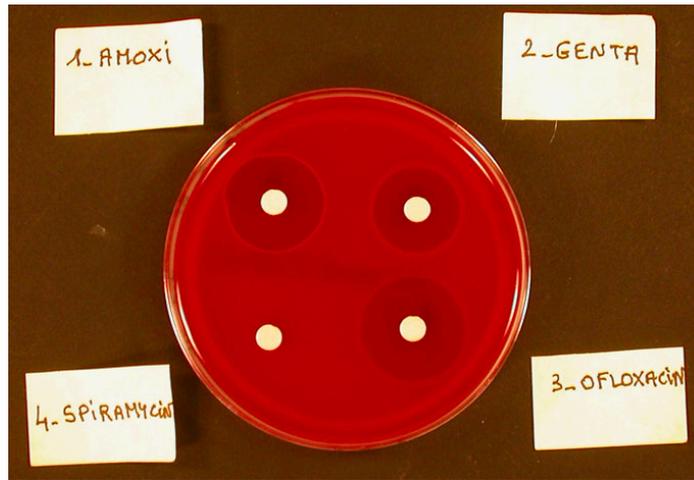


Figure 8- Antibiogramme réalisé sur gélose au sang

# IV RESULTATS

## **1. Description de la population**

### **1) Âge, sexe et catégorie socio-professionnelle**

Quinze surfeurs ont été recrutés. La moyenne d'âge dans la population de surfeurs est d'environ 20 ans. Une grande majorité des surfeurs sont des hommes. 86,7% des surfeurs sont actuellement des étudiants (Tableau 9). Quinze témoins ont également été recrutés. La moyenne d'âge de la population des témoins est d'environ 22,5 ans. Tous les témoins sont des étudiants. Les deux tiers des témoins recrutés sont des femmes (Tableau 10). Les deux groupes constitués sont comparables en termes d'âge et de milieu social. Cependant, le groupe « surfeurs » est quasiment exclusivement masculin, tandis que le groupe « témoins » est majoritairement féminin.

Identification	Âge	Sexe	Catégorie socio-professionnelle
1	17	M	Élève ou étudiant
2	17	M	Élève ou étudiant
3	17	M	Élève ou étudiant
4	26	F	Élève ou étudiant
5	19	M	Élève ou étudiant
6	23	M	Élève ou étudiant
7	23	M	Employé
8	28	M	Employé
9	26	M	Élève ou étudiant
10	17	M	Élève ou étudiant
11	17	M	Élève ou étudiant
12	18	M	Élève ou étudiant
13	18	M	Élève ou étudiant
14	18	M	Élève ou étudiant
15	18	M	Élève ou étudiant

Tableau 9 - Âge, sexe et catégorie socio-professionnelle du groupe "surfeurs"

Identification	Âge	Sexe	Catégorie socio-professionnelle
1	23	F	Élève ou étudiant
2	25	F	Élève ou étudiant
3	22	F	Élève ou étudiant
4	22	M	Élève ou étudiant
5	24	M	Élève ou étudiant
6	22	F	Élève ou étudiant
7	26	F	Élève ou étudiant
8	23	M	Élève ou étudiant
9	24	M	Élève ou étudiant
10	21	F	Élève ou étudiant
11	21	F	Élève ou étudiant
12	22	F	Élève ou étudiant
13	21	F	Élève ou étudiant
14	22	F	Élève ou étudiant
15	21	M	Élève ou étudiant

Tableau 10- Âge, sexe et catégorie socioprofessionnelle du groupe "témoins"

## 2) Anamnèse

86,7% des surfeurs déclarent être en bonne santé. Un sujet présente un eczéma, tandis qu'un autre présente une exostose du conduit auditif externe, une pathologie liée à la pratique répétée du surf en eaux froides sans protection des oreilles (Tableau 11). Ces pathologies ne présentant pas d'incidence sur l'écosystème buccal, ces individus n'ont pas été exclus de l'étude. 100% des témoins se considèrent en bonne santé (Tableau 12).

Identifiant	Antécédents médicaux	Traitements en cours
1	RAS	/
2	RAS	/
3	RAS	/
4	RAS	/
5	RAS	/
6	RAS	/
7	Eczéma	/
8	Exostose du conduit auditif externe	/
9	RAS	/
10	RAS	/
11	RAS	/
12	RAS	/
13	RAS	/
14	RAS	/
15	RAS	/

Tableau 11- Etat de santé du groupe "surfeurs"

Identifiant	Antécédents médicaux	Traitements en cours
1	RAS	pilule contraceptive
2	RAS	/
3	RAS	pilule contraceptive
4	RAS	/
5	RAS	/
6	RAS	pilule contraceptive
7	RAS	/
8	RAS	/
9	RAS	/
10	RAS	/
11	RAS	pilule contraceptive
12	RAS	/
13	RAS	/
14	RAS	/
15	RAS	/

Tableau 12 - Etat de santé du groupe "témoins"

### **3) Habitudes de consommation**

93% des surfeurs interrogés déclarent avoir une alimentation équilibrée, mais 47% consomment des aliments sucrés entre les repas. Pour la majorité, il s'agit d'une collation dans l'après-midi. Concernant les boissons qu'ils consomment, les surfeurs avaient le choix entre « rien » ou « eau » et/ou « boisson sucrée » et/ou « boisson énergisante/ énergétique » et/ou « alcool » et devaient décrire leur consommation pendant les repas, entre les repas et pendant les sessions. 100% des individus boivent de l'eau pendant les repas et entre les repas. Un tiers d'entre eux déclarent boire des boissons sucrées pendant les repas et environ un quart en boit entre les repas. Pendant les sessions, les deux tiers des individus boivent de l'eau, tandis que le tiers restant ne boit pas. Aucun des surfeurs interrogés ne déclare boire d'alcool ou de boisson énergétique ou énergisante. 87% des surfeurs interrogés sont non-fumeurs et aucun ne consomme de cannabis.

93% des témoins interrogés déclarent avoir une alimentation équilibrée. 20% des témoins consomment des aliments sucrés entre les repas. Concernant les boissons consommées, 100% boivent de l'eau pendant et entre les repas. 7% consomment également des boissons sucrées pendant les repas et 7% consomment une boisson alcoolisée pendant les repas. Les témoins ne boivent pas d'autres boissons que l'eau entre les repas. Environ 75% des témoins interrogés sont non-fumeurs, et 2 personnes consomment occasionnellement du cannabis.

### **4) État de santé bucco-dentaire**

87% des surfeurs interrogés se brossent les dents deux fois par jour et 13% se brossent les dents trois fois par jour. Pour deux tiers des surfeurs, le dernier rendez-vous chez le dentiste date de moins d'un an tandis que pour un tiers, le dernier rendez-vous remonte à plus d'un an. 67% des surfeurs consultent leur chirurgien-dentiste tous les ans, 20% tous les deux ans. Seulement un des surfeurs interrogés s'y rend deux fois par an, et un seul ne s'y rend qu'en urgence. Pour 93% des sujets, le motif du rendez-vous était un contrôle.

À l'examen bucco-dentaire, 93% des surfeurs ne présentent ni plaque ni tartre et ne souffrent pas de gingivite. Un seul des individus présente de la plaque, du tartre et une gingivite. 80% ont un indice CAO de 0 tandis que les 20% restants présentent un indice CAO de 1. 60% des surfeurs ont eu un traitement orthodontique. Un seul porte une gouttière la nuit, les autres ont complètement achevé leur traitement. 40% des surfeurs interrogés n'ont pas eu de traitement orthodontique.

La population de surfeurs interrogés présente donc un bon état bucco-dentaire, avec un indice CAO nul ou faible, de bonnes habitudes d'hygiène bucco-dentaire et un suivi régulier.

Près de 50% des témoins se brossent les dents 2 fois par jour, et près de 50% réalise 3 brossages quotidiens. Pour 86% des témoins, le dernier rendez-vous chez le dentiste date de moins d'un an. La moitié des témoins consulte tous les ans, un tiers tous les 6 mois.

À l'examen bucco-dentaire, aucun témoin ne présente de plaque et moins de 10% présentent du tartre. Aucun ne souffre de gingivite. 80% des témoins ont un indice CAO de 0 et 20% un indice CAO compris entre 1 et 3. Près des trois quarts des témoins ont eu un appareil orthodontique, tous ont complètement achevé leur traitement.

La population des témoins présente donc un bon état bucco-dentaire avec un indice CAO nul ou faible, de bonnes habitudes d'hygiène et un suivi régulier.

## 5) Surf

Les surfeurs interrogés pratiquent en moyenne le surf depuis environ 9 ans. La moitié pratique depuis 5 à 10 ans et un tiers depuis plus de 10 ans. Le nombre moyen de sessions hebdomadaires est de 3,5. Plus de la moitié des surfeurs s'exercent 3 à 5 fois par semaine. (Figure 9). À chaque session les surfeurs passent en moyenne 2h10 dans l'eau. Environ 50% des surfeurs restent 2 heures dans l'eau et l'autre moitié de 2 à 4 heures. 74% des surfeurs ont un niveau confirmé ou pratiquent le surf en compétition. Les autres déclarent un niveau intermédiaire.

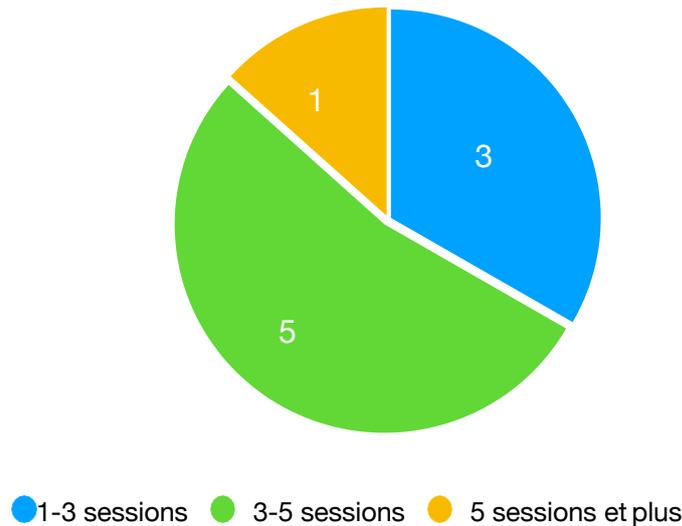


Figure 9- Nombre de sessions de surf hebdomadaires

Les symptômes ressentis après avoir surfé par le plus de surfeurs sont des symptômes d'otite (plus de 50% des surfeurs interrogés). 20% ont ressenti des symptômes de conjonctivite et/ ou d'infection cutanée (Figure 10).

