

<b>Titre du rapport</b>	Rapport final du projet BACTRAC 2	
<b>Auteurs du rapport (par ordre alphabétique)</b>	Amine Boukerb Amélie Charrier Frédéric Garabétian Michèle Gourmelon Adeline Jouanillou Mélanie Lesne Hélène Moussard Emmanuelle Quenot Isabelle Vitte	LSEM-Ifremer LPL UMR CNRS 5805 EPOC LSEM-Ifremer LPL LPL UMR CNRS 5805 EPOC LSEM-Ifremer LPL
<b>Période couverte par le rapport</b>	Septembre 2018	Mars 2020

<b>Titre du projet</b>	BACTéries fécales, TRACeurs de contamination dans les eaux (projet 2)
<b>Acronyme du projet</b>	BACTRAC 2
<b>Durée du projet</b>	Juin 2016 – Mars 2020
<b>Types de projet</b>	Projet d'étude environnementale (BacTrac 2 – 3,5 ans)

<b>Coordinateur de projet</b>	Laboratoires des Pyrénées et des Landes	Isabelle VITTE i.vitte@labopl.com
<b>Partenaires financiers</b>	Agence de l'Eau Adour Garonne AEAG)	Jean-Jacques CHEVALIER jean-jacques.chevalier@eau-adour-garonne.fr
	Communauté d'Agglomération Pays Basque (CAPB)	Caroline SARRADE C.SARRADE@communaute-paysbasque.fr
	Syndicat Intercommunal du Bassin d'Arcachon (SIBA)	Adeline THEVAND a.thevand@siba-bassin-arcachon.fr
<b>Partenaires scientifiques</b>	UMR CNRS 5805 EPOC	Frédéric GARABETIAN frederic.garabetian@u-bordeaux.fr
	LSEM-Ifremer	Michèle GOURMELON Michele.Gourmelon@ifremer.fr
	Laboratoires des Pyrénées et des Landes (LPL)	Isabelle VITTE i.vitte@labopl.com
<b>Partenaires techniques</b>	Communauté d'Agglomération Pays Basque (CAPB)	Katixa HUGUENARD k.huguenard@SMBVN.fr
	Syndicat Intercommunal du Bassin d'Arcachon (SIBA)	Adeline THEVAND a.thevand@siba-bassin-arcachon.fr
<b>Partenaire coordinateur</b>	Groupement d'Intérêt Scientifique Littoral Basque	Caroline LUMMERT C.Lummert@communaute-paysbasque.fr
	Communauté d'Agglomération Pays Basque (CAPB)	Mathilde LARQUIER M.Larquier@communaute-paysbasque.fr



# BACTERIES FECALES, TRACEURS DE CONTAMINATION DANS LES EAUX

## PROJET BACTRAC 2

### RAPPORT FINAL

Juin 2016 – Mars 2020



## Table des matières

1	Contexte et objectifs du projet.....	1
1.1	Contexte .....	1
1.2	Objectifs.....	1
2	Partenaires scientifiques et implication dans le projet.....	2
3	Structuration en lots, livrables et calendrier .....	5
3.1	Structuration en lots.....	5
3.2	Calendrier .....	6
3.3	Livrables et rendus .....	7
4	Coordination générale du projet .....	8
5	Développement de la trousse BacTrac .....	9
5.1	Sélection/développement des marqueurs de la trousse .....	9
5.2	Validation des marqueurs selon la norme NF-47-600.....	11
5.3	Focus sur les marqueurs aviaires.....	13
5.4	Metabarcoding : Protocole d'analyse des données de séquençage des échantillons fécaux	19
5.4.1	L'approche de metabarcoding pour la recherche de nouveaux marqueurs.....	19
5.4.2	Profils d'abondances relatives.....	20
5.4.3	Analyse de la diversité intra-spécifique ( $\alpha$ ) des communautés bactériennes .....	27
5.4.4	Analyse de la diversité inter-spécifique ( $\beta$ ) des communautés bactériennes .....	28
5.4.5	Identification de marqueur(s) potentiel(s) par source.....	29
6	Etude de persistance de marqueurs.....	32
6.1.1	Etude de persistance des marqueurs humains - Cas d'une eau résiduaire urbaine ....	33
6.1.2	Etudes de persistance des marqueurs bovins .....	37
6.1.3	Etude de persistance des marqueurs volaille.....	40
6.1.4	Etude de persistance mixte .....	44
6.1.5	Conclusion sur les études de persistance.....	51
7	Etude de cas par la trousse BacTrac .....	53
7.1	Echantillonnage : critères de sélection, choix des stations, stratégie et modalités.....	53
7.1.1	Généralités sur les bassins versants sélectionnés pour échantillonnage.....	53
7.1.2	Choix et emplacement des stations de prélèvement.....	55
7.1.3	Plan d'échantillonnage .....	63

7.1.4	Critères de déclenchement de campagnes d'échantillonnage.....	64
7.1.5	Stratégie d'échantillonnage .....	65
7.1.6	Campagnes de prélèvements réalisées .....	65
7.2	Résultats.....	66
7.2.1	Evaluation de marqueurs <i>in situ</i> : « spécificité diagnostique » .....	66
7.2.2	Etude des bassins versants.....	67
7.2.3	Cas de contamination inexpliquée.....	85
8	Méthodologie Bactrac : description et recommandations .....	87
9	Valorisation du projet.....	89
9.1	Communications orales .....	89
9.2	Présentations par affiche.....	90
9.3	Rapports de stage diplômants.....	90
	Références bibliographiques .....	91

Remerciements à :

M Thomas De Récy et M Freddy Lajusticia, CCI Bayonne Pays Basque

Mme Katixa Huguenard, Communauté d'Agglomération Pays Basque

M Clément Happe, Mme Nathalie Hamon et Jean-Philippe Besse, Syndicat Intercommunal du Bassin d'Arcachon

M Cyril Noël et Mme Laure Quintric, SebiMER, Ifremer

Mme Véronique Loiseau et M Luc Dantan, LSEM, Ifremer

Equipes Logistique, Microbiologie et Hydrobiologie, Laboratoires des Pyrénées et des Landes

# 1 Contexte et objectifs du projet

## 1.1 Contexte

Le contrôle des eaux de baignade est aujourd'hui géré par la directive européenne 2006/7/CE qui remplace l'ensemble des dispositions prévues par la directive précédente (directive 76/160/CEE). Cette réglementation renforce notamment le principe de gestion des eaux de baignade en introduisant l'établissement d'un profil. L'établissement d'un profil de baignade inclut, notamment pour les eaux de moindre qualité, l'identification des sources de pollutions pouvant affecter la qualité de l'eau et présenter un risque pour la santé des baigneurs. Ainsi, dans le cas où un risque de pollution est identifié, des mesures de gestion appropriées doivent être mises en œuvre pour assurer la protection sanitaire de la population grâce à des actions visant à limiter voire à supprimer ces sources de pollution. L'objectif est d'atteindre et de maintenir des eaux de « qualité suffisante » sur l'ensemble du territoire. Les acteurs de l'eau sont donc confrontés à une nouvelle réglementation avec pour seuls outils l'historique et les cartographies des zones de baignades et de leur bassin versant et les indicateurs de contamination fécale, *Escherichia coli* et entérocoques. L'analyse de ces derniers, par méthode culturale (dénombrement), bien qu'elle permette de mettre en évidence une contamination fécale, ne conduit en aucun cas à l'identification des origines de ces contaminations, animales ou humaines, chroniques ou accidentelles, ponctuelles ou diffuses. Il est donc nécessaire de mettre en place des outils techniques permettant d'identifier ces sources sur des bases scientifiques afin de répondre à ce besoin. Dans cet objectif, diverses techniques dites de *Microbial Source Tracking* (MST-Identification des sources de contamination microbienne) basées sur la recherche de cibles microbiennes ou chimiques présentes dans le tractus intestinal de l'Homme ou de l'animal et dans les effluents d'origine fécale ou de cellules eucaryotes de l'hôte (ADN mitochondriaux) ont été étudiées, développées et appliquées sur sites depuis la fin des années 1990 (Bernhard & Field, 2000, Harwood, 2014 ; Harwood et al., 2014 ; Villemur et al., 2015, Jardé et al., 2018). Aujourd'hui, sur un plan international, ces méthodes MST sont considérées comme essentielles dans le contexte de la qualité de l'eau et un grand nombre d'études scientifiques et de développements applicatifs voient le jour (Brown et al., 2017; Xue et al., 2017). Plusieurs études présentant des comparaisons de marqueurs MST ont d'ailleurs été publiées (Yahya et al., 2017 ; Zhang et al., 2020). Identifier l'origine des contaminations est aujourd'hui indispensable pour une gestion raisonnée, préventive et organisée des milieux naturels. Ainsi, les acteurs en charge du suivi de la qualité et de la gestion des milieux aquatiques à usage récréatif ont besoin d'outils analytiques fiables afin de satisfaire à ces réglementations, ce que propose de leur apporter le présent projet.

## 1.2 Objectifs

L'objectif du projet BacTrac est de réunir deux structures de recherche, chacune experte dans leur domaine et sur leur technique de MST, et LPL, laboratoire EPIC spécialiste de l'analyse des eaux en routine dans le cadre notamment des surveillances de baignades, pour proposer une solution scientifique unique en France pouvant répondre au besoin des collectivités gestionnaires des eaux et des bassins versants face à la réglementation en vigueur. BacTrac propose donc de combiner deux

techniques différentes intégrées dans une méthodologie complète. Plus qu'un simple outil d'analyse, BacTrac est une méthodologie de diagnostic des bassins versants et des eaux de baignade associées, comprenant des étapes successives complémentaires et indissociables. La structure même de cette méthodologie permettra donc d'apporter des conclusions fiables et scientifiquement cohérentes par rapport à la problématique considérée.

Le projet BacTrac comprend deux projets distincts mais complémentaires, BacTrac 1 et BacTrac 2.

BacTrac 1, projet de recherche industrielle, avait pour objectif de développer une technique de *Microbial Source Tracking* culture et collection dépendante, par simplification, optimisation et automatisation d'une technique précédemment développée dans le cadre du projet OSQUAR-IDFEC (2009-2011, Garabétian et al, 2013). A terme, BacTrac 1 devait permettre d'obtenir une méthode avec des délais de traitement d'échantillons réduits au minimum, une automatisation optimale pour son utilisation en routine, une garantie de répétabilité d'analyse et un logiciel informatique spécialement adapté pour la mise en œuvre de la méthode. La méthode ainsi obtenue, contrairement à la méthode antérieure lourde et fastidieuse à mettre en œuvre, devait permettre son utilisation en routine. Elle se serait affranchie de l'aspect « opérateur dépendant » pour gagner en fiabilité d'analyse et d'interprétation et aurait permis ainsi sa transposition dans n'importe quel laboratoire. Cette méthode aurait été utilisée dans le cadre du deuxième projet, BacTrac 2. Le projet BacTrac 1, n'ayant pas mené aux résultats escomptés, est consigné dans un rapport scientifique indépendant (Rapport final BacTrac 1). Le travail et les résultats en découlant, ne pouvant pas faire l'objet d'analyses en routine, n'ont donc pas été intégrés dans BacTrac 2 dont les résultats sont, eux, opérationnels pour des analyses systématiques dans le cadre de la gestion de qualité des eaux des territoires, comme décrit par la suite.

BacTrac 2, projet d'étude environnementale, vise à développer une méthodologie complète comprenant une trousse à outils multi marqueurs pour la détermination des origines de contamination fécale dans les eaux de surface. Il comprend trois parties techniques. La première est axée sur la sélection et le développement de marqueurs spécifiques à l'hôte basés sur une technique MST culture indépendante par qPCR (*Quantitative Polymerase Chain Reaction*). La seconde, plus fondamentale, concerne l'étude de persistance de ces marqueurs, ainsi que des indicateurs fécaux, en fonction de paramètres environnementaux en conditions contrôlées. Enfin, la troisième est une étude de cas sur bassins versants d'intérêt de différentes taille et répartis sur la côte Nouvelle Aquitaine afin d'évaluer le fonctionnement de la méthode et d'en définir les points critiques ainsi que la méthodologie finale. Le présent rapport fait état des travaux et des résultats exclusivement de ce projet BacTrac 2.