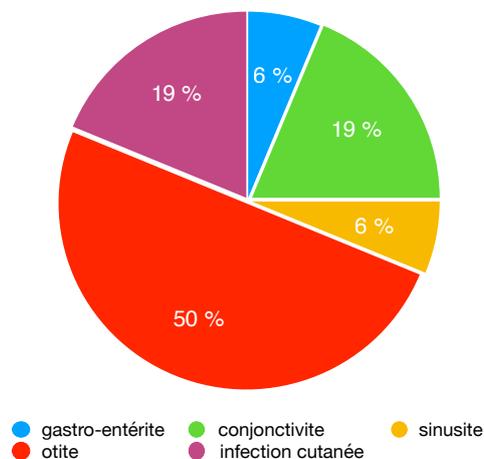


Figure 10- Symptômes ayant été ressentis après une session de surf

La population interrogée représente donc une population de surfeurs confirmés, qui passent en moyenne 3 à 4 fois par semaine plus de 2 heures dans l'eau. Il s'agit donc d'un groupe qui peut être considéré à risque par rapport à l'exposition à la pollution des eaux de surface des zones d'activité nautique.

## 2. Traitement des échantillons

### 1) Mise en culture

Deux prélèvements ont été réalisés sur chaque volontaire (salive et enduit lingual) puis chaque prélèvement a été mis en culture sur trois géloses différentes. 180 géloses ont donc été observées (Figure 11).

Dans le groupe « surfeurs », des colonies se sont développées sur :

- 29 géloses Columbia au sang de mouton sur 30
- 13 géloses Champan sur 30
- 8 géloses Drigalski sur 30

Dans le groupe « témoins », des colonies se sont développées sur :

- 29 géloses Columbia au sang de mouton sur 30
- 21 géloses Chapman sur 30
- 4 géloses Drigalski sur 30

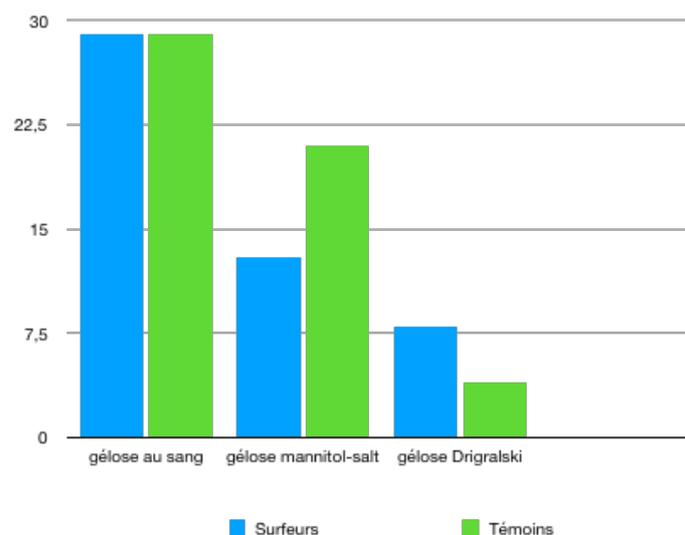


Figure 11- Répartition des colonies sur les différentes géloses

Chaque type de colonie est ensuite décrit et compté. Les colonies présentent des formes, des couleurs et des tailles différentes. 204 colonies sont ainsi décrites.

## 2) Coloration de Gram

Dans le groupe « surfeurs », 99 colonies différentes ont été observées en microscopie optique après culture sur les géloses. 79 de ces colonies ont été conservées et mises en culture en milieu liquide. Dans le groupe « témoins », 105 colonies différentes ont été observées en microscopie optique après culture sur les géloses. 80 colonies ont été conservées et mise en culture en milieu liquide.

Les colonies restantes ne sont pas conservées pour plusieurs raisons :

- L'échantillon de la colonie prélevée n'est pas pur.
- L'observation montre une espèce qui n'est pas pertinente dans notre recherche (*Actinomyces*, *Fusobacterium nucleatum*...)
- L'observation montre qu'il ne s'agit pas d'une bactérie (levure, champignon).
- Il y a plusieurs colonies semblables sur un même culture. L'identification des bactéries débute par l'examen des colonies. Compte tenu du nombre important de colonies, nous avons présumé que les colonies semblables d'une même culture correspondaient à la même espèce bactérienne.

Après une nouvelle observation au microscope optique avec coloration de Gram réalisée sur les échantillons cultivés en milieu liquide, l'observation des bactéries est affinée. Sont conservées les colonies pures qui semblent appartenir à des espèces pertinentes dans notre recherche.

58 colonies sont conservées dans le groupe "surfeurs", et 57 le sont dans le groupe "témoins". Ces échantillons sont congelés en attendant les étapes d'identification. Les colonies qui présentent les mêmes caractéristiques (morphologie de la colonie, aspect en microscopie optique après coloration de Gram, gélose sur laquelle elles ont été isolées...) sont regroupées entre elles (Tableaux 13 et 14).

Groupe « surfeurs » : colonies conservées (58 colonies)			
Description de la colonie	Espèce présumée	Échantillons	Nombre de colonies
colonies blanches, rondes, bombées, Ø1mm	streptocoques	1, 41, 19, 24, 38, 45, 52, 54, 59, 61, 74	11 colonies
colonies grisâtres, rondes, bombées, Ø1mm, halo d'hémolyse partielle verdissante	streptocoques	8, 33, 71, 76, 77, 78, 80, 81, 87	9 colonies
colonies blanches, rondes, Ø0,5mm	streptocoques	42, 66, 72, 79	4 colonies
colonie blanche, ronde, plate, Ø2mm, halo jaune	staphylocoques	47, 53, 92, 94, 95, 96, 97, 98	8 colonies
colonie jaunâtre, Ø<0,05mm, mannitol +, halo jaune	staphylocoques	11, 16, 57	3 colonies
/	bacilles Gram- <i>E.coli</i> / entérobactérie	17, 22, 27, 28, 31, 32, 63	7 colonies
autres	streptocoques	5, 10, 14, 44, 49, 65, 70, 85, 91	9 colonies
autres	/	13 → bacille gram - 15 → bacille gram - 43 → cocobacille gram - 51 → cocobacille gram + 64 → bacille gram + 69 → cocobacille gram + 82 → cocci gram -, bactérie anaérobie ?	7 colonies

Tableau 13- Colonies conservées dans le groupe "surfeurs"

Groupe « témoins » : colonies conservées (57 colonies)			
Description de la colonie	Espèce présumée	Échantillon	Nombre de colonies
colonies blanches, plates, rondes, centre opaque, Ø1-5mm, rondes ou rondes dentelées	streptocoques	rondes : 102, 106, 113, 127, 131, 135, 139, 141, 144, 152, 163, 192  dentelées : 103, 107, 125, 157	15 colonies
colonies blanches, plates, centre opaque, Ø1-5mm, halo d'hémolyse, rondes ou rondes dentelées	streptocoques	hémolyse partielle : 104, 114  hémolyse totale : 99, 109, 115	5 colonies
colonies blanches, dentelées, Ø0,5-4mm, halo d'hémolyse totale	streptocoques	129, 146, 151, 155, 162, 167, 177, 186, 190	9 colonies
colonies blanches, rondes dentelées, plates	streptocoques	133, 136	2 colonies
colonies verdâtres, plates, rondes dentelées, Ø3mm, halo d'hémolyse partielle verdissante	streptocoques	100, 116	2 colonies
colonies à centre orangé, bords irréguliers, Ø1-5mm, halo d'hémolyse totale	streptocoques	154, 160	2 colonies
colonies blanches / blanc jaunâtre, opaques, rondes, plates, Ø1-3mm mannitol +, halo jaune	staphylocoques	112, 150, 165, 170, 176, 178, 179, 181, 184, 195, 199, 203	12 colonies
colonies blanches, rondes, bombées, Ø0,2-0,5mm, mannitol +, halo jaune	staphylocoques	105, 108, 118, 122, 123, 130, 134, 138	8 colonies
colonies orange, rondes dentelées, bombées, Ø1mm	bacilles Gram- <i>E.coli</i> / entérobactérie	185	1 colonie
autres	streptocoques	101	1 colonie

Tableau 14- Colonies conservées dans le groupe "témoins"

Compte tenu de la croissance des staphylocoques sur les géloses MSA, des caractéristiques des colonies, de leur aspect typique en microscopie optique après coloration de Gram, et leur résultat au test de la catalase, nous estimons que les staphylocoques retrouvés sont des *Staphylococcus aureus*. La gélose MSA est utilisée pour l'isolement des staphylocoques pathogènes. Sa forte teneur en chlorure de sodium inhibe la croissance de la plupart des autres espèces.

11 colonies de staphylocoques sont isolées parmi les colonies du groupe "surfeurs". Elles proviennent de 7 sujets différents. 55% de ces staphylocoques sont retrouvés dans les échantillons de salive, et 45% dans les échantillons d'enduit lingual. Dans le groupe "témoins", 12 colonies de staphylocoques sont isolées, chacune provenant d'un sujet différent. Les staphylocoques du groupe "témoins" sont majoritairement (85%) retrouvés dans les échantillons de salive (Figure 12).

80% des sujets du groupe "témoins" présentent une souche de staphylocoques, majoritairement retrouvée dans la salive. Moins de 50% des surfeurs prélevés présentent au moins une souche de staphylocoques. La moyenne de staphylocoques chez les surfeurs est de 3,05 log UFC/mL, et elle est de 3,17 log UFC/ml chez les témoins. (Tableau 15).

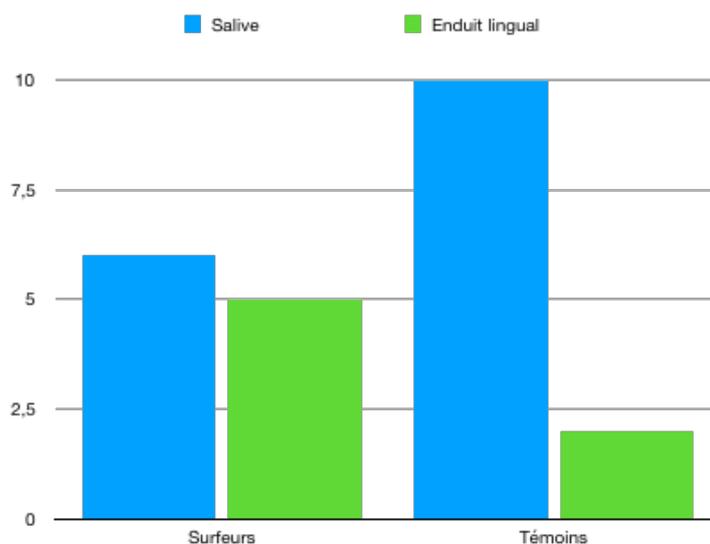


Figure 12 - Répartition des colonies de staphylocoques

Bactéries	Identifiant	Dilution	UFC	log
Staphylocoques du groupe « surfeurs »	11	10 <sup>-2</sup>	1	2,30
	16	10 <sup>-2</sup>	3	2,78
	47	10 <sup>-4</sup>	1	2,30
	53	10 <sup>-4</sup>	10	3,30
	57	10 <sup>-2</sup>	230	4,66
	92	10 <sup>-2</sup>	2	2,60
	95	10 <sup>-2</sup>	1	2,30
	96	10 <sup>-2</sup>	7	4,15
Staphylocoques du groupe « témoins »	105	10 <sup>-2</sup>	112	5,35
	112	10 <sup>-2</sup>	1	2,30
	122	10 <sup>-2</sup>	3	2,78
	123	10 <sup>-2</sup>	1	2,30
	130	10 <sup>-2</sup>	7	3,15
	138	10 <sup>-2</sup>	7	3,15
	150	10 <sup>-2</sup>	6	4,08
	165	10 <sup>-2</sup>	43	4,93
	176	10 <sup>-4</sup>	2	2,60
	181	10 <sup>-2</sup>	3	2,78
	195	10 <sup>-2</sup>	1	2,30
	199	10 <sup>-2</sup>	1	2,30

Tableau 15 - Répartition et comptage des staphylocoques

### 3. Étapes d'identification

#### 1) Résultats des galeries API 20 Strep et API 20 E

Les résultats des galeries API 20 Strep ont été interprétés grâce à la grille de lecture fournie avec les kits de galerie et avec le logiciel d'interprétation des résultats disponible sur le site de l'Union des Professeurs de physiologie, Biochimie et Microbiologie (UPBM) <sup>(105)</sup>.

Les galeries API 20 Strep confirment que la majorité des colonies examinées sont bien des streptocoques (Tableaux 16 et 17). Différentes espèces sont relevées : des espèces

commensales de la flore buccale, comme les streptocoques du genre *mitis*. Certaines des bactéries retrouvées sont associées avec un bon état de santé bucco-dentaire : il s'agit de *Streptococcus sanguinis* <sup>(16,106)</sup>, de *Streptococcus uberis* <sup>(107)</sup>. *Streptococcus salivarius* est lui aussi fortement corrélé avec la bonne santé bucco-dentaire. *Aerococcus viridans* est un microorganisme pathogène, impliqué notamment dans les infections urinaires, qui a longtemps été confondu avec les streptocoques <sup>(108)</sup>. *Streptococcus anginosus* est également un microorganisme commensal de la flore orale. Pathogène opportuniste, il a une forte tendance à se disséminer et peut-être retrouvé dans des infections causant des abcès <sup>(109)</sup>. *Enterococcus faecium* est quant à lui une espèce d'entérocoques moins fréquente qu'*Enterococcus faecalis*.

Les espèces *Veillonella* et *Streptococcus mutans* ne sont pas retrouvées.

Échantillon	Identification donnée par la galerie API 20 Strep	Probabilité
1	<i>streptococcus salivarius</i>	0,795
33	<i>aerococcus viridans</i>	0,607
41	<i>streptococcus uberis</i>	0,500
66	<i>streptococcus anginosus</i>	0,997
77	<i>streptococcus mitis 1</i>	0,749
85	<i>streptococcus anginosus</i>	0,995

Tableau 16- Résultats des galeries API 20 Strep dans le groupe "surfeurs"

Échantillon	Identification donnée par la galerie API 20 Strep	Probabilité
101	<i>streptococcus mitis 1</i>	0,842
104	<i>streptococcus mitis 1</i>	0,614
109	<i>streptococcus salivarius</i>	0,605
116	<i>streptococcus mitis 1</i>	0,570
136	<i>streptococcus anginosus</i>	0,940
141	<i>streptococcus sanguinis</i>	0,603
154	<i>streptococcus uberis</i>	0,676
163	<i>enterococcus faecium</i>	0,464

Tableau 17- Résultats des galeries API 20 Strep dans le groupe "témoins"

Après lecture des galeries API 20 E, il apparaît qu'aucune des colonies n'est identifiée comme *Escherichia coli*. Une grande diversité d'espèces a été relevée (Tableaux 18 et 19). *Serratia marcescens* est une espèce à Gram négatif anaérobie facultative appartenant à la famille des *Enterobacteriaceae*. Pouvant être impliquée dans les infections nosocomiales, cette espèce pathogène opportuniste peut se transmettre via les animaux, humains compris,

et le sol. On les retrouve également dans l'eau <sup>(110,111)</sup>. *Serratia ficaria* fait partie de la même famille d'*Enterobacteriaceae*. *Klebsiella pneumoniae* spp *pneumoniae*, aussi appelée bacille de Friedlander, est l'espèce la plus fréquente du genre *Klebsiella*. Commensales, elles sont ubiquitaires dans le tube digestif et l'appareil respiratoire de l'homme. Elles sont abondamment retrouvées dans les sols et dans l'eau, et peuvent être considérées comme un indicateur de contamination fécale. Capables d'acquérir des mécanismes de résistance aux antibiotiques, *Klebsiella pneumoniae* spp *pneumoniae* est la bactérie à Gram négatif la plus fréquemment impliquée dans les cas de pneumonie nosocomiale <sup>(112)</sup>. Les caractéristiques générales de *Klebsiella oxytoca* sont identiques à celles de *Klebsiella Pneumoniae* <sup>(113)</sup>. *Pantoea spp2* est une espèce de *Pantoeal*, espèce fréquemment retrouvée dans l'eau, les sols et les plantes <sup>(114)</sup>. *Yersinia enterocolitica* est une entérobactérie responsable de diarrhée chez l'homme. Elle peut être retrouvée chez les animaux, la viande crue peut-être contaminée. Les eaux contaminées peuvent également la transmettre <sup>(115)</sup>.

Échantillon	Identification donnée par la galerie API 20 E	Probabilité
17	<i>serratia marcescens</i>	0,938
22	<i>klebsiella pneumoniae spp pneumoniae</i>	0,946
27	<i>serratia ficaria</i>	0,912
28	<i>pantoea spp 2</i>	0,417
31	<i>serratia ficaria</i>	0,603
32	<i>klebsiella oxytoca</i>	0,877
63	<i>pantoea spp 2</i>	0,412
185	<i>yersinia enterocolitica</i>	0,879

Tableau 18- Résultats des galeries API 20 E

Bactéries	Identifiant	Dilution	UFC	log
<i>serratia marcescens</i>	17	/	13	2.41
<i>klebsiella pneumoniae spp pneumoniae</i>	22	/	13	2.41
<i>serratia ficaria</i>	27	/	1	1.30
<i>pantoea spp 2</i>	28	/	2	1.60
<i>serratia ficaria</i>	31	/	>200	3.60
<i>klebsiella oxytoca</i>	32	/	2	1.60
<i>pantoea spp 2</i>	62	/	3	1.78
<i>yersinia enterocolitica</i>	185	/	1	1.30

Tableau 19- Répartition et comptage des entérobactéries retrouvées dans le groupe "surfeurs"

## 2) Résultats des PCR

Aucun streptocoque *mutans* n'est retrouvé avec la PCR, confirmant ainsi les résultats obtenus avec les galeries API 20 Strep.

Trois des colonies testées se révèlent positif pour *Streptococcus salivarius*. Il s'agit des colonies numéro 33, 66 et 109. Cela confirme le résultat obtenu pour l'échantillon 109 avec la galerie API 20 Strep, mais infirme les résultats obtenus pour les échantillons 1, 33 et 66 (Figure 13).

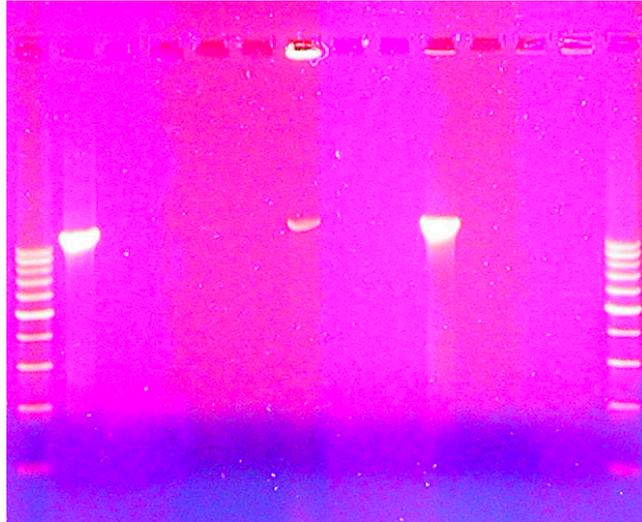


Figure 13- Résultat de la PCR pour *Streptococcus salivarius*

Les résultats de la PCR permettent d'attribuer à plusieurs colonies l'espèce *Streptococcus salivarius* (Tableau 20) et de comparer le groupe "surfeurs" et le groupe "témoins".

Bactéries	Identifiant	Dilution	UFC	log
<b><i>Streptococcus salivarius</i>, groupe « surfeurs »</b>	8	10 <sup>-4</sup>	14	6.45
	33	10 <sup>-4</sup>	11	6.34
	42	10 <sup>-4</sup>	23	6.60
	66	10 <sup>-4</sup>	42	6.92
	71	10 <sup>-4</sup>	1	5.30
	72	10 <sup>-4</sup>	1	5.30
	76	10 <sup>-4</sup>	7	6.15
	77	10 <sup>-4</sup>	8	6.20
	78	10 <sup>-4</sup>	9	6.26
	79	10 <sup>-4</sup>	8	6.20
	80	10 <sup>-4</sup>	4	5.90
	81	10 <sup>-4</sup>	2	5.60
	87	10 <sup>-4</sup>	8	6.20
<b><i>Streptococcus salivarius</i>, groupe « témoins »</b>	99	10 <sup>-4</sup>	3	5.78
	104	10 <sup>-4</sup>	3	5.78
	109	10 <sup>-4</sup>	20	6.60
	114	10 <sup>-4</sup>	4	5.90
	115	10 <sup>-4</sup>	10	6.30

Tableau 20- Colonies identifiées comme *Streptococcus salivarius*

*Streptococcus salivarius* est retrouvé chez environ 53% des surfeurs, et chez environ 27% des témoins. Chez les surfeurs comme chez les témoins, la majorité des *Streptococcus salivarius* est retrouvée dans la salive plutôt que dans l'enduit lingual (85% chez les surfeurs et 83% chez les témoins). La moyenne de *Streptococcus salivarius* dans le groupe "surfeurs" est de 6,11 log UFC/ml. Elle est de 6,07 log UFC pour le groupe "témoins". Il n'existe pas de différence significative concernant la quantité de *Streptococcus salivarius* retrouvée chez les surfeurs ou chez les témoins (Tableau 20).

## 4. Résultats des antibiogrammes

Chez les surfeurs, 8 colonies de staphylocoques ont été retenues après avoir éliminé les doublons (colonies provenant du même prélèvement d'un même sujet) tandis que 12 ont été analysées chez les témoins. (Tableaux 19 et 20).