## 2 Partenaires scientifiques et implication dans le projet

Le projet BacTrac 2 associe 3 partenaires scientifiques dont 2 structures de type EPIC, LPL et IFREMER LSEM et une structure académique (UMR CNRS 5805 EPOC). Le tableau suivant présente la description de chaque partenaire ainsi que l'implication de chacun dans le projet.

Partenaire 1	Laboratoires des Pyrénées et des Landes (LPL)
Présentation	<p>Les LPL sont issus de la fusion de 3 laboratoires départementaux (département 64, 65 et 40). Ils ont été regroupés sous le statut d'EPIC en 1998. La structure regroupe 330 personnes au sein de 3 laboratoires (Lagor, Tarbes et Mont-de-Marsan) certifiés par le COFRAC (NF EN ISO/CEI 17025) et BPL (Bonnes Pratiques de Laboratoire). Les LPL, au travers de leur activité d'analyse, proposent plus de 2000 paramètres analytiques en environnement et 1300 en biologie. 55000 échantillons environnementaux sont analysés par an et 555000 en biologie. De plus, une unité de recherche et développement en biologie est entièrement dédiée au développement de méthodes innovantes.</p>
Implication	<p>Le rôle des LPL dans ce projet est de coordonner les partenaires ainsi que les actions administratives et scientifiques du projet, de réaliser les échantillonnages sur sites et les analyses de l'ensemble des échantillons des bassins versants ateliers, de développer de nouveaux marqueurs PCR qui feront partie de la trousse à outils BacTrac et de développer la méthodologie BacTrac comprenant cette trousse, en étroite collaboration avec les partenaires scientifiques.</p>
Partenaire 2	Ifremer, LSEM (Laboratoire Santé Environnement et Microbiologie)
Présentation	<p>Les objectifs du laboratoire Santé, Environnement et Microbiologie (LSEM) correspondent aux enjeux actuels de santé publique, d'aménagement durable et de préservation de la qualité de l'environnement.</p> <p>Ce laboratoire est Laboratoire National de Référence pour la Microbiologie des coquillages (LNR), aspect santé humaine, depuis 2003. Dans ce cadre, LSEM apporte son soutien aux administrations et organise des essais inter-laboratoires (EIL) et des journées d'information et/ou de formation. Le LSEM développe une approche globale concernant la qualité des eaux littorales et des coquillages dans les zones de production. Ses travaux se déclinent en une approche pluridisciplinaire alliant : (i) la mise au point d'outils de détection rapide des pathogènes (bactéries et virus) dans les coquillages destinés à la consommation et dans l'environnement, (ii) l'identification des paramètres environnementaux favorisant ces contaminations, (iii) l'identification de l'origine des sources de contamination (développement et application de marqueurs), (iv) l'analyse de coquillages impliqués dans des épidémies, incluant l'identification des souches et une approche quantitative.</p> <p>Enfin, le LSEM est à l'origine du projet Marquopoleau dont l'objectif était de développer une trousse à outils basée sur une approche de <i>Microbial Source</i></p>

	<i>Tracking</i> culture et collection indépendante (MST PCR) pour déterminer les origines de contaminations fécales dans les eaux dont certains marqueurs ont été inclus dans la trousse à outils BacTrac.
Implication	Le rôle du LSEM dans ce projet est d'apporter ses connaissances sur des marqueurs <i>Bacteroidales</i> associées à l'hôte, de participer à la sélection et à la validation des marqueurs aviaires de la littérature, de caractériser les communautés bactériennes aviaires par l'acquisition de données NGS (technologie de séquençage à haut débit ; metabarcoding 16S) et de les comparer à des communautés d'autres sources (effluents de station d'épuration, échantillons fécaux d'origine bovine ...), de développer de nouveaux marqueurs qPCR à partir de ces données et de mener une expérience <i>in vitro</i> sur la persistance des marqueurs en milieu environnemental. Par son expérience et son expertise dans le domaine du <i>Microbial Source Tracking</i> , il participe activement à l'analyse, à l'interprétation des résultats et au développement de la méthodologie finale BacTrac.
Partenaire 3	UMR CNRS 5805 EPOC
Présentation	L'UMR EPOC (Environnements et Paléoenvironnements Océaniques et Continentaux) est une Unité Mixte de Recherche (UMR 5805) commune à plusieurs organismes : l'Université Bordeaux 1, le Centre National de la Recherche Scientifique via l'Institut National des Sciences de l'Univers, l'Université Bordeaux 4, l'École Pratique des Hautes Etudes. Ses principaux domaines d'activités sont : (i) la Recherche scientifique dans l'ensemble des domaines relatifs à l'étude des environnements et paléo-environnements aquatiques, océaniques et continentaux. Cette composante de l'activité d'EPOC est structurée en trois thématiques principales : (1) l'Ecotoxicologie, (2) l'Océanographie côtière, et (3) les Géosciences marines sur lesquelles l'UMR EPOC entend se positionner nationalement et internationalement, (ii) la Formation à et par la Recherche. Au sein de l'Université Bordeaux 1, les personnels enseignants-chercheurs d'EPOC sont notamment impliqués dans : (1) la Mention de Master Sciences de la Terre, Environnement, Ecologie dont les deux spécialités Ecotoxicologie - Chimie de l'Environnement, et Océanographie ont été conçues en miroir aux trois thématiques de recherche de l'UMR et (2) un Master international en Environnement et Ressources Marines (Master MER), (iii) l'Observation qui comprend à la fois des composantes long terme et haute fréquence. Ces activités sont conduites en étroite association avec l'OASU et souvent dans le cadre de réseaux nationaux (ex, le Service d'Observation du Milieu Littoral, et le Réseau National Réseau-Mar dont les animations scientifiques sont assurées par des personnels d'EPOC).

	Il est également à l'origine du développement d'une méthode de <i>Microbial Source Tracking</i> culture et collection dépendante (MST culture) (projet OSQUAR-IDFEC) et détient la collection de référence (33) du projet BacTrac 1.
Implication	Le rôle d'EPOC dans le projet réside dans le suivi des bactéries <i>Escherichia coli</i> dans le cadre des analyses de persistance des marqueurs en microcosmes (lot 4). Par son expérience et son expertise dans le domaine du <i>Microbial Source Tracking</i> , il participe activement à l'analyse, à l'interprétation des résultats et au développement de la méthodologie finale BacTrac.

### 3 Structuration en lots, livrables et calendrier

#### 3.1 Structuration en lots

Le projet BacTrac 2 est structuré en 5 lots, chacun divisé en différentes tâches.

- Un lot de coordination (Lot 1) rassemblant le management, le suivi administratif, la propriété intellectuelle et la veille (**LPL/LSEM/EPOC**),
- Trois lots techniques permettant de répondre aux objectifs :
  - Lot 2 – Développement/validation de marqueurs pour la méthode (**LPL/LSEM**)
  - Lot 3 – Etude sur bassins versants en Nouvelle Aquitaine (**LPL/LSEM**)
  - Lot 4 – Etude *in vitro* de persistance des marqueurs en milieux naturels (**LSEM/EPOC/LPL**)
- Le dernier lot (Lot 5) comprend la synthèse générale des résultats (**LPL/LSEM/EPOC**).

### 3.2 Calendrier

Lot de travail	Axe principal	Tâches	Description des tâches	Acteurs	Durée en mois	2016												2017												2018												2019												2020		
						6	7	8	9	10	11	12	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	1	2	3					
Lot 1	Coordination/valorisation	1.1	Coordination technique, administrative et financière	LPL/EPOC/LS EM	46	6	7	8	9	10	11	12	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	1	2	3					
		1.2	Accord de consortium	LPL/EPOC/LS EM	7	6	7	8	9	10	11	12	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	1	2	3					
		1.3	Valorisation scientifique et technique	LPL/EPOC/LS EM	46	6	7	8	9	10	11	12	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	1	2	3					
Lot 2	Méthode MST PCR	2.1	Développement des marqueurs	LSEM/LPL	19	6	7	8	9	10	11	12	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	1	2	3					
		2.2	Validation des marqueurs et méthodologie	LSEM/LPL	7	6	7	8	9	10	11	12	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	1	2	3					
Lot 3	Etude de cas BV	3.1	Echantillonnage	LPL	30	6	7	8	9	10	11	12	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	1	2	3					
		3.2	Traitement des échantillons	LPL	30	6	7	8	9	10	11	12	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	1	2	3					
		3.3	Analyse des échantillons	LPL	19	6	7	8	9	10	11	12	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	1	2	3					
		3.4	Interprétation des données	LPL/EPOC/LS EM	17	6	7	8	9	10	11	12	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	1	2	3					
Lot 4	Etude de persistance des marqueurs en pilotes	4.1	Persistance en <b>source unique</b> (microcosmes) Bacteroides + E coli	LSEM	21	6	7	8	9	10	11	12	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	1	2	3					
		4.2	Persistance en <b>multisources</b> (microcosmes) Bacteroides + E coli	LSEM	12	6	7	8	9	10	11	12	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	1	2	3					
		4.3	Analyse/Synthèse	LSEM	14	6	7	8	9	10	11	12	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	1	2	3					
Lot 5	Synthèse générale	Synthèse cartographie BV / Procédures d'utilisation de BacTrac / Critères d'applicabilité	LPL/EPOC/LS EM	12	6	7	8	9	10	11	12	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	1	2	3						
BACTRAC 1	Méthode MST culture	Optimisation, automatisation et mise en routine	EPOC/LPL	40	6	7	8	9	10	11	12	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	1	2	3						

Restitution finale

Clôture du projet

### 3.3 Livrables et rendus

Le projet BacTrac 2 a démarré le 1<sup>er</sup> juin 2016 et s'est terminé en mars 2020. Les livrables attendus sont résumés dans le tableau suivant :

Lot	Descriptif des livrables	Date de remise au coordinateur
Coordination	<p><b>L1.1a</b> : Compilation des fiches d'avancement technique</p> <p><b>L1.1b</b> : Compte rendu des réunions du comité technique</p> <p><b>L1.1c</b> : Réunions COPIIL/COTECH</p> <p><b>L1.1d</b> : Rapport écrit d'avancement du projet</p>	<p><b>L1.1a</b> : mensuel</p> <p><b>L1.1b</b> : trimestriel</p> <p><b>L1.1c</b> : biannuel</p> <p><b>L1.1d</b> : annuel</p>
Lot 2	<p><b>L2.1</b> : Liste des marqueurs à développer</p> <p><b>L2.2</b> : Rapports de validation des marqueurs fonctionnels/contrôle interne d'extraction / protocole d'interprétation de la méthode MST PCR</p>	<p><b>L2.1</b> : décembre 2016</p> <p><b>L2.2</b> : décembre 2017</p>
Lot 3	<p><b>L3.1</b> : Tableau récapitulatif des échantillonnages comprenant toutes les informations terrain nécessaires</p> <p><b>L3.2</b> : Synthèse des échantillons traités</p> <p><b>L3.3</b> : Synthèse des échantillons analysés</p> <p><b>L3.4</b> : Synthèse comparative des résultats de détermination des origines fécales selon les deux méthodes, détermination du degré de contamination seuil pour leur application et cartographie du bassin versant (degré de contamination et origines associées)</p>	<p><b>L3.1</b> : Mars 2019</p> <p><b>L3.2</b> : Mars 2019</p> <p><b>L3.3</b> : juin 2019</p> <p><b>L3.4</b> : septembre 2019</p>
Lot 4	<p><b>L4.1</b> : Bilan des résultats en microcosmes simples ; une seule source</p> <p><b>L4.2</b> : Bilan des résultats en microcosmes complexes ; plusieurs sources</p> <p><b>L4.3</b> : Tableau de synthèse des résultats des expériences de persistance des marqueurs dans les eaux. Utilisation de ces résultats pour l'interprétation des résultats obtenus sur les eaux environnementales des sites pilotes (Lot 3)</p>	<p><b>L4.1</b> : décembre 2018</p> <p><b>L4.2</b> : mars 2019</p> <p><b>L4.3</b> : décembre 2019</p>
Lot 5	<p><b>L5</b> : Synthèse et cartes d'identité des bassins versants / Procédure d'utilisation de l'outil de détermination des origines de contaminations fécales / Critères d'applicabilité des méthodes MST développées/sélectionnées dans ce projet sur des eaux environnementales.</p>	<p><b>L5</b> : décembre 2019</p>