75% des staphylocoques prélevés chez les surfeurs sont résistants à l'amoxicilline alors qu'aucun des staphylocoques provenant de la population témoin ne l'est. 100% des staphylocoques provenant des surfeurs sont résistants à la spiramycine, contre 83,5% des staphylocoques provenant des témoins. Avec respectivement 87,5% et 83% de résistance à la spiramycine, les staphylocoques retrouvés chez les surfeurs et chez les témoins, il existe peu de différence concernant la résistance à la gentamicine. Concernant l'ofloxacine, seulement 12,5% des staphylocoques originaires des surfeurs y sont résistants, et aucun ne l'est parmi les staphylocoques originaires des témoins. (Figure 13)

Prélèvement	Antibiotiques			
	Amoxicilline	Spiramycine	Gentamicine	Ofloxacine
<b>SURFEURS</b>				
11	5mm inhibition partielle	∅	10mm	40mm
16	∅	16mm	∅	21mm
47	∅ inhibition partielle	∅	21mm	25mm
53	25mm	15mm	12mm	21mm
57	25mm	15mm	10mm	21mm
92	∅	15mm	8mm	22mm
95	∅	15mm	7mm	18mm
96	∅	15mm	9mm	26mm

Tableau 21 - Résultats des antibiogrammes des staphylocoques du groupe "surfeurs"

Prélèvement	Antibiotiques			
	Amoxicilline	Spiramycine	Gentamicine	Ofloxacine
<b>TEMOINS</b>				
105	21mm	17mm	14mm	22mm
112	40mm	18mm	21mm	24mm
122	44mm	18mm	19mm	23mm
123	19mm	17mm	13mm	22mm
130	21mm	17mm	13mm	22mm
138	37mm	16mm	17mm	22mm
150	34mm	17mm	12mm	23mm
165	32mm	∅	14mm	21mm
176	22mm	16mm	14mm	21mm
181	21mm	∅ inhibition partielle	13mm	21mm
195	22mm	15mm	14mm	21mm
199	28mm	14mm	14mm	21mm

Tableau 22- Résultats des antibiogrammes des staphylocoques du groupe "témoins"

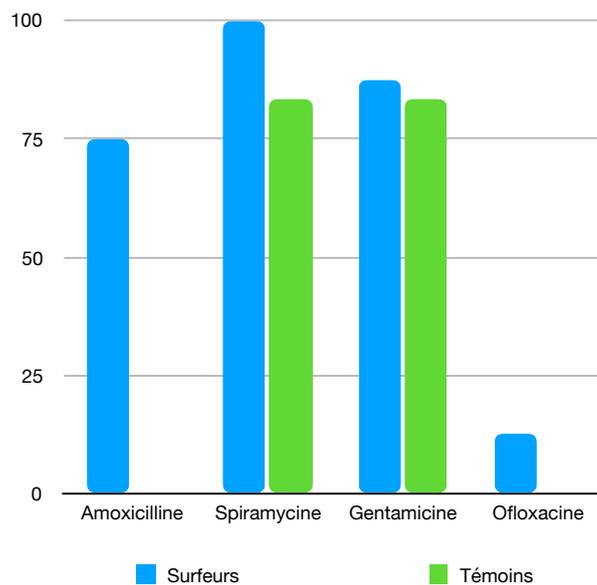


Figure 14 - Antibiorésistance des staphylocoques

# DISCUSSION

L'objectif de cette étude était de démontrer s'il existe, ou non, une influence sur la flore de l'écosystème buccal par l'exposition à la pollution des eaux des zones d'activité nautiques.

Des prélèvements de salive et d'enduit lingual ont été réalisés sur un groupe de surfeurs ainsi que sur un groupe témoin. Deux types d'espèces bactériennes étaient ciblés : des bactéries associées à un bon état de santé bucco-dentaire, *Streptococcus salivarius*, et de bactéries associées aux pathologies bucco-dentaires dont *Streptococcus mutans*, sera le témoin. D'autre part, deux espèces bactériennes pathogènes associées à l'exposition à la pollution des eaux de baignade étaient recherchées, *Staphylococcus aureus* et *Escherichia coli*. La présence d'antibiorésistance était également étudiée.

Le groupe "surfeurs", qui comprend 15 surfeurs pratiquant depuis 9 ans en moyenne et pratiquant plus de 3 fois par semaine pendant plus de 2 heures correspond bien à une exposition à risque. Les études de Stone et de Leonard<sup>(33,91)</sup> démontrent que l'ingestion d'eau plus importante chez les baigneurs est associée avec un risque supplémentaire de pathologie infectieuse.

Les critères d'inclusion et d'exclusion de l'étude permettent d'éliminer les biais. La réalisation des prélèvements du groupe "témoins" en octobre permet de s'assurer que le prélèvement est bien réalisé à distance de la dernière baignade à la plage. Cependant, certains vecteurs de contamination par des bactéries pathogènes, comme la consommation de nourriture crue avant le prélèvement n'ont pas été recherchés, et pourraient considérer des biais dans cette étude.

Pour des raisons pratiques de réalisation des prélèvements et de traitement des échantillons, l'étude ne s'est consacrée qu'à 15 surfeurs et 15 témoins. Tous les prélèvements ont été réalisés par la même personne, et leur traitement a été réalisé par les deux mêmes opérateurs. Le traitement des échantillons n'a pas été fait en double aveugle.

L'objectif de l'étude est partiellement atteint. En effet, une espèce associée à la flore compatible avec un bon état de santé bucco-dentaire, les *Streptococcus salivarius* a été retrouvée dans les deux groupes. Il n'y a pas de différence significative entre les moyennes de *Streptococcus salivarius* (en log UFC/ml). L'exposition à la pollution de l'eau de mer ne semble donc pas influencer la flore compatible avec un bon état de santé bucco-dentaire.

*Streptococcus mutans*, l'un des micro-organismes recherchés, n'a été retrouvé dans aucun des groupes. Les surfeurs comme les témoins présentent une bonne hygiène bucco-dentaire et sont exempts de carie. D'autre part, les géloses utilisées ne sont pas strictement sélectives des *Streptococcus mutans*, ils peuvent donc représenter une population minoritaire et ne pas être retrouvés à la suite des dilutions et des mises en culture.

*Veillonella*, qui était aussi recherchée, n'a pas non plus été retrouvée dans les résultats des galeries API 20 Strep. Les échantillons ayant été dilués puis mis en culture sur différents milieux, une sélection s'est opérée. Les bactéries à croissance rapide les moins exigeantes se sont plus développées, entraînant ainsi une sous estimation de la diversité microbienne des échantillons.

Plusieurs colonies d'entérobactéries se sont développées. Néanmoins, aucune n'appartenait à l'espèce *Escherichia coli*, qui est pourtant l'entérobactérie la plus fréquemment évoquée dans la pollution océanique <sup>(116)</sup>. Une grande diversité d'entérobactéries a été retrouvée, toutes pouvant provenir de la contamination de l'eau et des sols. *Escherichia coli* est un marqueur de la pollution fécale océanique monitoré pour le contrôle de la qualité de l'eau. En France, la grande majorité des plages ont des taux d'*Escherichia coli* très faible pendant la période de contrôle. Il est donc possible que le spot des Estagnots où les prélèvements ont eu lieu ait été indemne de pollution par cette bactérie. Les prélèvements ayant été réalisés en Septembre, et les courants pouvant être dangereux pour la baignade, la plage était fréquentée exclusivement par des surfeurs. Il n'y avait donc pas une population nécessaire pour remettre en suspension les pathogènes contenus dans les sédiments. Enfin, les prélèvements ont été réalisés à distance de fortes précipitations.

L'autre pathogène recherché, *Staphylococcus aureus* a été retrouvé sur une proportion importante des échantillons, puisqu'ils ont été mis en évidence sur les échantillons de 7 des 15 surfeurs et 12 des 15 des témoins. En accord avec les données de la littérature <sup>(33,50,117)</sup>, l'exposition à la pollution de l'eau de mer semble être une voie d'acquisition d'antibiorésistance. Si la différence du nombre de souches de staphylocoques présentant des résistances est peu marquée pour la spiramycine, la gentamycine et l'ofloxacine, elle est très nette pour l'amoxicilline, puisque 75% des souches de staphylocoques des surfeurs y sont résistantes, contre 0 pour les témoins.

Des études réalisées au Mexique et aux Etats Unis <sup>(118,119)</sup> sur des étudiants de services odontologiques interrogent sur la pertinence du choix de ce groupe témoin. En effet, d'après ces études, les étudiants en odontologie seraient plus à même d'être porteurs de staphylocoques résistants aux antibiotiques. En effet, dans son étude, Roberts <sup>(119)</sup> retrouve des staphylocoques résistants à la méthicilline dans des prélèvements provenant du nez et de la gorge de 20% des étudiants en odontologie, contre seulement 6% des étudiants d'autres filières. Martinez-Ruiz retrouve également des staphylocoques résistants à la méthicilline chez 20% des étudiants en dentaire, un taux estimé 10 fois supérieur à celui de la population générale <sup>(118)</sup>. Si les étudiants en odontologie sont plus nombreux à présenter des staphylocoques, il n'y a pas de différence significative concernant le nombre d'UFC. La résistance aux antibiotiques est moindre que celle des surfeurs, et les staphylocoques retrouvés sur les témoins n'ont aucune résistance à l'amoxicilline, contrairement à la majorité des staphylocoques retrouvés dans le groupe "surfeurs". Néanmoins, considérant les données de la littérature, les étudiants en odontologie sont plus exposés que la population générale.

Cette étude est, à notre connaissance, la première étude à s'interroger sur la flore buccale d'une population exposée à la pollution des zones d'activité nautique. Bien que les différentes pathologies infectieuses associées à la baignade en mer aient été étudiées, la porte d'entrée des microorganismes pathogènes n'avait jamais été prise en compte.

Cette étude démontre que l'exposition à la pollution ne perturbe pas la flore associée à un bon état de santé bucco-dentaire, plus fortement liée aux habitudes d'hygiène et alimentaire. Néanmoins, la flore de l'écosystème buccale est contaminée par des bactéries présentant des résistances aux antibiotiques. Dans un contexte où l'antibiorésistance est un enjeu sanitaire crucial, déterminer les sources environnementales de cette contamination est primordial.

D'autres études seraient nécessaires pour déterminer si cette contamination de la flore de l'écosystème buccal, juste après l'exposition, est transitoire ou si elle perdure. Des prélèvements réalisés à distance de la session de surf pourraient être réalisés dans cette optique. Enfin, la réalisation de prélèvements par écouvillon rectal pourrait être pertinente pour déterminer si cette contamination conduit ou non à une colonisation de la flore intestinale.

# CONCLUSION

Les différentes sources de pollution océaniques conduisent à la présence de nombreux microorganismes pathogènes dans les eaux des zones d'activité nautique. Les normes européennes encadrent la qualité de l'eau et permettent d'informer les usagers en cas de risque. Néanmoins, les indicateurs bactériens choisis et les modalités du contrôle sanitaire tendent à sous-estimer la pollution. Les baigneurs sont ainsi à risque de contracter une pathologie infectieuse suite à la baignade, y compris lorsque les eaux sont considérées comme de bonne qualité. Parmi les usagers des zones d'activité nautique, les surfeurs constituent une population à risque. En effet, ils sont plus fréquemment et plus longtemps dans l'eau, et ils ingèrent accidentellement plus d'eau.

Si l'exposition à l'eau de mer ne semble pas influencer les bactéries associées à la bonne santé bucco-dentaire, des bactéries pathogènes comme *Staphylococcus aureus* et différentes entérobactéries ont été retrouvées dans les prélèvements de salive et d'enduit lingual des surfeurs. L'antibiorésistance des bactéries pathogènes est un phénomène préoccupant et en hausse. L'environnement marin serait un vecteur de la contamination par des bactéries présentant des capacités d'antibiorésistance. Les staphylocoques retrouvés chez les surfeurs se sont montrés systématiquement plus résistants aux antibiotiques que les staphylocoques retrouvés chez les témoins. 75% des staphylocoques du groupe « surfeurs » sont d'ailleurs résistants à l'amoxicilline, un antibiotique fréquemment utilisé, alors qu'aucun staphylocoque retrouvé chez les témoins ne présente cette résistance.

Cette étude est la première à s'intéresser à l'influence de cette exposition sur la flore de l'écosystème buccal. Si la présence de ces bactéries pathogènes ne semble pas influencer les bactéries associées à un bon état de santé bucco-dentaire, les surfeurs présentent une flore plus résistante aux antibiotiques. Pour limiter la diffusion des résistances aux antibiotiques, il est nécessaire de comprendre les différents modes d'exposition humaine. Le rôle de l'environnement marin dans le développement et la transmission de ces résistances ainsi que le rôle de la cavité buccale comme porte d'entrée pour des micro-organismes pathogènes méritent des recherches approfondies.

# **BIBLIOGRAPHIE**

1. Aas JA, Paster BJ, Stokes LN, Olsen I, Dewhirst FE. Defining the Normal Bacterial Flora of the Oral Cavity. *J Clin Microbiol*. 2005 Nov 1;43(11):5721–32.
2. Kreth J, Merritt J, Qi F. Bacterial and Host Interactions of Oral Streptococci. *DNA Cell Biol*. 2009 Aug;28(8):397–403.
3. Socransky SS, Manganiello SD. The Oral Microbiota of Man From Birth to Senility. *J Periodontol*. 1971;42(8):485–96.
4. Mantilla Gómez S, Danser MM, Sipos PM, Rowshani B, van der Velden U, van der Weijden GA. Tongue coating and salivary bacterial counts in healthy/gingivitis subjects and periodontitis patients. *J Clin Periodontol*. 2001 Oct;28(10):970–8.
5. Ghannoum MA, Jurevic RJ, Mukherjee PK, Cui F, Sikaroodi M, Naqvi A, et al. Characterization of the oral fungal microbiome (mycobiome) in healthy individuals. *PLoS Pathog*. 2010 Jan 8;6(1):e1000713.
6. Faveri M, Feres M, Shibli JA, Hayacibara RF, Hayacibara MM, de Figueiredo LC. Microbiota of the dorsum of the tongue after plaque accumulation: an experimental study in humans. *J Periodontol*. 2006 Sep;77(9):1539–46.
7. Li J, Helmerhorst EJ, Leone CW, Troxler RF, Yaskell T, Haffajee AD, et al. Identification of early microbial colonizers in human dental biofilm. *J Appl Microbiol*. 2004;97(6):1311–8.
8. Rosan B, Lamont RJ. Dental plaque formation. *Microbes Infect*. 2000 Nov;2(13):1599–607.
9. Diaz PI, Chalmers NI, Rickard AH, Kong C, Milburn CL, Palmer RJ, et al. Molecular characterization of subject-specific oral microflora during initial colonization of enamel. *Appl Environ Microbiol*. 2006 Apr;72(4):2837–48.
10. Palmer RJ, Gordon SM, Cisar JO, Kolenbrander PE. Coaggregation-mediated interactions of streptococci and actinomyces detected in initial human dental plaque. *J Bacteriol*. 2003 Jun;185(11):3400–9.
11. Kolenbrander PE, London J. Adhere today, here tomorrow: oral bacterial adherence. *J Bacteriol*. 1993 Jun;175(11):3247–52.
12. Baker JL, Edlund A. Exploiting the Oral Microbiome to Prevent Tooth Decay: Has Evolution Already Provided the Best Tools? *Front Microbiol*. 2018;9:3323.
13. Bowen WH, Burne RA, Wu H, Koo H. Oral Biofilms: Pathogens, Matrix, and Polymicrobial Interactions in Microenvironments. *Trends Microbiol*. 2018;26(3):229–42.
14. Llana-Puy MC, Montañana-Llorens C, Forner-Navarro L. Cariogenic oral flora and its relation to dental caries. *ASDC J Dent Child*. 2000 Feb;67(1):42–6, 9.
15. Marsh PD. Dental plaque as a biofilm and a microbial community – implications for health and disease. *BMC Oral Health*. 2006 Jun 15;6(Suppl 1):S14.

16. Kreth J, Zhang Y, Herzberg MC. Streptococcal Antagonism in Oral Biofilms: *Streptococcus sanguinis* and *Streptococcus gordonii* Interference with *Streptococcus mutans*. *J Bacteriol.* 2008 Jul 1;190(13):4632–40.
17. Theilade E, Wright WH, Jensen SB, Løe H. Experimental gingivitis in man. *J Periodontal Res.* 1966;1(1):1–13.
18. Marsh PD. Microbial ecology of dental plaque and its significance in health and disease. *Adv Dent Res.* 1994 Jul;8(2):263–71.
19. Periasamy S, Kolenbrander PE. *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* Builds Mutualistic Biofilm Communities with *Fusobacterium nucleatum* and *Veillonella* Species in Saliva. *Infect Immun.* 2009 Sep 1;77(9):3542–51.
20. Socransky SS. Relationship of Bacteria to the Etiology of Periodontal Disease. *J Dent Res.* 1970 Feb 1;49(2):203–22.
21. Paster BJ, Olsen I, Aas JA, Dewhirst FE. The breadth of bacterial diversity in the human periodontal pocket and other oral sites. *Periodontol 2000.* 2006;42:80–7.
22. Chen C, Hemme C, Beleno J, Shi ZJ, Ning D, Qin Y, et al. Oral microbiota of periodontal health and disease and their changes after nonsurgical periodontal therapy. *ISME J.* 2018 May;12(5):1210.
23. Scapoli L, Girardi A, Palmieri A, Testori T, Zuffetti F, Monguzzi R, et al. Microflora and periodontal disease. *Dent Res J.* 2012 Dec;9(Suppl 2):S202–6.
24. Haffajee AD, Socransky SS. Microbial etiological agents of destructive periodontal diseases. *Periodontol 2000.* 1994;5(1):78–111.
25. Bradshaw DJ, Marsh PD, Watson GK, Allison C. Role of *Fusobacterium nucleatum* and Coaggregation in Anaerobe Survival in Planktonic and Biofilm Oral Microbial Communities during Aeration. *Infect Immun.* 1998 Oct;66(10):4729–32.
26. Slots J. *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and *Porphyromonas gingivalis* in periodontal disease: introduction. *Periodontol 2000.* 1999 Jun;20:7–13.
27. David LA, Materna AC, Friedman J, Campos-Baptista MI, Blackburn MC, Perrotta A, et al. Host lifestyle affects human microbiota on daily timescales. *Genome Biol.* 2014;15(7):R89.
28. Sapkota AR, Berger S, Vogel TM. Human pathogens abundant in the bacterial metagenome of cigarettes. *Environ Health Perspect.* 2010 Mar;118(3):351–6.
29. Nasidze I, Li J, Quinque D, Tang K, Stoneking M. Global diversity in the human salivary microbiome. *Genome Res.* 2009 Apr;19(4):636–43.
30. Seymour GJ, Ford PJ, Cullinan MP, Leishman S, Yamazaki K. Relationship between periodontal infections and systemic disease. *Clin Microbiol Infect.* 2007 Oct;13:3–10.
31. Sudhakara P, Gupta A, Bhardwaj A, Wilson A. Oral Dysbiotic Communities and Their Implications in Systemic Diseases. *Dent J [Internet].* 2018 Apr 16 [cited 2019 Feb 14];6(2). Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6023521/>
32. Han YW, Wang X. Mobile microbiome: oral bacteria in extra-oral infections and inflammation. *J Dent Res.* 2013 Jun;92(6):485–91.
33. Leonard AFC, Zhang L, Balfour AJ, Garside R, Gaze WH. Human recreational exposure to antibiotic resistant bacteria in coastal bathing waters. *Environ Int.* 2015 Sep;82:92–100.