## 4 Coordination générale du projet

Le projet BacTrac 2 est coordonné par LPL en termes de suivi technique et scientifique ainsi qu'en termes d'organisation administrative. Ainsi, chaque mois, un rapport mensuel technique est rempli par chaque partenaire scientifique, compilé puis archivé par LPL. Des réunions technico-scientifiques sont menées environ tous les 3 mois entre partenaires scientifiques et peuvent être convoquées à n'importe quel moment en cas de besoin. C'est également le cas entre partenaires techniques. Enfin, une réunion du comité de pilotage et du comité technique est prévue tous les 6 mois, selon le besoin et les avancées, convoquant physiquement l'ensemble des partenaires financiers, scientifiques et techniques afin de faire, d'une part, un état d'avancement du projet (calendrier, financier, administratif, technique) et, d'autre part, un point sur les difficultés rencontrées et sur le respect des échéances. Les points techniques critiques et les décisions d'orientation scientifiques sont également débattus lors de ces réunions. Chacune des réunions fait l'objet d'un compte-rendu validé par chaque partenaire et archivé par LPL. Le tableau suivant résume les différentes actions de coordination réalisées entre juin 2016 et mars 2020 :

Type de suivi	Type de rapport/réunion	Date
Mensuel	Rapport technique	Juin 2016 à mars 2020 = 32 rapports
Trimestriel	Réunions techniques	12 mai 2016 (ACBA/ASPB/LPL/GIS) 8 juin 2016 (LPL interne) 15 juin 2016 (ACBA/Syndicat Mixte Nive/LPL) 13 septembre 2016 (Ifremer/LPL) 30 septembre 2016 (ACPB/Syndicat mixte Nive/LPL) 7 octobre 2016 (ACBA/ASPB/LPL) 18 octobre 2016 (EPOC/LPL) 16 et 17 novembre 2016 (LPL, interne) 4 janvier 2017 (LPL interne) 12 janvier 2017 (EPOC/LPL) 14 avril 2017 (Ifremer/LPL) 2 mai 2017 (EPOC/LPL) 20 juillet 2017 (EPOC/LPL) 12 sept 2017 (K Huguenard/LPL) 23 octobre 2017 (Ifremer/LPL) 18 décembre 2017 (EPOC/LPL) 6 avril 2018 (EPOC/LPL) 20 avril 2018 (Ifremer/LPL) 28 juin 2018 (Ifremer/EPOC/LPL) 12 juillet 2018 (CAPB/LPL/EPOC) 23 octobre 2018 (LPL/CAPB) 7 novembre 2018 (EPOC/LPL) 11 février 2019 (Ifremer/LPL) 26 avril 2019 (EPOC/LPL)

Type de suivi	Type de rapport/réunion	Date
Biannuel ou annuel selon besoin et avancement	Réunion physique COPIIL/COTECH	21 juin 2016 (Kick off)
		7 décembre 2016
		8 juin 2017
		7 décembre 2017
		14 décembre 2018
		10 décembre 2019

## 5 Développement de la trousse BacTrac

### 5.1 Sélection/développement des marqueurs de la trousse

La méthode MST PCR (*Microbial Source Tracking - Polymerase Chain Reaction*) retenue dans le cadre du projet BacTrac 2 consiste à rechercher certaines bactéries, sans étape de culture, dans des échantillons d'eaux pour identifier l'origine de la contamination fécale présente dans ces échantillons. Pour cela, l'objectif est de détecter les bactéries présentes, spécifiquement associées au tractus digestif de l'Homme ou des animaux. Elles sont mises en évidence après concentration, extraction des acides nucléiques et amplification des séquences spécifiques (marqueurs). Pour être spécifiques à une bactérie, ces séquences ciblent les régions hyper variables du gène de l'*ARNr 16S*. Une seconde approche possible est de détecter et d'amplifier un gène de l'hôte directement. Pour cela, les mitochondries sont ciblées. Ces petits organites, ayant un rôle dans la respiration cellulaire, sont présents en plusieurs exemplaires dans toutes les cellules de l'hôte et ont l'avantage supplémentaire de posséder leur propre génome (différent de l'ADN nucléaire) en plusieurs copies également. On parle alors de marqueurs mitochondriaux. Le principe d'utilisation des mitochondries dans les études MST repose sur la présence de cellules animales dans les fèces. En effet, lorsqu'il y a excrétion des matières fécales, un certain nombre de cellules constituant l'épithélium intestinal vont se retrouver excrétées avec les fèces. Le gène ciblé par PCR va ainsi se trouver de façon abondante dans les fèces de l'espèce d'intérêt. Les marqueurs mitochondriaux possèdent donc l'avantage de cibler directement l'ADN de l'espèce d'intérêt et garantissent alors une forte spécificité, ce qui n'est pas toujours constaté avec les marqueurs bactériens.

Le travail réalisé au LPL avait notamment pour but la mise en place d'une trousse à outils de marqueurs PCR en temps réel en couplant, pour un hôte cible, un marqueur bactérien avec un marqueur mitochondrial. L'utilisation combinée de ces marqueurs permet d'accroître la fiabilité de l'analyse par une vérification de la réponse apportée par le marqueur bactérien, ou bien dans certains cas, par l'obtention d'une information plus précise quant à la source exacte de la pollution fécale. C'est notamment le cas pour le marqueur bactérien « ruminants » qui ne permet pas de faire de distinction entre les ovins et les bovins. Le développement de marqueurs mitochondriaux ciblant d'une part les bovins et d'autre part les ovins peut ainsi s'avérer très utile lorsque des mesures doivent être prises vis-à-vis d'une espèce précise.

Qu'ils soient bactériens ou mitochondriaux, les marqueurs de la trousse BacTrac sont amenés à être des outils d'aide à la gestion des bassins versants. Il est donc important, dans un premier temps, de cibler des sources de contamination fécale majoritaires et potentiellement problématiques dans la ou les zone(s) d'intérêt, puis de valider chacun des marqueurs développés selon la norme NF U 47-600 pour garantir l'analyse.

La première origine de contamination à distinguer est la source humaine, l'activité ou les infrastructures étant les sources sur lesquelles plusieurs leviers d'action sont généralement possibles. Le marqueur bactérien HF183, marqueur *Bacteroidales* associé à l'Homme, a donc été (i) sélectionné dans la littérature (Bernhard & Field, 2000), (ii) évalué sur la collection de fèces LPL établie entre 2017 et 2018 dans le cadre du projet, (iii) puis validé selon la norme.

Le Pays Basque, première zone d'étude, du projet est une terre de pastoralisme. Les marqueurs agricoles sont donc essentiels à exploiter. Selon la même méthodologie de développement, les marqueurs ruminant et porcine bactériens, Rum2Bac et Pig2Bac, ont été adoptés à partir des marqueurs précédemment développés à Ifremer au LSEM (Mieszkin et al., 2009, 2010). Ces marqueurs ont été également validés au niveau international (Ebentier et al., 2013 ; Raith et al., 2013 ; Zhang et al., 2020). Comme évoqué précédemment ; les marqueurs *Bacteroidales* associés aux ruminants ne distinguant pas les bovins des ovins, pour affiner l'identification des ruminants, des marqueurs mitochondriaux ont été développés par LPL, ce qui a nécessité des designs *in silico* et des tests sur collection de fèces. L'ADN mitochondrial étant spécifique à une espèce, il est ainsi possible de déterminer une origine de contamination bovine, avec le marqueur Cowhill, ou ovine, marqueur Ovis. Sur le principe de cette double identification marqueur bactérien / marqueur mitochondrial, qui constituent une innovation vis-à-vis des marqueurs déjà publiés dans les revues scientifiques, les sources Canine (DogACH et Dogmt) et Equine (Hof2ACH et Horsem) ont été développées dans ce projet. En effet, concernant le chien, il existe effectivement des marqueurs bactériens publiés qui font référence en matière de *Microbial Source Tracking*. Néanmoins, le marqueur chien BacCan-UCD publié par Kildare et al. en 2007 fait débat dans de nombreuses publications plus récentes. Ce marqueur a été testé au LPL dans le passé et ne satisfaisait pas les critères de spécificité et de sensibilité requis pour être utilisé en analyse. Un des objectifs a donc été de retravailler sur les séquences ADN de ce marqueur publié afin de développer un nouveau marqueur bactérien (*Bacteroidales*) pour le chien fonctionnel dans notre région. Ce marqueur bactérien a également été couplé avec un marqueur mitochondrial spécifique du chien, déjà publié (Tambalo et al., 2012). Concernant le cheval, un des seuls marqueurs bactériens (*Bacteroidales*) publié est le marqueur HOF597 (Dick et al., 2005). Ce marqueur, décrit comme très satisfaisant dans la littérature, possède cependant l'inconvénient d'utiliser la technique de PCR point final, technique plus longue et plus coûteuse que la technique de PCR en temps réel et qui ne permet pas de quantification. De même que pour le chien, LPL a donc également travaillé sur l'adaptation du marqueur HOF597 à la PCR en temps réel. Un marqueur mitochondrial cheval issu de la publication de Schill et Mathes en 2008, a été couplé à ce marqueur (cheval mt). Ce dernier n'a cependant pas été retenu dans la trousse finale BacTrac car trop peu sensible.

Le dernier paramètre agricole à prendre en compte est la volaille pour laquelle il faut aussi considérer le mode d'élevage. Si le Pays Basque et le Sud-Ouest pratique majoritairement l'élevage de plein air, d'autres régions comme la Bretagne appliquent principalement des pratiques hors sol. Dans le premier cas, le marqueur adéquat semble être le marqueur AV43 (Ohad et al., 2016), ciblant les *Firmicutes*, bactéries présentes dans les fientes de volaille, alors que le marqueur LA35, ciblant *Brevibacterium* (Weidhaas & Lipscomb., 2013), est retrouvé dans les litières de volailles (mélange de fientes et de paille).

La deuxième zone d'étude du projet est le bassin d'Arcachon avec une avifaune particulièrement riche qu'il convient de prendre en compte dans les sources potentielles de contamination. La première approche est donc de cibler les oiseaux en général. Pour cela, deux marqueurs aviaires ont été sélectionnés dans la littérature : GFD et AV4143. Les deux marqueurs ciblent des bactéries différentes, *Helicobacter* pour GFD (Green et al., 2012) alors que AV4143 cible l'ensemble du phylum des Firmicutes (Ohad et al., 2016). Bien que ces deux marqueurs ne ciblent pas les mêmes bactéries, ils demeurent complémentaires, avec une sensibilité équivalente de 67,4% et 73,6% respectivement sur les collections de fèces de l'IFREMER et des LPL. On note cependant des concentrations supérieures en AV4143, en adéquation avec le choix d'une cible bactérienne plus large. Les oiseaux marins les plus retrouvés en zone côtière, sur le Bassin d'Arcachon comme au Pays Basque, restent les Laridés (mouette et goéland). Les marqueurs Gull2 (Lu et al, 2008) et Gull4 (Ryu et al, 2012) permettent de détecter *Catellibacterium marimammalium*, une bactérie spécifique des goélands et présente également chez d'autres espèces d'oiseaux de bord de mer. Seul Gull2 a été inclus dans la trousse Bactrac. Enfin, pour se rapprocher davantage de la problématique du Bassin d'Arcachon, des marqueurs plus spécifiques ont été développés par LPL. Oiemt et Olormt sont deux marqueurs mitochondriaux ciblant respectivement les oies sauvages et les cygnes.

## 5.2 Validation des marqueurs selon la norme NF-47-600

Valider des marqueurs PCR selon la norme NF-47-600 permet de caractériser l'outil analytique. La validation permet d'évaluer et de définir plusieurs paramètres tels que la sensibilité et la spécificité, la limite de détection et de quantification du système PCR ainsi que les critères d'efficacité et de linéarité de ce système. Chacun des marqueurs BacTrac développés ou adoptés à partir de la littérature a donc été validé selon ce référentiel.

Certains marqueurs n'ont été testés qu'à LPL (tous les marqueurs mitochondriaux, les marqueurs bactériens équin et canin). D'autres marqueurs ont été évalués aux LPL et au LSEM, à Ifremer, sur la collection de fèces et d'effluents propre à chaque laboratoire : HF183, Pig2Bac, Rum2Bac, GFD, AV4143, AV43, Gull2. Enfin le marqueur Gull4 n'a été évalué qu'à Ifremer sur la collection de fèces. Les résultats obtenus pour les marqueurs bactériens aviaires sont détaillés dans la section 5.3.

Pour les marqueurs bactériens associés à l'Homme HF183, aux ruminants Rum2Bac et aux porcs Pig2Bac, des sensibilités (présence du marqueur MST dans des échantillons de fèces cible) respectivement de 76,5% (n=34), 93,4% (n=91), et 100% (n=49 incluant 5 sangliers) ont été obtenues à LPL et de 78 % (n = 41), 98 % (n=40) et 100 % (n=48) à Ifremer (Mauffret et al., 2012).

Pour les marqueurs bactériens associés à l'Homme, aux ruminants et aux porcs, des spécificités (absence du marqueur MST dans des échantillons de fèces non-cible) de 88,9% (n=523), 96,3% (n=466), et 100% (n=508) ont été obtenues à LPL et de 99 % (n=98), 94 % (n=97) et 99% (n=91) à Ifremer (Mauffret et al., 2012).

Les limites de quantification obtenues aux LPL sont indiquées dans le Tableau 1 et celles obtenues à Ifremer, lors de cette présente étude, sont respectivement pour les marqueurs HF183, Rum2Bac et Pig2Bac de 5, 10, 5 copies de gène/PCR.

Notons que des sensibilités et spécificités supérieures à 80 % sont comme nécessaires pour qu'un marqueur soit considéré suffisamment sensible et spécifique (Boehm et al., 2013).

Les marqueurs retenus constituant la trousse BacTrac sont répertoriés dans le Tableau 1.

**Tableau 1. Récapitulatif des marqueurs PCR constituant la trousse BacTrac.**

Nom du marqueur	Source de contamination	Type d'ADN cible	Bactérie ou cellule cible (référence bibliographique)	Limite de quantification (nombre de copies/PCR)
Hf183 	Humain	Bactérien	<i>Bacteroidales</i> (Bernhard et Field. 2000)	10
AV4143 	Oiseau général	Bactérien	<i>Lactobacillus</i> (Ohad et al 2016)	100
Gull2 	Laridés	Bactérien	<i>Catellibacoccus marimammalius</i> (Lu et al. 2008)	100
AV43 	Volailles	Bactérien	Firmicutes (Ohad et al 2016)	100
Rum2Bac 	Ruminants	Bactérien	<i>Bacteroidales</i> (Mieszkin et al 2010)	100
Ovismt 	Ovin	Mitochondrial	Cellule eucaryote (LPL-BacTrac)	1000
Cowhillmt 	Bovin	Mitochondrial	Cellule eucaryote (LPL-BacTrac)	100
Pig2Bac 	Porcin	Bactérien	<i>Bacteroidales</i> (Mieszkin et al 2009)	100
DogACH 	Chien	Bactérien	<i>Bacteroidales</i> (LPL-BacTrac)	100
Dogmt 	Chien	Mitochondrial	Cellule eucaryote (LPL-BacTrac)	100
Hof2ACH 	Cheval	Bactérien	<i>Bacteroidales</i> (LPL-BacTrac)	100
Oiemt 	Oie bernache	Mitochondrial	Cellule eucaryote (LPL-BacTrac)	100

Nom du marqueur	Source de contamination	Type d'ADN cible	Bactérie ou cellule cible (référence bibliographique)	Limite de quantification (nombre de copies/PCR)
Olormt 	Cygne	Mitochondrial	Cellule eucaryote (LPL-BacTrac)	100

### 5.3 Focus sur les marqueurs aviaires

Afin de constituer la trousse BacTrac et de l'appliquer sur les bassins versants, 5 marqueurs bactériens qPCR aviaires avaient été tout d'abord sélectionnés dans la littérature (GFD, AV43, AV4143, Gull2/Gull4, LA35). L'efficacité de ces marqueurs a été évaluée au LSEM et aux LPL sur une collection d'extraits d'ADN d'échantillons fécaux majoritairement prélevés en Bretagne pour le LSEM et en Nouvelle Aquitaine pour les LPL (Gourmelon et al., 2019). Une étude comparative du comportement de ces marqueurs, dans chaque laboratoire, impliquant des procédures et des protocoles différents a été réalisée afin d'en évaluer la robustesse et l'applicabilité géographique.

Au LSEM, les marqueurs Général Oiseaux (GFD et AV4143 ; *Helicobacter*, Green et al., 2012 et *Lactobacillus*, Ohad et al., 2016) ont été testés. Ils ont été mis en évidence dans la moitié des échantillons aviaires de la collection (n=144 ; échantillons provenant principalement de Bretagne ; 52,8% des échantillons positifs pour GFD et 46,6 % pour AV4143, Tableau 2). Le marqueur GFD est présent plus fréquemment que le marqueur AV4143 dans les fèces d'oiseaux sauvages (52% vs 23 % tandis que le marqueur AV4143 est plus fréquemment retrouvés dans les fèces et litières de volaille (82,5 % vs 54,4 %). La recherche simultanée de ces deux marqueurs permet de mettre en évidence une origine aviaire dans 68,1 % de ces échantillons. Ces deux marqueurs n'ont pas été détectés ou seulement dans un très faible nombre d'échantillons non aviaires démontrant une spécificité élevée (de 100 % pour AV4143 à 96,4 % pour GFD, Tableau 2). On peut toutefois noter que deux échantillons de fèces de porcs sur 16 analysés étaient positifs avec ce dernier marqueur.

Les marqueurs Volaille AV43 et Litière de Volaille LA35 (respectivement, Firmicutes ; Ohad et al., 2016 *Brevibacterium*, Weidhaas and Lipscomb, 2013) montrent, quant à eux, (1) une présence élevée du marqueur LA35 dans les litières et fumiers de volaille (87,1 % d'échantillons positifs) et une faible présence dans les fèces de volaille (29,6 %), et (2) une présence plus faible du marqueur AV43 dans les litières de volaille (61,3 %) mais plus fréquente dans les fèces de volaille (77,8 %). Comme pour les marqueurs General Oiseaux, ces marqueurs présentent une spécificité élevée : > 99 % (quand testés sur des échantillons non cibles incluant les fientes d'oiseaux autre que la volaille).

Enfin, le marqueur Gull4, sélectionné parmi les trois marqueurs Laridés (Gull2 SybrGreen, Gull2 TaqMan et Gull4 ; *Catelliboccus marimammalium* ; Lu et al., 2008, Sinigaliano et al., 2010 et Ryu et al., 2012) testés au LSEM, présente une sensibilité de 81,8 % (n=11) sur les fientes de goéland et une spécificité élevée sur les échantillons non aviaires (100 % ; n = 55). Toutefois, le marqueur Gull4 est également présent dans d'autres fientes d'oiseaux sauvages [tels que les cormorans (70%) les bécasseaux, courlis et huitriers pie (50%), les canards (66,7%) ; soient 45 % des oiseaux sauvages étudiés) ; il a été également mis en évidence dans trois fientes de poules et canards domestiques.

Tableau 2. Présence des cinq marqueurs aviaires sélectionnés dans des fèces et effluents d'origine aviaire et non aviaire. Analyses réalisées au LSEM.

Source fécale	Total (Nb)	GFD (%)	AV4143 (%)	AV43 (%)	LA35 (%)	Gull4 (%)	GFD ou AV4143 (%)	Total*
Tadorne de Belon	10	3 (30)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	1 (10)	3 (30)	3 (30)
Bécasseau	10	5 (50)	1 (10)	0 (0)	0 (0)	5 (50)	5 (50)	5 (50)
Bernache	10	8 (80)	6 (60)	1 (10)	0 (0)	1 (10)	8 (80)	8 (80)
Canards	9	9 (100)	3 (33)	0 (0)	0 (0)	6 (66,7)	9 (100)	9 (100)
Cormoran	10	7 (70)	3 (30)	0 (0)	0 (0)	7 (70)	7 (70)	7 (70)
Courlis cendré	10	2 (20)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	5 (50)	2 (20)	2 (20)
Cygne	6	4 (67)	3 (50)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	4 (67)	4 (67)
Goéland & mouette	11	2(18)	4 (36)	0 (0)	0 (0)	9 (81,8)	5 (45)	5 (45,4)
Huitrier Pie	10	5 (50)	0 (10)	0 (0)	0 (0)	5 (50)	5 (50)	5 (50)
<b>Total Oiseaux sauvages</b>	<b>86</b>	<b>45 (52)</b>	<b>20 (23)</b>	<b>1 (5,9)</b>	<b>0 (0)</b>	<b>39 (45)</b>	<b>48 (56)</b>	<b>48 (55,8)</b>
Pintade	10	6 (60)	10 (100)	10 (100)	6 (60)	0 (0)	10 (100)	10 (100)
Poules et Canards	17	11 (64,7)	16 (94,1)	11 (64,7)	2 (11,8)	3 (18)	17 (100)	17 (100)
Litières & fumiers Volaille	31	14 (45,1)	21 (67,7)	19 (61,3)	27 (87,1)	0 (0)	23 (74,2)	30 (96,8)
<b>Total fèces Volaille**</b>	<b>27</b>	<b>17 (63,0)</b>	<b>26 (96,3)</b>	<b>21 (77,8)</b>	<b>8 (29,7)</b>	<b>3 (11,1)</b>	<b>27 (100)</b>	<b>27 (100)</b>
<b>Total fèces &amp; litières Volaille</b>	<b>58</b>	<b>31 (54,4)</b>	<b>47 (82,5)</b>	<b>40 (70,2)</b>	<b>35 (60,3)</b>	<b>6 (10,3)</b>	<b>50 (86,2)</b>	<b>57 (98,3)</b>
<b>Total Oiseaux</b>	<b>144</b>	<b>76 (52,8)</b>	<b>67 (46,5)</b>	<b>41 (28,5)</b>	<b>35 (24,3)</b>	<b>42 (29,2)</b>	<b>98 (68,1)</b>	<b>105 (72,9)</b>
Cheval	9	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
Bovin	13	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
Porc	16	2 (12,5)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	2 (12,5)	2 (12,5)
Selles humaines & effluents de station d'épuration	17	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
<b>Total sources non aviaires</b>	<b>55</b>	<b>2</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>2</b>	<b>0</b>
<b>Spécificité</b>		<b>53 (96,4)</b>	<b>55 (100)</b>	<b>55 (100)</b>	<b>55 (100)</b>	<b>55 (100)</b>	<b>53 (96,4)</b>	<b>53 (96,4)</b>

\* Total : nombre d'échantillons positifs pour au moins un marqueur aviaire testé (%)