34. Directive 76/160/CEE du Conseil, du 8 décembre 1975, concernant la qualité des eaux de baignade.
35. Directive 2000/60/CE du Parlement européen et du Conseil du 23 octobre 2000 établissant un cadre pour une politique communautaire dans le domaine de l'eau.
36. Directive Européenne 2006/7/CE du Parlement européen et du Conseil concernant la gestion de la qualité des eaux de baignade et abrogeant la directive 76/160/CEE.
37. Wu J, Long SC, Das D, Dorner SM. Are microbial indicators and pathogens correlated? A statistical analysis of 40 years of research. *J Water Health*. 2011 Jun;9(2):265–78.
38. Leonard AFC, Singer A, Ukoumunne OC, Gaze WH, Garside R. Is it safe to go back into the water? A systematic review and meta-analysis of the risk of acquiring infections from recreational exposure to seawater. *Int J Epidemiol*. 2018 01;47(2):572–86.
39. Pond K. Water Recreation and Disease: Plausibility of Associated Infections: Acute Effects, Sequelae and Mortality. *Water Intell Online* [Internet]. 2013 Sep [cited 2019 Feb 12];12. Available from: <https://iwaponline.com/ebooks/book/605/>
40. European Environment Agency. Qualité des eaux de baignade européennes en 2017. [Internet]. 2018 [cited 2019 Feb 10]. Available from: <https://data.europa.eu/doi/10.2800/365035>
41. Stevenson AH. Studies of Bathing Water Quality and Health. *Am J Public Health Nations Health*. 1953 May;43(5 Pt 1):529–38.
42. World Health Organization, editor. Guidelines for safe recreational water environments. Geneva: World Health Organization; 2003. 2 p.
43. Boehm AB, Ashbolt NJ, Colford JM, Dunbar LE, Fleming LE, Gold MA, et al. A sea change ahead for recreational water quality criteria. *J Water Health*. 2009 Mar;7(1):9–20.
44. Prüss A. Review of epidemiological studies on health effects from exposure to recreational water. *Int J Epidemiol*. 1998 Feb;27(1):1–9.
45. Cabelli VJ, Dufour AP, McCABE LJ, Levin MA. SWIMMING-ASSOCIATED GASTROENTERITIS AND WATER QUALITY. *Am J Epidemiol*. 1982 Apr 1;115(4):606–16.
46. Young N. The association between marine bathing and infectious diseases– a review. *J Mar Biol Assoc U K*. 2016 Feb;96(01):93–100.
47. Wade TJ, Pai N, Eisenberg JNS, Colford JM. Do U.S. Environmental Protection Agency water quality guidelines for recreational waters prevent gastrointestinal illness? A systematic review and meta-analysis. *Environ Health Perspect*. 2003 Jun;111(8):1102–9.
48. Benjamin Arnold John M.Colford, Ayse Ercumen, Jade Benjamin-Chung. The Surfer Health Study - A Three-Year Study Examining Illness Rates Associated with Surfing During Wet Weather. Southern California Coastal Water Research Project; 2016.
49. Fewtrell L, Kay D. Recreational Water and Infection: A Review of Recent Findings. *Curr Environ Health Rep*. 2015;2(1):85–94.
50. Plano LR, Garza AC, Shibata T, Elmir SM, Kish J, Sinigalliano CD, et al. Shedding of *Staphylococcus aureus* and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* from adult and pediatric bathers in marine waters. *BMC Microbiol*. 2011 Jan 6;11:5.
51. Graczyk TK, Sunderland D, Awantang GN, Mashinski Y, Lucy FE, Graczyk Z, et al. Relationships among bather density, levels of human waterborne pathogens, and fecal coliform

- counts in marine recreational beach water. *Parasitol Res.* 2010 Apr;106(5):1103–8.
52. Elmir SM, Wright ME, Abdelzaher A, Solo-Gabriele HM, Fleming LE, Miller G, et al. Quantitative evaluation of bacteria released by bathers in a marine water. *Water Res.* 2007 Jan;41(1):3–10.
  53. Yamahara KM, Layton BA, Santoro AE, Boehm AB. Beach sands along the California coast are diffuse sources of fecal bacteria to coastal waters. *Environ Sci Technol.* 2007 Jul 1;41(13):4515–21.
  54. Goodwin KD, McNay M, Cao Y, Ebentier D, Madison M, Griffith JF. A multi-beach study of *Staphylococcus aureus*, MRSA, and enterococci in seawater and beach sand. *Water Res.* 2012 Sep 1;46(13):4195–207.
  55. Papastergiou P, Mouchtouri V, Pinaka O, Katsiaflaka A, Rachiotis G, Hadjichristodoulou C. Elevated Bathing-Associated Disease Risks Despite Certified Water Quality: A Cohort Study. *Int J Environ Res Public Health.* 2012 May;9(5):1548–65.
  56. Papastergiou P, Mouchtouri VA, Rachiotis G, Pinaka O, Katsiaflaka A, Hadjichristodoulou C. Bather density as a predominant factor for health effects related to recreational bathing: results from the Greek bathers cohort study. *Mar Pollut Bull.* 2011 Mar;62(3):590–5.
  57. Turbow DJ, Osgood ND, Jiang SC. Evaluation of recreational health risk in coastal waters based on enterococcus densities and bathing patterns. *Environ Health Perspect.* 2003 Apr;111(4):598–603.
  58. Arnold BF, Schiff KC, Ercumen A, Benjamin-Chung J, Steele JA, Griffith JF, et al. Acute Illness Among Surfers After Exposure to Seawater in Dry- and Wet-Weather Conditions. *Am J Epidemiol.* 2017 Oct 1;186(7):866–75.
  59. (1) (PDF) Acute Illness Among Surfers After Exposure to Seawater in Dry- and Wet-Weather Conditions [Internet]. ResearchGate. [cited 2019 Feb 11]. Available from: [https://www.researchgate.net/publication/316896983\\_Acute\\_Illness\\_Among\\_Surfers\\_After\\_Exposure\\_to\\_Seawater\\_in\\_Dry-\\_and\\_Wet-Weather\\_Conditions](https://www.researchgate.net/publication/316896983_Acute_Illness_Among_Surfers_After_Exposure_to_Seawater_in_Dry-_and_Wet-Weather_Conditions)
  60. Zmirou D, Pena L, Ledrans M, Letertre A. Risks associated with the microbiological quality of bodies of fresh and marine water used for recreational purposes: summary estimates based on published epidemiological studies. *Arch Environ Health.* 2003 Nov;58(11):703–11.
  61. Yau V, Wade TJ, de Wilde CK, Colford JM. Skin-related symptoms following exposure to recreational water: a systematic review and meta-analysis. *Water Qual Expo Health.* 2009 May 1;1(2):79–103.
  62. Kay D, Jones F, Wyer MD, Fleisher JM, Salmon RL, Godfree AF, et al. Predicting likelihood of gastroenteritis from sea bathing: results from randomised exposure. *The Lancet.* 1994 Oct 1;344(8927):905–9.
  63. Curriero FC, Patz JA, Rose JB, Lele S. The association between extreme precipitation and waterborne disease outbreaks in the United States, 1948-1994. *Am J Public Health.* 2001 Aug;91(8):1194–9.
  64. Akanbi OE, Njom HA, Fri J, Otigbu AC, Clarke AM. Antimicrobial Susceptibility of *Staphylococcus aureus* Isolated from Recreational Waters and Beach Sand in Eastern Cape Province of South Africa. *Int J Environ Res Public Health.* 2017 01;14(9).
  65. Nasser AM, Zaruk N, Tenenbaum L, Netzan Y. Comparative survival of *Cryptosporidium*, coxsackievirus A9 and *Escherichia coli* in stream, brackish and sea waters. *Water Sci Technol.* 2003 Feb 1;47(3):91–6.

66. Gerba CP, Goyal SM, LaBelle RL, Cech I, Bodgan GF. Failure of indicator bacteria to reflect the occurrence of enteroviruses in marine waters. *Am J Public Health*. 1979 Nov;69(11):1116–9.
67. Calderon RL, Mood EW, Dufour AP. Health effects of swimmers and nonpoint sources of contaminated water. *Int J Environ Health Res*. 1991 Mar;1(1):21–31.
68. World Health Organization, editor. *Antimicrobial resistance: global report on surveillance*. Geneva, Switzerland: World Health Organization; 2014. 232 p.
69. Blaak H, de Kruijf P, Hamidjaja RA, van Hoek AHAM, de Roda Husman AM, Schets FM. Prevalence and characteristics of ESBL-producing *E. coli* in Dutch recreational waters influenced by wastewater treatment plants. *Vet Microbiol*. 2014 Jul;171(3–4):448–59.
70. Nordmann P, Dortet L, Poirel L. Carbapenem resistance in Enterobacteriaceae: here is the storm! *Trends Mol Med*. 2012 May;18(5):263–72.
71. Montezzi LF, Campana EH, Corrêa LL, Justo LH, Paschoal RP, da Silva ILVD, et al. Occurrence of carbapenemase-producing bacteria in coastal recreational waters. *Int J Antimicrob Agents*. 2015 Feb;45(2):174–7.
72. *Escherichia coli* bacteraemia: annual data [Internet]. GOV.UK. [cited 2019 Feb 10]. Available from: <https://www.gov.uk/government/statistics/escherichia-coli-e-coli-bacteraemia-annual-data>
73. MRSA bacteraemia: annual data [Internet]. GOV.UK. [cited 2019 Feb 10]. Available from: <https://www.gov.uk/government/statistics/mrsa-bacteraemia-annual-data>
74. Dortet L, Cuzon G, Ponties V, Nordmann P. Trends in carbapenemase-producing Enterobacteriaceae, France, 2012 to 2014. *Eurosurveillance* [Internet]. 2017 Feb 9 [cited 2019 Feb 10];22(6). Available from: <http://www.eurosurveillance.org/ViewArticle.aspx?ArticleId=22715>
75. Gaze W, O'Neill C, Wellington E, Hawkey P. Antibiotic resistance in the environment, with particular reference to MRSA. *Adv Appl Microbiol*. 2008;63:249–80.
76. Turgeon P, Michel P, Levallois P, Chevalier P, Daignault D, Crago B, et al. Antimicrobial-resistant *Escherichia coli* in public beach waters in Quebec. *Can J Infect Dis Med Microbiol J Can Mal Infect Microbiol Medicale*. 2012;23(2):e20-25.
77. dianna.parker. Proceedings of the Second Research Workshop on Microplastic Marine Debris | OR&R's Marine Debris Program [Internet]. 2015 [cited 2019 Feb 13]. Available from: [/proceedings-second-research-workshop-microplastic-marine-debris, https://marinedebris.noaa.gov/proceedings-second-research-workshop-microplastic-marine-debris](https://marinedebris.noaa.gov/proceedings-second-research-workshop-microplastic-marine-debris)
78. Cole M, Lindeque P, Halsband C, Galloway TS. Microplastics as contaminants in the marine environment: A review. *Mar Pollut Bull*. 2011 Dec 1;62(12):2588–97.
79. Yang Y, Liu G, Song W, Ye C, Lin H, Li Z, et al. Plastics in the marine environment are reservoirs for antibiotic and metal resistance genes. *Environ Int*. 2019 Feb 1;123:79–86.
80. Derraik JGB. The pollution of the marine environment by plastic debris: a review. *Mar Pollut Bull*. 2002 Sep;44(9):842–52.
81. Teuten EL, Rowland SJ, Galloway TS, Thompson RC. Potential for plastics to transport hydrophobic contaminants. *Environ Sci Technol*. 2007 Nov 15;41(22):7759–64.
82. Arias-Andres M, Klümper U, Rojas-Jimenez K, Grossart H-P. Microplastic pollution increases gene exchange in aquatic ecosystems. *Environ Pollut Barking Essex* 1987. 2018

Jun;237:253–61.