\*\* Volaille : pintades, canards domestiques, poules et dindes

En parallèle, LPL a évalué plusieurs marqueurs aviaires (marqueurs General Oiseau, GFD et AV4143, marqueur Volaille AV43 et marqueur Laridés Gull2) sur sa collection d'échantillons de fèces cibles et non cibles. Le marqueur Litière de Volaille (LA35) n'a été quantifié que dans une seule fiente de pintade sur 107 fientes de volaille (0,9 %). Dans les conditions opératoires utilisées, il n'est donc pas adapté sur la collection de Nouvelle Aquitaine testée. Les marqueurs GFD et AV4143 ont été mis en évidence respectivement dans 26,4 % et 52,7 % des 201 échantillons aviaires testés. La recherche simultanée de ces deux marqueurs permet de mettre en évidence une origine aviaire dans 73,6 % de ces échantillons. Le marqueur AV4143 est présent plus fréquemment que le marqueur GFD, à la fois, dans les fèces d'oiseaux sauvages (42,4 % vs 17,4 %) que dans les fèces de volaille (62,6 % vs 34,6 %). Ces deux marqueurs n'ont pas été détectés dans les échantillons non aviaires démontrant une spécificité élevée (100 % ; Tableau 3). Le marqueur Volaille AV43 présente une spécificité de 56,1 % si l'appellation Volaille inclut les pintades, les canards domestiques, les poules, les dindons et oies domestiques (n = 107) et de 66,7 % si on n'y inclut pas les oies domestiques (n=90). Comme pour les marqueurs General Oiseaux, ce marqueur présente une spécificité élevée : > 95 % (quand testés sur des échantillons non cibles incluant les fientes d'oiseaux autre que la volaille). On peut toutefois noter que 25,6 % d'échantillons de fèces de chiens (n=39) étaient positifs avec ce marqueur. Enfin, le marqueur Gull2 présente une sensibilité et une spécificité élevées respectivement sur les fientes de goéland (100 % ; n=21) et les échantillons non aviaires (100 % ; n = 253).

Tableau 3. Présence des cinq marqueurs aviaires sélectionnés dans des fèces d'origine aviaire et non aviaire. Analyses réalisées aux LPL.

Source fécale	Total	GFD (%)	AV4143 (%)	AV43 (%)	LA35 (%)	Gull2 (%)	GFD ou AV4143 (%)	Total*
Bernache	30	5 (16,7)	22 (73,3)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	23 (76,7)	23(76,7)
Canards Colvert & Sarcelle	3	1 (33,3)	3 (100)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	3 (100)	3 (100)
Goélands & mouettes	21	8 (38,1)	11(52,4)	0 (0)	0 (0)	21 (100)	13 (61,9)	21 (100)
Perdrix rousse	1	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
Rapaces	21	1 (4,8)	3 (14,3)	1 (4,8)	0 (0)	1 (4,8)	4 (19,1)	6 (28,6)
Pies & Merles	4	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
Tourterelles, pigeons, palombe	12	2 (16,7)	1 (8,3)	3 (25,0)	0 (0)	0 (0)	1 (8,3)	4 (33,3)
<b>Total Oiseaux sauvages</b>	<b>92</b>	<b>16 (17,4)</b>	<b>39 (42,4)</b>	<b>4 (4,3)</b>	<b>0 (0)</b>	<b>22 (23,9)</b>	<b>43 (46,7)</b>	<b>57 (62,0)</b>
Pintades	22	3 (13,6)	22 (100)	19 (86,4)	1 (4,5)	0 (0)	22 (100)	22 (100)
Canards	31	15 (48,4)	10 (32,3)	18 (58,1)	0 (0)	0 (0)	20 (64,1)	26 (83,9)
Poules	35	14 (40)	18 (51,4)	23 (65,7)	0 (0)	1 (2,8)	27 (77,1)	32 (91,4)
Dindon	2	0 (0)	1 (50)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	1 (50)	1 (50)
Oies domestiques	17	5 (29,4)	16 (94,1)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	17 (100)	17 (100)
Cygne	1	0 (0)	1 (100)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	1 (100)	1 (100)
Pigeon	1	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
<b>Total fèces de Volaille**</b>	<b>107</b>	<b>37 (34,6)</b>	<b>67 (62,6)</b>	<b>60 (56,1)</b>	<b>1 (0,9)</b>	<b>1 (0,9)</b>	<b>88 (82,2)</b>	<b>98 (91,6)</b>
<b>Total Oiseaux</b>	<b>201</b>	<b>53 (26,4)</b>	<b>106 (52,7)</b>	<b>64 (31,8)</b>	<b>1 (0,5)</b>	<b>23 (11,4)</b>	<b>131 (65,2)</b>	<b>155 (77,1)</b>
Selles humaines	34	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
Bovins	32	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
Chiens	39	1 (2,5)	0 (0)	10 (25,6)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	10 (25,6)
Chevaux	42	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
Ovins	35	2 (5,7)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	2 (5,7)	2 (5,7)
Porcs	44	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
Chèvres	14	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
Chevreaux & biches & cerfs	8	0 (0)	0 (0)	1 (12,5)	0 (0)	0 (0)	1 (12,5)	1 (12,5)
Sangliers	5	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
Chats	22	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
<b>Total sources non aviaires</b>	<b>275</b>	<b>3</b>	<b>0</b>	<b>11</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>3</b>	<b>13</b>
<b>Spécificité</b>		<b>272 (98,9)</b>	<b>275 (100)</b>	<b>264 (92,4)</b>	<b>253 (100)</b>	<b>275 (100)</b>	<b>272 (98,9)</b>	<b>242 (95,3)</b>

\* Nombre d'échantillons positifs avec au moins un des marqueurs aviaires testés

\*\*Volaille : pintades, canards domestiques, poules, dindons, oies domestiques

La comparaison de ces marqueurs sur ces deux collections montre que l'utilisation conjointe des deux marqueurs Général Oiseaux GFD et AV4143 permet d'identifier la source aviaire dans plus de 65 % des échantillons aviaires testés avec une grande spécificité. Le seuil de 80 % de sensibilité recommandé n'est toutefois pas atteint (Boehm et al., 2013). Le marqueur GFD est très utilisé au niveau international et les études publiées montrent des pourcentages de sensibilité équivalente (de 30 % à 58 % aux Etats-Unis et en Australie ; Green et al., 2012 ; Ahmed et al., 2016). Peu d'études ont porté sur le marqueur AV4143 plus récemment décrit (Ohad et al., 2016). Ces deux marqueurs GFD et AV4143 ont toutefois été testés dans une étude récente en Chine (Vadde et al., 2019). Une plus forte sensibilité du marqueur AV4143 (100 %) que du marqueur GFD (70 %) et des concentrations environ 100 fois plus importantes avec AV4143 ont été obtenues sur des fientes de volaille (n=10). Ces deux marqueurs se sont avérés spécifiques dans cette étude : GFD, 92,5 % de spécificité et AV4143, 95 %.

Dans les conditions d'utilisation du marqueur GFD (utilisation du kit Promega à LPL vs utilisation du kit Invitrogen à Ifremer ; collections d'échantillons différentes), ce marqueur présente une plus faible sensibilité sur les fientes d'oiseaux sauvages et sur les fientes d'oiseaux domestiques, aussi bien aux LPL qu'à Ifremer (26,4 % vs 52,8 %).

Le marqueur AV4143 (utilisation du kit Promega à LPL vs utilisation du kit Applied Biosystem Universal mix pour Ifremer) présente une plus forte sensibilité sur les fientes d'oiseaux sauvages aux LPL qu'à Ifremer (42,4 % vs 23 %). Ce marqueur est plus fréquemment isolé dans les fientes d'oiseaux aux LPL que le marqueur GFD (52,7 % vs 26,4 %) tandis qu'à Ifremer, les deux marqueurs ont des sensibilités proches (52,8 % pour GFD et 46,5 % pour AV4143).

Le marqueur AV43 n'est présent que dans un faible pourcentage d'échantillons d'oiseaux sauvages (4,3% aux LPL et 5,9 % à Ifremer) et est présent plus fréquemment dans les échantillons fécaux d'oiseaux domestiques (56,1 % et 70,2 %). Le marqueur Général Oiseau AV4143 est toutefois présent plus fréquemment dans les échantillons d'oiseaux domestiques (62,6 % et 82,5 %) que le marqueur AV43.

Les différences de résultats de sensibilité des marqueurs entre les analyses réalisées au LSEM et à LPL peuvent s'expliquer par la composition des collections de fèces (régions et espèces aviaires différentes) et également des protocoles d'utilisation des marqueurs (utilisation de kits commerciaux différents).

Pour apporter des éléments explicatifs, une sélection de 185 extraits d'ADN d'oiseaux des deux collections a été testée par les protocoles de qPCR appliqués à Ifremer et ceux appliqués aux LPL. Ainsi, 93 extraits d'ADN d'oiseau d'Ifremer et 92 extraits d'ADN de LPL ont été testés par l'ensemble des marqueurs respectivement à LPL et à Ifremer. Ces extraits d'ADN proviennent principalement de fèces d'oiseaux de bord de mer, de canards, de rapaces, de cygnes et pintades.

**Tableau 4 : Comparaison des résultats acquis à Ifremer et aux LPL sur 185 extraits d'ADN d'oiseaux (incluant les données détectées mais non quantifiées). < LQ (IFR/LPL) : résultats négatifs dans les deux laboratoires. > LQ (IFR/LPL) : résultats positifs dans les deux laboratoires. Premier tableau, données exprimées en valeurs et deuxième tableau, données exprimées en pourcentage.**

Marqueurs	< LQ (IFR/LPL)	> LQ (IFR/LPL)	Même résultat (IFR/LPL)	Résultats différents	Total
GFD	96	40	136	49	185
AV4143	97	39	136	49	185
AV43	168	14	182	3	185
LA35	180	0	180	5	185
Gull2/Gull4	125	47	172	13	185
Marqueurs	< LQ (IFR/LPL)	> LQ (IFR/LPL)	Même résultat (IFR/LPL)	Résultats différents	Total
GFD	51,89	21,62	73,51	26,49	100,00
AV4143	52,43	21,08	73,51	26,49	100,00
AV43	90,81	7,57	98,38	1,62	100,00
LA35	97,30	0,00	97,30	2,70	100,00
Gull2/Gull4	67,57	25,41	92,97	7,03	100,00

Les résultats montrent des résultats similaires entre les deux laboratoires :

- Pour 97,3 % des échantillons pour le marqueur LA35. Il faut toutefois préciser que ce marqueur n'a pas donné de résultats quantifiables aux LPL et seulement 5 résultats positifs (fèces de pintade) à Ifremer.
- Pour 98,4% des échantillons pour le marqueur AV43.
- Pour 93 % des échantillons pour les marqueurs Laridés (Gull2/Gull4 ; Tableau 4).

Pour les marqueurs Général Oiseaux, un plus faible pourcentage de résultats similaires a été observé (73,5 % pour les deux marqueurs). Le marqueur GFD a été quantifié dans 42 échantillons à LPL versus 87 à Ifremer tandis que le marqueur AV4143 a été quantifié dans 88 échantillons à LPL versus 39 à Ifremer.

Dans les échantillons obtenus positifs dans les deux laboratoires, les concentrations en marqueur AV4143 sont environ 100 fois plus importantes que celles retrouvées à Ifremer tandis que les concentrations en marqueur GFD sont assez proches (généralement différences inférieures à un facteur 10). Les concentrations en marqueurs AV43 et Gull sont généralement supérieures d'un facteur 10 à LPL.

Ces résultats suggèrent que les marqueurs LA35, AV43 et Gull2/Gull4 donnent des résultats similaires même si les protocoles ne sont pas identiques. Concernant les marqueurs Général Oiseaux, GFD et AV4143, il semble préférable d'appliquer le protocole utilisé à Ifremer pour rechercher le marqueur GFD (utilisation du kit Invitrogen) et le protocole utilisé aux LPL pour le marqueur AV4143 (utilisation du kit Promega).

## 5.4 Metabarcoding : Protocole d'analyse des données de séquençage des échantillons fécaux

### 5.4.1 L'approche de metabarcoding pour la recherche de nouveaux marqueurs

Pour compléter le panel de marqueurs aviaires et obtenir des marqueurs plus sensibles que les marqueurs précédemment décrits (seuil de 80 % de sensibilité à atteindre), des séquences d'ADN bactérien, spécifiques d'un hôte donné, ont été recherchées à partir d'extractions d'ADN totaux d'échantillons fécaux par séquençage haut débit Illumina (metabarcoding) ciblant les régions hypervariables V3-V4 du gène codant l'ARNr 16S.

Cette approche permet également de décrire la diversité des communautés bactériennes présentes dans les différentes fientes d'oiseaux analysées (comprenant des bactéries cultivables et non cultivables, viables et mortes) et de les comparer aux communautés présentes dans d'autres sources tels que les fèces des animaux d'élevage et les effluents de station d'épuration.

A partir d'une sélection de plus de 500 fientes d'oiseaux appartenant à 38 espèces différentes, 349 échantillons d'ADN de fientes d'oiseaux de bord de mer et d'oiseaux d'élevage (229 lors du premier run de séquençage, mai 2017 et 130 lors du deuxième run, novembre 2017) ont été analysés. De plus, un total de 106 échantillons supplémentaires d'origine non aviaire a été également analysé (run 2) : principalement, effluents de station d'épuration, échantillons de fèces et de fumiers de bovins, échantillons de fèces et de lisiers et fumiers de porcs, échantillons de fèces de pouques.

Les ADN totaux ont été extraits avec le kit Fast DNA for Soil (BioMedical). A partir des ADN extraits, les régions variables V3-V4 du gène codant l'ARNr 16S ont été amplifiés par PCR avec les amorces 343F et 784R couplées aux  $\frac{1}{2}$  adaptateurs Illumina (Tableau 5) et séquencés en 2x250 paires de bases (pb) avec un séquenceur Illumina MiSeq (chimie V3 ; plateforme Genotool de Toulouse). La longueur de l'amplicon attendue est de 460 pb.

**Tableau 5 : Séquences des amorces utilisées pour les analyses de metabarcoding ciblant les régions variables V3-V4 du gène codant l'ARNr 16S. Les nucléotides en italique (coté 5') représentent les  $\frac{1}{2}$  adaptateurs Illumina, et les nucléotides restants (coté 3') représentent les amorces ciblant le V3-V4 de l'ARNr 16S.**

Amorces	Séquences	Taille	Références
343F	5'- <i>CTT-TCC-CTA-CAC-GAC-GCT-CTT-CCG-ATC-TAC-GGR-</i> AGG-CAG-CAG-3'	460 pb	Liu et al, 2007
784R	5'- <i>GGA-GTT-CAG-ACG-TGT-GCT-CTT-CCG-ATC-TTA-CCA-</i> GGG-TAT-CTA-ATC-CT-3'		Andersson et al, 2008

Les données de séquençage ont été stockées sur le serveur DATAREF d'Ifremer. L'ensemble des analyses a été effectué à l'aide du calculateur DATARMOR hébergé au sein du pôle Calcul et de Données pour la Mer de l'Ifremer (PCDM).

Les données de séquençage obtenues ont été analysées par le workflow SAMBA v1.0.0 (Standardized and Automatized MetaBarcoding Analysis using DADA2 and QIIME2 ; <https://gitlab.ifremer.fr/bioinfo/SAMBA-nextflow>) développé par C. Noel et L. Quintric du service SebiMER à Ifremer.

Ce workflow comprend un contrôle de la qualité du séquençage, la préparation des séquences et les analyses bio-statistiques a permis de décrire et comparer les communautés bactériennes présentes dans les différents échantillons analysés. A la différence des outils utilisés jusqu'à présent et basés sur la description d'OTU (Operational Taxonomic Units), SAMBA permet de mettre en évidence des ASV (Amplicon Sequence Variants)<sup>1</sup> (Callahan & McMurdie, 2017). Les ASV sont l'équivalent des unités taxonomiques opérationnelles (OTUs) traditionnellement utilisées mais sont issus d'une méthode différente de clusterisation des séquences en taxon.

Le séquençage a permis d'obtenir un total de 8 079 901 "reads" (fragments de séquences) pour le run 1 (1 251 à 143 102 par échantillon) et de 14 364 871 "reads" (de 20 643 à 97 936 par échantillon) pour le second run. Après nettoyage des séquences, assemblage des séquences Sens et Antisens (R1 et R2), suppression des chimères (erreurs de séquençage et d'assemblage), on obtient 3 221 438 (44,7 %) « reads » validés pour le run 1 et 5 978 560 (47 %) pour le run 2. Un total de 27 297 ASV différents pour l'ensemble des deux séquençages (8 959 pour le run 1 et 21 644 pour le run 2) assignés à la taxonomie bactérienne (au genre et pour certains à l'espèce) est obtenu en utilisant la base de données SILVA. 132. 27 205 ASV sont assignés au niveau du phylum, 25 353 au niveau de la famille et 19 126 au niveau du genre.

Dix-sept principaux groupes d'échantillons fécaux sont analysés plus en détails dans le présent rapport. Ils sont constitués des échantillons provenant des oiseaux sauvages (goélands, mouettes, cormorans, bécasseaux, courlis, huîtriers pie, canards, cygnes, oies Bernache, Tadorne de Belon), des oiseaux domestiques (pintades, dindes et poules), des échantillons d'origine porcine, d'origine bovine et des effluents de station d'épuration.

#### 5.4.2 Profils d'abondances relatives

Les communautés bactériennes de l'ensemble des échantillons fécaux analysés au cours de cette étude sont composées de 34 phyla différents avec cinq phyla majoritaires : *Firmicutes* (8 791 ASV), *Proteobacteria* (7 957 ASV), *Bacteroidetes* (5 335 ASV), *Actinobacteria* (3 519 ASV) et *Fusobacteria* (234 ASV) (Figure 1).

Les abondances relatives au niveau des phyla au sein de 17 groupes d'échantillons comprenant des fèces d'oiseaux sauvages, d'oiseaux domestiques, d'animaux domestiques et d'animaux sauvages et des effluents de station d'épuration sont présentés sur la Figure 1. Les *Firmicutes*, les *Actinobacteria* et les *Proteobacteria* sont présents dans tous les groupes tandis que les *Fusobacteria* et les *Bacteroidetes* n'apparaissent que dans certains groupes ou en très faible proportion dans d'autres. Des

bactéries du phylum des *Fusobacteria* sont principalement présentes chez les tadornes et, en une plus faible proportion, chez les autres oiseaux sauvages tels que les cygnes, les canards, les goélands, les cormorans et chez les animaux sauvages tels que les phoques. Les bactéries du phylum *Bacteroidetes* sont principalement présentes chez les bovins et les porcs et également chez une partie des canards, des huîtres pie et des oies Bernache. Les profils d'abondance sont très hétérogènes au sein des différents groupes d'oiseaux sauvages (goélands, oies Bernache, ...) à l'exception du groupe des tadornes. A l'inverse, ces profils sont plus homogènes au sein des groupes des oiseaux d'élevage tels que les pintades et les dindes et au sein des sources non aviaires (Figure 1). Pour les oiseaux marins (groupes constitués des goélands, mouettes et cormorans ; Figure 1A) des similarités dans les profils d'abondance des mouettes et goélands sont observés avec la présence des phyla des *Actinobacteria*, *Firmicutes* et *Proteobacteria* et pour certains individus, également, celui des *Fusobacteria* tandis que pour les cormorans, une majorité de *Firmicutes* et, dans une moindre mesure, de *Proteobacteria* et de *Fusobacteria* sont observés. De plus, des *Bacteroidetes* sont retrouvés chez des goélands et des *Actinobacteria* chez les cormorans.

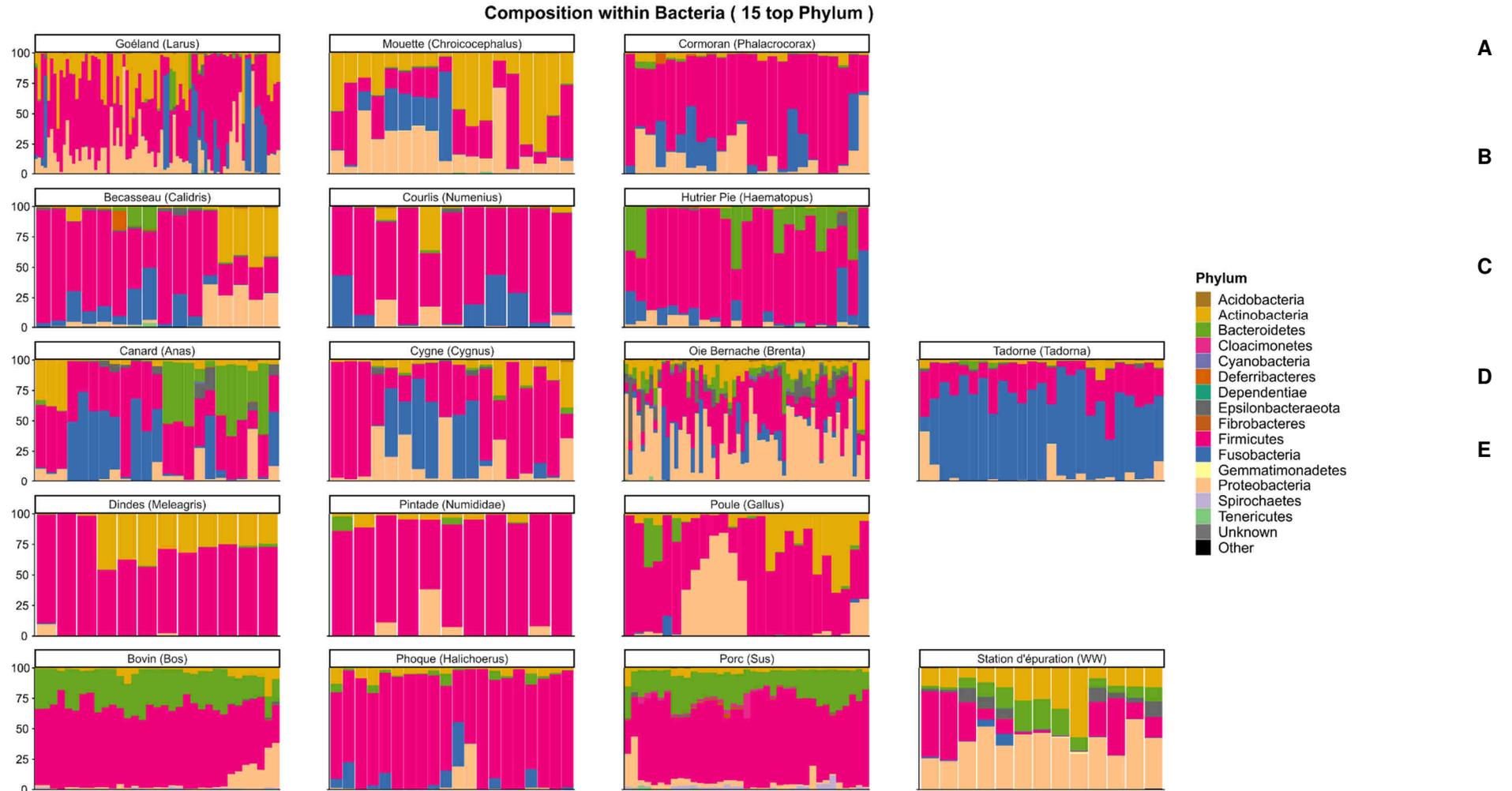
Chez les oiseaux de type échassier (bécasseaux, huîtres pie et courlis cendré ; Figure 1B), le phylum majoritaire est celui des *Firmicutes*. Des *Fusobacteria*, des *Proteobacteria* et des *Bacteroidetes* (principalement chez les huîtres pie) sont également retrouvés en plus faible proportion tandis que des *Actinobacteria* et des *Epsilonbacteraeota* sont présents plus rarement.