83. Fédération Française de Surf - Accueil - Surfingfrance.com [Internet]. [cited 2019 Feb 14]. Available from: <https://www.surfingfrance.com/>
84. Fleisher JM, Kay D, Salmon RL, Jones F, Wyer MD, Godfree AF. Marine waters contaminated with domestic sewage: nonenteric illnesses associated with bather exposure in the United Kingdom. *Am J Public Health*. 1996 Sep;86(9):1228–34.
85. Fleisher JM, Fleming LE, Solo-Gabriele HM, Kish JK, Sinigalliano CD, Plano L, et al. The BEACHES Study: health effects and exposures from non-point source microbial contaminants in subtropical recreational marine waters. *Int J Epidemiol*. 2010 Oct;39(5):1291–8.
86. Soller JA, Schoen M, Steele JA, Griffith JF, Schiff KC. Incidence of gastrointestinal illness following wet weather recreational exposures: Harmonization of quantitative microbial risk assessment with an epidemiologic investigation of surfers. *Water Res*. 2017 15;121:280–9.
87. Dwight RH, Baker DB, Semenza JC, Olson BH. Health Effects Associated With Recreational Coastal Water Use: Urban Versus Rural California. *Am J Public Health*. 2004 Apr;94(4):565–7.
88. Dorevitch S, Pratap P, Wroblewski M, Hryhorczuk DO, Li H, Liu LC, et al. Health risks of limited-contact water recreation. *Environ Health Perspect*. 2012 Feb;120(2):192–7.
89. Dufour AP, Evans O, Behymer TD, Cantú R. Water ingestion during swimming activities in a pool: A pilot study. *J Water Health*. 2006 Dec;4(4):425–30.
90. Allen LM, Briggles TV, Pfaffenberger CD. Absorption and excretion of cyanuric acid in long-distance swimmers. *Drug Metab Rev*. 1982;13(3):499–516.
91. Stone DL, Harding AK, Hope BK, Slaughter-Mason S. Exposure assessment and risk of gastrointestinal illness among surfers. *J Toxicol Environ Health A*. 2008;71(24):1603–15.
92. Schijven J, de Roda Husman AM. A survey of diving behaviour and accidental water ingestion among Dutch occupational and sport divers to assess the risk of infection with waterborne pathogenic microorganisms. *Environ Health Perspect*. 2006 May;114(5):712–7.
93. Blaak H, Van Rooijen S, Schuijt M, Van Leeuwen A, Italiaander I, Van der Berg H. Prevalence of antibiotic resistant bacteria in the rivers Meuse, Rhine and New Meuse. Prevalentie van antibioticaresistente bacteriën in Maas, Rijn en Nieuwe Maas [Internet]. 2012 Mar 8 [cited 2019 Feb 13]; Available from: <https://rivm.openrepository.com/handle/10029/259859>
94. Leonard AFC, Zhang L, Balfour AJ, Garside R, Hawkey PM, Murray AK, et al. Exposure to and colonisation by antibiotic-resistant *E. coli* in UK coastal water users: Environmental surveillance, exposure assessment, and epidemiological study (Beach Bum Survey). *Environ Int*. 2018 May;114:326–33.
95. Haute Autorité de la Santé. Stratégies de prévention de la carie dentaire - Synthèse et Recommandations [Internet]. 2010. Available from: <https://www.has-sante.fr>
96. Stérilisation des brosses à dents Etude sur des brosses Inava® - Clinic n° 10 du 01/11/2012 [Internet]. [cited 2019 Feb 13]. Available from: <http://www.editionscdp.fr/revues/clinic/article/n-10/sterilisation-des-brosses-a-dents-etude-sur-des-brosses-inavar.html>
97. Larpent J-P, Larpent-Gourgau M. Mémento technique de microbiologie: microorganismes eucaryotes et procaryotes, structure, métabolisme, systématique, applications industrielles, milieux de culture et réactifs. Paris, France: Technique & Documentation, DL 1990; 1990. xii+417.

98. Mullis K, Faloona F, Scharf S, Saiki R, Horn G, Erlich H. Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol.* 1986;51 Pt 1:263–73.
99. Friedberg EC. The eureka enzyme: the discovery of DNA polymerase. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2006;7(2):143–7.
100. Higuchi R, Dollinger G, Walsh PS, Griffith R. Simultaneous amplification and detection of specific DNA sequences. *Biotechnol Nat Publ Co.* 1992 Apr;10(4):413–7.
101. Oho T, Yamashita Y, Shimazaki Y, Kushiyama M, Koga T. Simple and rapid detection of *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sobrinus* in human saliva by polymerase chain reaction. *Oral Microbiol Immunol.* 2000;15(4):258–62.
102. Igarashi T, Yano Y, Yamamoto A, Sasa R, Goto N. Identification of *Streptococcus salivarius* by PCR and DNA probe. *Lett Appl Microbiol.* 2001 Jun;32(6):394–7.
103. Brody JR, Calhoun ES, Gallmeier E, Creavalle TD, Kern SE. Ultra-fast high-resolution agarose electrophoresis of DNA and RNA using low-molarity conductive media. *BioTechniques.* 2004 Oct;37(4):598, 600, 602.
104. Société Française de Microbiologie. Comité de l'antibiogramme de la Société Française de Microbiologie - Recommandations 2018 V.2.0 Septembre [Internet]. 2018. Available from: <https://www.sfm-microbiologie.org>
105. UPBM - [Internet]. [cited 2019 Feb 14]. Available from: <https://www.upbm.org/>
106. Zhu B, Macleod LC, Kitten T, Xu P. *Streptococcus sanguinis* biofilm formation & interaction with oral pathogens. *Future Microbiol.* 2018 Jun;13(8):915–32.
107. Hillman JD, Socransky SS, Shivers M. The relationships between streptococcal species and periodontopathic bacteria in human dental plaque. *Arch Oral Biol.* 1985 Jan 1;30(11):791–5.
108. Rasmussen M. *Aerococcus*: an increasingly acknowledged human pathogen. *Clin Microbiol Infect.* 2016 Jan 1;22(1):22–7.
109. Combinations of bacterial species in endodontic infections - Peters - 2002 - International Endodontic Journal - Wiley Online Library [Internet]. [cited 2019 Feb 8]. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1046/j.1365-2591.2002.00550.x>
110. Van Houdt R, Givskov M, Michiels CW. Quorum sensing in *Serratia*. *FEMS Microbiol Rev.* 2007 Jul;31(4):407–24.
111. Laupland KB, Parkins MD, Gregson DB, Church DL, Ross T, Pitout JDD. Population-based laboratory surveillance for *Serratia* species isolates in a large Canadian health region. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis Off Publ Eur Soc Clin Microbiol.* 2008 Feb;27(2):89–95.
112. Lawlor MS, Hsu J, Rick PD, Miller VL. Identification of *Klebsiella pneumoniae* virulence determinants using an intranasal infection model. *Mol Microbiol.* 2005 Nov;58(4):1054–73.
113. Hua J-Q, Yu L. Cloning and characterization of a Flavin-free oxygen-insensitive azoreductase from *Klebsiella oxytoca* GS-4-08. *Biotechnol Lett.* 2019 Jan 11;
114. Delétoile A, Decré D, Courant S, Passet V, Audo J, Grimont P, et al. Phylogeny and Identification of *Pantoea* Species and Typing of *Pantoea* agglomerans Strains by Multilocus Gene Sequencing. *J Clin Microbiol.* 2009 Feb 1;47(2):300–10.
115. Schaake J, Kronshage M, Uliczka F, Rohde M, Knuuti T, Strauch E, et al. Human and

Animal Isolates of *Yersinia enterocolitica* Show Significant Serotype-Specific Colonization and Host-Specific Immune Defense Properties. *Infect Immun*. 2013 Nov;81(11):4013–25.

116. Price RG, Wildeboer D. *E. coli* as an Indicator of Contamination and Health Risk in Environmental Waters. In: Samie A, editor. *Escherichia coli* - Recent Advances on Physiology, Pathogenesis and Biotechnological Applications [Internet]. InTech; 2017 [cited 2019 Feb 14]. Available from: <http://www.intechopen.com/books/-i-escherichia-coli-i-recent-advances-on-physiology-pathogenesis-and-biotechnological-applications/-i-e-coli-i-as-an-indicator-of-contamination-and-health-risk-in-environmental-waters>

117. Leonard AFC, Zhang L, Balfour AJ, Garside R, Hawkey PM, Murray AK, et al. Exposure to and colonisation by antibiotic-resistant *E. coli* in UK coastal water users: Environmental surveillance, exposure assessment, and epidemiological study (Beach Bum Survey). *Environ Int*. 2018 May 1;114:326–33.

118. Martínez-Ruíz FJ, Carrillo-Espíndola TY, Bustos-Martínez J, Hamdan-Partida A, Sánchez-Pérez L, Acosta-Gío AE. Higher prevalence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* among dental students. *J Hosp Infect*. 2014 Mar;86(3):216–8.

119. Roberts MC, Soge OO, Horst JA, Ly KA, Milgrom P. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* from dental school clinic surfaces and students. *Am J Infect Control*. 2011 Oct 1;39(8):628–32.

# ANNEXES

Annexe 1.  
Formulaire d'information et de consentement distribué aux participants.

## Qualité de l'eau des zones d'activité nautique : impact sur la flore de l'écosystème buccal

Mme Marie Lavaud, étudiante à la faculté d'odontologie de Bordeaux.

Les eaux de baignade en mer sont contaminées par une pollution bactérienne et chimique. L'exposition à cette pollution est associée à un risque augmenté de pathologies infectieuses et constitue une « menace pour la santé humaine » d'après un rapport de l'Agence Européenne pour l'Environnement. La cavité buccale représente une porte d'entrée et un réservoir pour les bactéries pathogènes. Cependant, leur présence et leur influence sur la flore de l'écosystème buccal chez des personnes en contact prolongé avec ces eaux polluées n'ont, à notre connaissance, pas été étudiées.

Dans le cadre de cette thèse, des prélèvements de salive et d'enduit lingual seront réalisés chez des surfeurs et chez un groupe témoin (non surfeurs) afin de rechercher la présence de bactéries potentiellement pathogènes et étudier l'influence de la pollution des eaux des zones d'activité nautique sur les bactéries associées à un bon état de santé bucco-dentaire.

Je, soussigné(e) ....., suis invité(e) à participer à la thèse intitulée « Qualité de l'eau des zones d'activité nautique : impact sur la flore de l'écosystème buccal » menée par l'étudiante Marie LAVAUD de la faculté d'odontologie de Bordeaux sous la supervision du Dr Cécile BADET. Ma participation consistera à donner un échantillon de salive et d'enduit lingual. Je ne recevrai aucune indemnisation pour ma participation à cette thèse.

Je, soussigné(e) ....., participe volontairement à cette thèse menée par Mme Marie LAVAUD sous la supervision du Dr Cécile BADET.

Formulaire de consentement en deux exemplaires, dont une copie à ma disposition.