Concernant les anatidés (canards, oies Bernache, cygnes et tadornes ; Figure 1C), les phyla des *Firmicutes*, *Actinobacteria*, *Proteobacteria* et *Fusobacteria* sont retrouvés dans tous les groupes mais toutefois en proportion variable selon les groupes considérés. En effet, les *Fusobacteria* sont majoritaires chez les tadornes, les *Proteobacteria* chez les oies Bernache et les *Firmicutes* chez les canards et les cygnes.

Les échantillons fécaux des oiseaux domestiques (oiseaux de basse-cour) [Figure 1D], quant à eux, sont composés en majorité de *Firmicutes* et d'*Actinobacteria* avec également des *Proteobacteria* dans des échantillons de poules et quelques échantillons de pintades.

Pour les échantillons non aviaires [Figure 1E], les bovins et les porcins présentent des profils similaires avec une majorité de *Firmicutes* et de *Bacteroidetes* et, pour certains échantillons, également des *Actinobacteria* et des *Proteobacteria*. Les phoques, quant à eux, présentent également une majorité de *Firmicutes* et pour certains échantillons, des *Actinobacteria*, des *Fusobacteria* et/ou des *Proteobacteria*. Enfin, pour les effluents de stations d'épuration, des *Proteobacteria* et des *Actinobacteria* sont majoritairement retrouvés, avec la présence, en proportions plus variables, des *Firmicutes*, des *Bacteroidetes*, et des *Epsilonbacteraeota*

Figure 1 : Profils des abondances relatives des 15 principaux phyla présents dans les échantillons fécaux analysés. A : oiseaux marins ; B : oiseaux de type échassier ; C : anatidés ; D : oiseaux domestiques (oiseaux de basse-cour ; E : échantillons non aviaires).



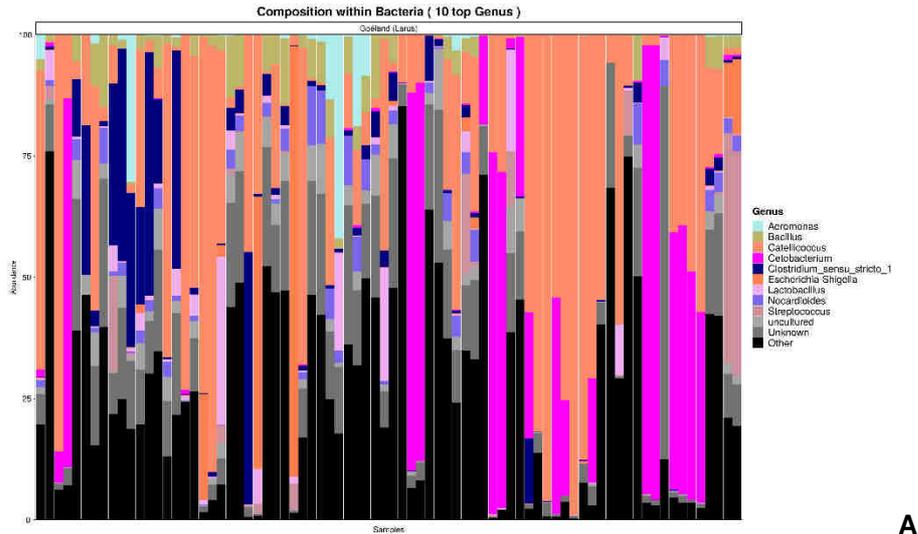
Si les profils d'abondance sont étudiés à un niveau taxonomique plus fin, soit au niveau du genre, une grande hétérogénéité des profils, encore plus marquée que ceux concernant les phyla, est observée pour les oiseaux sauvages, à l'exception des tadornes. Une plus grande homogénéité des profils au sein des groupes est généralement observée pour les oiseaux domestiques et les sources non aviaires (Figure 2 à Figure 4).

Ainsi, dans des proportions variables, des ASV appartenant au genre *Catellibacterium* (*Firmicutes*) et au genre *Cetobacterium* (*Fusobacteria*) ont été mises en évidence chez les oiseaux sauvages (Figure 2) pour les goélands, tadornes de Belon et Huîtrier Pie mais pas chez les oiseaux domestiques ou les sources non aviaires (Figure 3 et Figure 4).

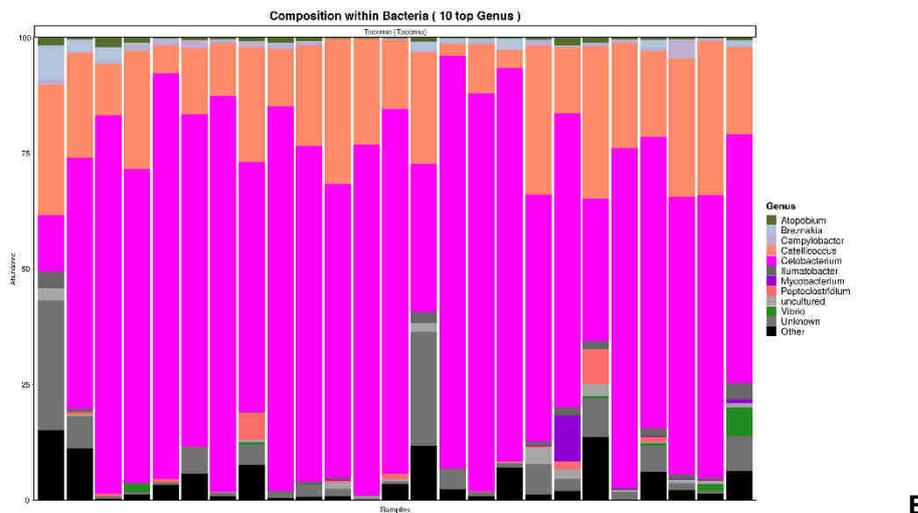
Des *Bacteroides* ont été également retrouvés chez les huîtriers pie, certains anatidés (canards) et certaines sources non aviaires (bovins et phoques).

Le genre *Romboutsia* (*Firmicutes*), quant à lui, est retrouvé chez certains anatidés (cygnes et oies Bernache), chez les oiseaux domestiques et dans les sources non aviaires (bovins, porcins et effluents de station d'épuration).

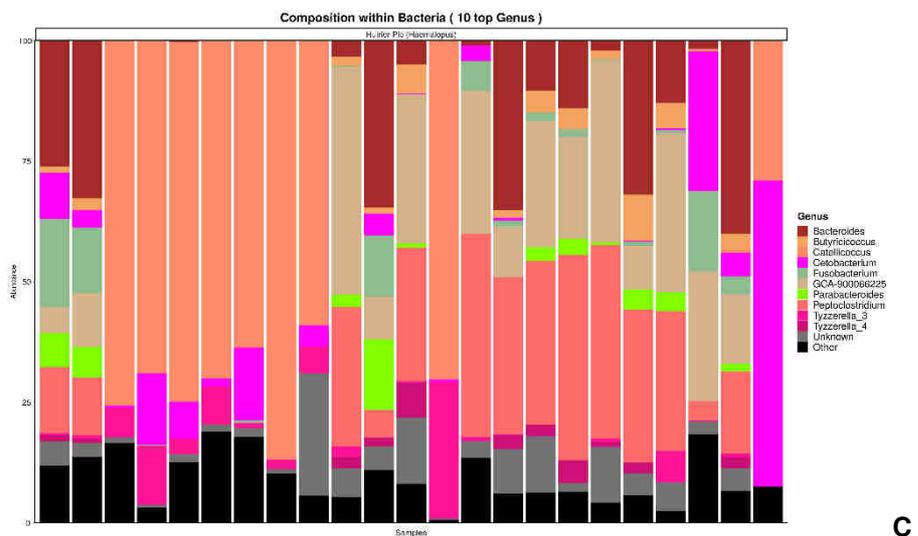
Le genre des *Lactobacillus* (*Firmicutes*) est retrouvé principalement chez les oiseaux domestiques (pintades, poules, dindes), certains porcs et certains anatidés (oies Bernache ; Figure 3 et Figure 4). Enfin, le genre des *Clostridium sensu stricto 1* (*Firmicutes*) est retrouvé principalement chez les cormorans, certains goélands, échantillons d'origine porcine et les phoques (Figure 2 et Figure 4).



A



B



C

Figure 2 : Profils des abondances relatives des 10 principaux genres présents dans les échantillons de fèces de goélands (A), de tadornes de Belon (B) et d'huitriers pie (C).

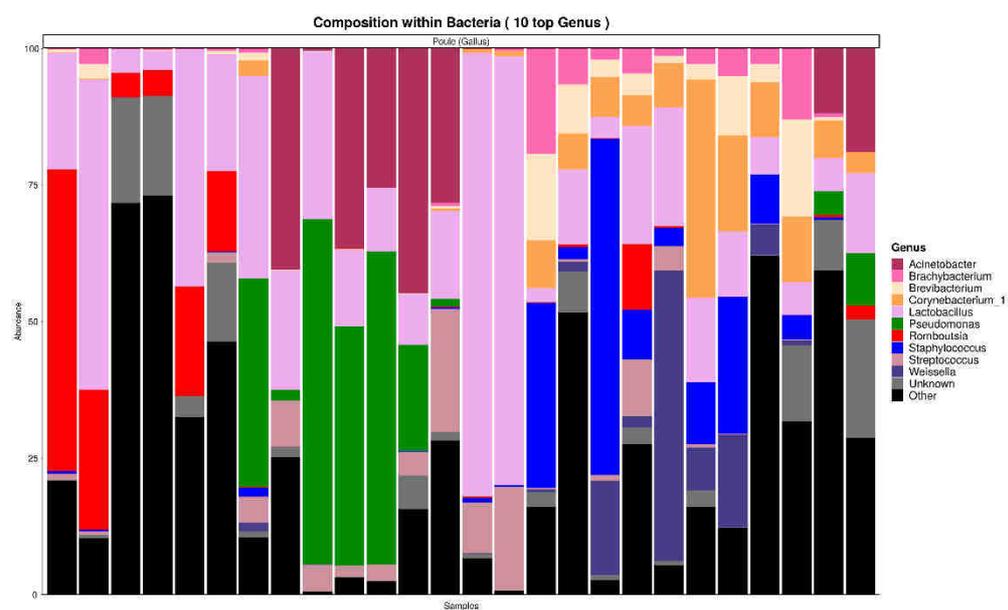


Figure 3. Profils des abondances relatives des 10 principaux genres présents dans les échantillons de poule.

Les échantillons de volaille se caractérisent par la présence majoritaire du genre *Lactobacillus* et dans une moindre mesure, des genres *Acinetobacter* ( $\gamma$ -proteobacteria), *Corynebacterium* (*Actinobacteria*), *Romboutsia* (*Firmicutes*), *Pseudomonas* ( $\gamma$ -proteobacteria) et *Staphylococcus* (*Firmicutes*) dans certains échantillons.