Date : / /

Signature du participant :

**Qualité de l'eau des zones d'activité nautique : impact sur la flore de l'écosystème buccal**

**I. IDENTIFICATION**

Nom : Prénom : Date de naissance :

Profession et catégorie socio-professionnelle :

- 1. Agriculteurs exploitants
- 2. Artisans, commerçants et chefs d'entreprise
- 3. Cadres et professions intellectuelles supérieures
- 4. Professions intermédiaires
- 5. Employés
- 6. Ouvriers
- 7. Retraités
- 8. Autres personnes sans activité professionnelle
  - 84. Élèves, étudiants

**II. ANTECEDENTS MEDICAUX**

Êtes-vous en bonne santé ?  Oui  Non

Si non :

- Troubles cardiovasculaires : .....
- Troubles rénaux : .....
- Troubles digestifs : .....
- Troubles hépatiques : .....
- Troubles nerveux (ex : épilepsie) : .....
- Troubles pulmonaires (ex : asthme) : .....
- Troubles oculaires : .....
- Troubles ORL : .....
- Diabète : .....
- Radiothérapie / Chimiothérapie : .....
- Autres : .....

### III. PRISES MEDICAMENTEUSES

Suivez-vous un traitement médicamenteux ?  Oui  Non

Si oui, lequel : .....

Avez-vous pris des antibiotiques durant les 4 dernières semaines ?

Oui  Non

Avez-vous utilisé un bain de bouche antiseptique durant les 2 dernières semaines ?

Oui  Non

### IV. HABITUDES DE CONSOMMATION

#### 1. Alimentation

Pensez-vous avoir une alimentation équilibrée ?  Oui  Non

Suivez-vous un régime alimentaire spécial ?  Oui  Non

Si oui, lequel ? .....

Consommez-vous des aliments sucrés entre les repas ?  Oui  Non

#### 2. Boisson

Que buvez-vous

pendant les repas?

rien  eau  boisson sucrée  boisson énergétique ou énergisante  alcool

entre les repas ?

rien  eau  boisson sucrée  boisson énergétique ou énergisante  alcool

pendant les sessions ?

rien  eau  boisson sucrée  boisson énergétique ou énergisante  alcool

#### 3. Tabac

Fumez-vous ?  Oui  Non

Si oui, combien de cigarettes par jour ?  moins de 5  entre 5 et 10  plus de 10

depuis : .....

#### 4. Cannabis

Consommez-vous du cannabis ?  Oui  Non

Si oui, à quelle fréquence ? .....

### V. EXAMEN BUCCO-DENTAIRE

De quand date votre dernier rendez-vous chez le dentiste ?  moins d'un an  plus d'un an

Pour quelle raison aviez-vous consulté ?  contrôle  douleur  gêne

Quelle est la fréquence de vos rendez vous chez le dentiste ?

tous les 6 mois  tous les ans  tous les 2 ans  en urgence

Combien de brossage réalisez-vous quotidiennement ?

0  1  2  3  4 ou plus

Avez-vous ou avez-vous eu un traitement orthodontique ?

- non                       oui, en cours     oui, achevé                       prévu  
depuis.....

Quel type d'appareil a été ou est utilisé pour le traitement orthodontique ?

- amovible (ex : gouttières)                       fixe (ex : bagues)

**Examen bucco-dentaire**

- Présence de plaque :     Oui                       Non  
 Présence de tartre :     Oui                       Non  
 Présence d'inflammation gingivale :                       Oui                       Non

Schéma dentaire

18	17	16	15	14	13	12	11	21	22	23	24	25	26	27	28
[ ]	[ ]	[ ]	[ ]	[ ]	[ ]	[ ]	[ ]	[ ]	[ ]	[ ]	[ ]	[ ]	[ ]	[ ]	[ ]
[ ]	[ ]	[ ]	[ ]	[ ]	[ ]	[ ]	[ ]	[ ]	[ ]	[ ]	[ ]	[ ]	[ ]	[ ]	[ ]
48	47	46	45	44	43	42	41	31	32	33	34	35	36	37	38

C : dent cariée, O : dent obturée, A : dent absente pour cause de carie

**VI. SURF**

Depuis combien de temps pratiquez-vous le surf ? .....

Combien de fois surfez-vous par semaine ? .....

Combien de temps passez-vous dans l'eau par session ? .....

Comment définiriez-vous votre niveau ?

- débutant                       intermédiaire     confirmé                       compétition

Après avoir surfé, avez-vous déjà ressenti un ou des symptômes

- de gastro-entérite ?     Oui                       Non  
 de conjonctivite ?     Oui                       Non  
 de sinusite ?     Oui                       Non  
 d' otite ?     Oui                       Non  
 d' infection cutanée ?     Oui                       Non

**Qualité de l'eau des zones d'activité nautique : impact sur la flore de l'écosystème buccal**

**II. IDENTIFICATION**

Nom :

Prénom :

Date de naissance :

Profession et catégorie socio-professionnelle :

- 1. Agriculteurs exploitants
- 2. Artisans, commerçants et chefs d'entreprise
- 3. Cadres et professions intellectuelles supérieures
- 4. Professions intermédiaires
- 5. Employés
- 6. Ouvriers
- 7. Retraités
- 8. Autres personnes sans activité professionnelle
  - 84. Élèves, étudiants

**III. ANTECEDENTS MEDICAUX**

Êtes-vous en bonne santé ?

Oui

Non

Si non :

- Troubles cardiovasculaires : .....
- Troubles rénaux : .....
- Troubles digestifs : .....
- Troubles hépatiques : .....
- Troubles nerveux (ex : épilepsie) : .....
- Troubles pulmonaires (ex : asthme) : .....
- Troubles oculaires : .....
- Troubles ORL : .....
- Diabète : .....
- Radiothérapie / Chimiothérapie : .....
- Autres : .....

#### IV. PRISES MEDICAMENTEUSES

Suivez-vous un traitement médicamenteux ?  Oui  Non

Si oui, lequel : .....

Avez-vous pris des antibiotiques durant les 4 dernières semaines ?

Oui  Non

Avez-vous utilisé un bain de bouche antiseptique durant les 2 dernières semaines ?

Oui  Non

#### V. HABITUDES DE CONSOMMATION

##### 2. **Alimentation**

Pensez-vous avoir une alimentation équilibrée ?  Oui  Non

Suivez-vous un régime alimentaire spécial ?  Oui  Non

Si oui, lequel ? .....

Consommez-vous des aliments sucrés entre les repas ?  Oui  Non

##### 3. **Boisson**

Que buvez-vous

pendant les repas?

rien  eau  boisson sucrée  boisson énergétique ou énergisante  alcool

entre les repas ?

rien  eau  boisson sucrée  boisson énergétique ou énergisante  alcool

pendant les sessions ?

rien  eau  boisson sucrée  boisson énergétique ou énergisante  alcool

##### 4. **Tabac**

Fumez-vous ?  Oui  Non

Si oui, combien de cigarettes par jour ?  moins de 5  entre 5 et 10  plus de 10

depuis : .....

##### 5. **Cannabis**

Consommez-vous du cannabis ?  Oui  Non

Si oui, à quelle fréquence ? .....

### **PROTOCOLE PRÉLÈVEMENTS**

Prélèvement à faire après la session, avant la consommation de boisson.  
Faire remplir le formulaire de consentement et le questionnaire médical et réaliser l'examen bucco-dentaire.  
Identifier le formulaire, le questionnaire et les flacons avec les initiales.

### **SALIVE**

Faire cracher 1 ml de salive dans le flacon.

### **ENDUIT LINGUAL**

Faire avaler la salive puis tirer la langue. Avec une brosse à dents Inava 15/100ème préalablement stérilisée, frotter la face dorsale de la langue pendant 10 à 15 secondes. Immerger la brosse à dents dans le sérum physiologique d'abord sans toucher les parois puis en les frottant.

Stérilisation de la brosse à dents : mettre la brosse à dents dans un verre d'eau au micro-ondes à 600W pendant 1 minute.

Vu, le Président du Jury,

Date, Signature :

Vu, le Directeur de l'UFR des Sciences Odontologiques,

Date, Signature :

Vu, le Président de l'Université de Bordeaux,

Date, Signature :

## **Titre : Qualité de l'eau des zones d'activité nautique : influence sur la flore de l'écosystème buccal sur une population de surfeurs**

### **Résumé**

La cavité buccale peut être une porte d'entrée ainsi qu'un réservoir pour des microorganismes pathogènes. L'environnement est une voie de transmission de microorganismes pathogènes. La pollution de l'eau est associée à différentes pathologies systémiques et à l'exposition à des bactéries résistantes aux antibiotiques. Les surfeurs représentent une population à risque.

**Matériel et méthodes :** Des prélèvements de salive et d'enduit lingual ont été réalisés chez 15 surfeurs et 15 témoins. Après mise en culture sur gélose, les colonies bactériennes ont été isolées et identifiées par des méthodes biochimiques et moléculaires. Des antibiogrammes ont été réalisés pour les staphylocoques.

**Résultats :** Il n'y a pas de différence significative concernant la quantité de *Streptococcus salivarius* retrouvée chez les surfeurs et les témoins. *Streptococcus mutans* n'a pas été identifié parmi les colonies isolées. Différentes entérobactéries ont été retrouvées dans les échantillons de surfeurs, mais pas *Escherichia coli*. 7 surfeurs et 12 témoins étaient porteurs de staphylocoques. Les staphylocoques provenant des surfeurs sont plus résistants aux antibiotiques (75% de résistance à l'amoxicilline pour les staphylocoques de surfeurs, 0% pour ceux des témoins).

**Conclusion :** L'exposition à l'eau de mer ne semble pas influencer les bactéries associées à une bonne santé bucco-dentaire mais pourrait être une source de microorganismes pathogènes et notamment de bactéries résistantes aux antibiotiques.

**Mots clés :** Ecosystème buccal, Pollution de l'eau, Contamination bactérienne, Zone d'activité nautique

## **Title : Recreational water quality : influence on oral bacterial flora in a population of surfers**

### **Abstract**

Oral cavity can be both a gateway and a reservoir for pathogenic micro-organisms. Environment is a pathogenic micro-organisms transmission route. Water pollution is associated with different systemic diseases and with antibiotic resistant bacterias. Surfers represent an high-risk population.

**Material and methods :** Collection of saliva and tongue coating samples has been carried out on 15 surfers and 15 controls. After agar-based cultures, bacteria colonies were isolated and identified using biochemical and molecular methods. Antibiograms were performed for *Staphylococcus*.

**Results :** There is no significant difference on *Streptococcus salivarius* quantity between surfers and controls. *Streptococcus mutans* has not been identified among the isolated colonies. Different enteric bacterias were found in surfer samples, but no *Escherichia coli*. *Staphylococcus* were found on 7 surfers and 12 controls. *Staphylococcus* carried out by surfers are more likely to resist to antibiotics (75% of surfers *Staphylococcus* resist to amoxicillin, compared to 0% of *Staphylococcus* from the control group).

**Conclusion :** Recreational water exposure does not appear to affect the bacterias associated with oral health but might be a source of micro-organisms and notably a source of antibiotic resistant bacterias.

**Key words :** Oral Ecosystem, Water Pollution, Bacterial Contamination, Recreational Water