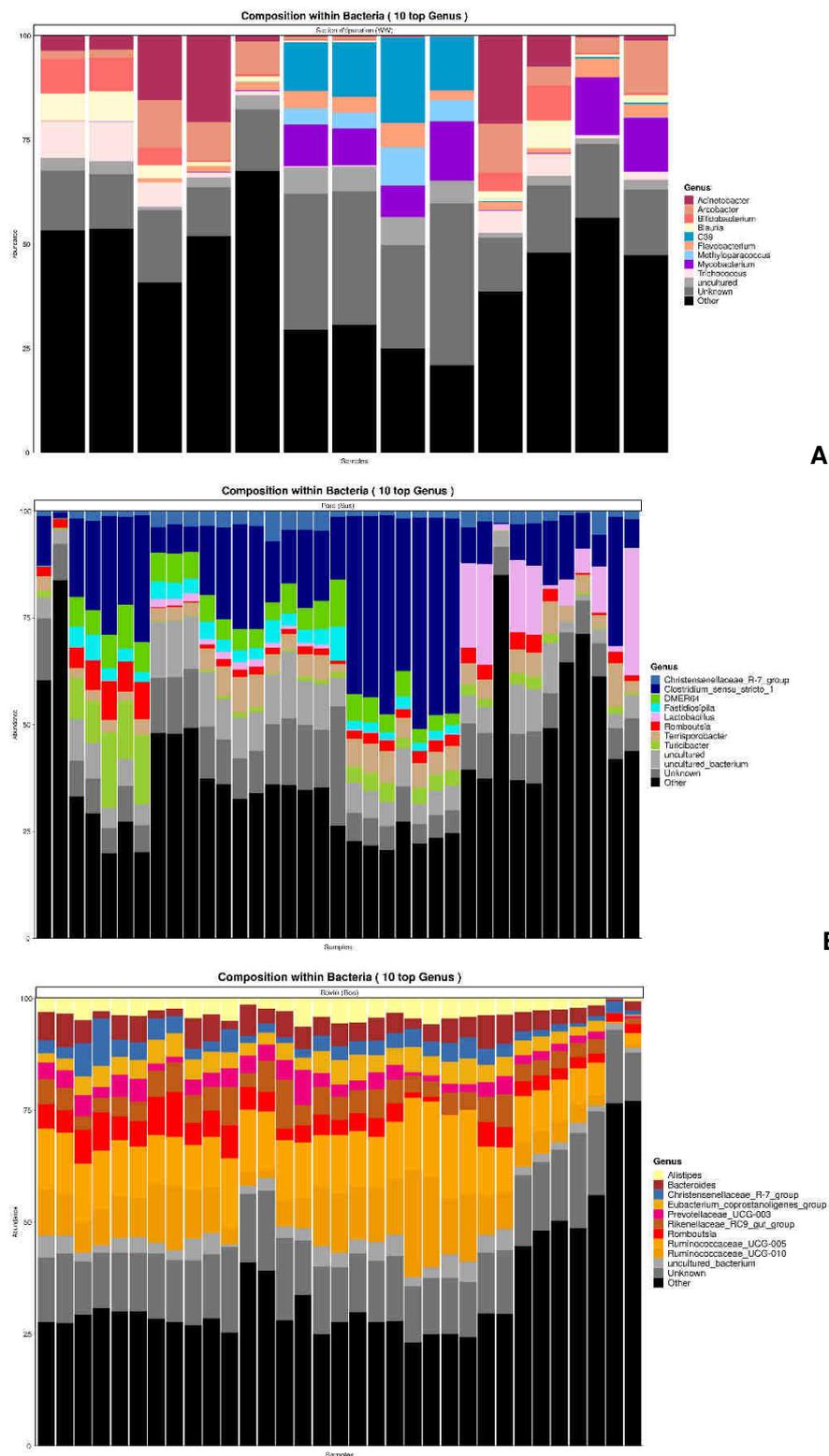


Figure 4 : Profils des abondances relatives des 10 principaux genres présents dans les échantillons d’effluents de station d’épuration, dans les échantillons d’origine porcine et dans les échantillons d’origine bovine

Concernant les sources non aviaires, les effluents de station d’épuration se caractérisent par la présence majoritaire des genres *Arcobacter* (*Epsilonbacteraeota*), *Mycobacterium* (*Actinobacteria*) et *Trichococcus* (*Firmicutes*), les échantillons d’origine bovine par la présence de *Ruminococcaceae* (*Firmicutes*), *Romboutsia*, *Bacteroides*, les échantillons d’origine porcine par la présence principalement

de *Clostridium sensu stricto 1* et dans une moindre mesure, *Lactobacillus*, *Romboutsia* et *Terrisporobacter* (*Firmicutes* ; Figure 4).

Si pour les tadornes et les huîtres pie, la sélection des 10 principaux genres représentent la majorité des genres présents, pour les goélands, les poules, les effluents de station d'épuration, les porcs et les bovins, d'autres genres sont également présents, montrant une plus grande diversité de ces échantillons (voir section suivante).

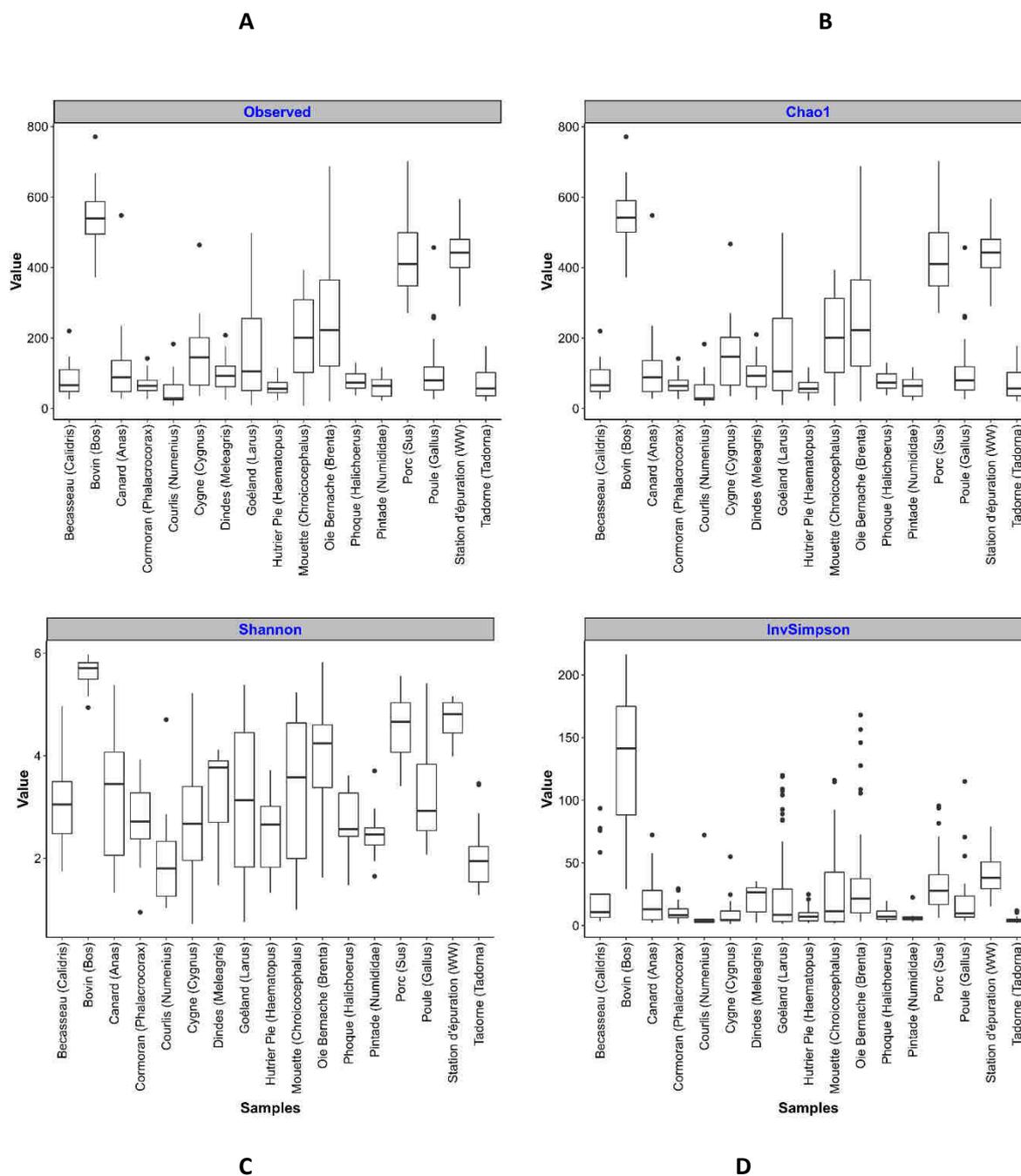
#### 5.4.3 Analyse de la diversité intra-spécifique ( $\alpha$ ) des communautés bactériennes

La diversité inter-échantillon au sein de chacun des 17 groupes a été étudiée en utilisant quatre indices différents (Figure 5).

La diversité évaluée par l'indice « Observed » (nombre d'ASV par échantillon) montre que les échantillons d'origines bovine et porcine et les échantillons d'effluents de station d'épuration possèdent les plus grands nombres d'ASV (par exemple, moyenne > 500 ASV par échantillon dans les échantillons d'origine bovine) tandis que les échantillons provenant des courlis, huîtres pie, tadornes et pintades présentent les plus faibles nombres (par exemple, moyenne < 50 ASV par échantillon dans les échantillons provenant des courlis). D'autres échantillons comme ceux provenant des goélands, mouettes et oies Bernache présentent des nombres variables d'un échantillon à l'autre au sein du même groupe d'oiseaux. L'indice Chao1 donne des résultats similaires.

L'indice de Shannon qui prend en compte la diversité des taxons et leur abondance montre également des valeurs élevées pour les échantillons d'origines bovine (médiane d'environ 5,5) et porcine (4,8) et les effluents de station d'épuration (5) et des valeurs faibles pour les courlis (< 2) et les tadornes (2). Les goélands et les mouettes présentent des profils très hétérogènes avec, par exemple des individus ayant une faible diversité (indice de 0,2 correspondant à une fèces de goéland presque exclusivement composé du genre *Catellibacillus*) et d'autres ayant une très forte diversité (indice de 5). Le groupe des bovins est significativement différent des autres groupes (groupes aviaires : Test de Tukey,  $p < 0,0000$  ; porcs,  $p = 0,001$ ) excepté le groupe des effluents de station d'épuration. Le groupe des porcs est significativement différent des autres groupes exceptés les bovins, les effluents de station d'épuration et les oies Bernache. Enfin, le groupe des effluents de station d'épuration est significativement différent des groupes aviaires exceptés des oies Bernache.

L'indice Inverse de Simpson « InvSimpson » montre une diversité plus importante dans les échantillons bovins (suggérant un nombre important de taxons différents) que dans les échantillons porcins et d'effluents de station d'épuration (diversité due principalement à une abondance différente des taxons) et que dans les autres échantillons. Seule la diversité chez les bovins est significativement différente de celle des autres groupes (Anova puis Test de Tukey,  $p < 0,0000$ ).



**Figure 5 : Comparaison des diversités alpha (diversité inter-échantillon et intra-groupes) mesurées par quatre principaux indices. Les résultats sont représentés sous forme de boxplots des valeurs obtenues. A : Indice « Observed », prenant en compte le nombre d'ASV obtenus dans chaque échantillon. B. Indice Chao1, prenant en compte également le nombre d'ASV avec un facteur correcteur si nécessaire. C : Indice de Shannon qui prend en compte la diversité des taxons et leur abondance. D : Indice InvSimpson qui prend en compte la différence des taxons (et non leur abondance).**

### 5.4.4 Analyse de la diversité inter-spécifique ( $\beta$ ) des communautés bactériennes

L'analyse de la diversité inter-échantillons (nMDS, non-Metric Multidimensional Scaling, basé sur les valeurs de dissimilarité de Bray Curtis) montre une grande diversité des communautés bactériennes et une différenciation des échantillons en fonction de leur origine (oiseaux, effluents de

station d'épuration, animaux d'origine sauvage (phoques), porcs et bovins ; Figure 6). Même si les échantillons d'oiseaux domestiques (volaille) sont regroupés, ils se retrouvent dans le grand ensemble des oiseaux sauvages.

Dans cette ellipse regroupant les échantillons d'oiseaux domestiques, un certain nombre d'oiseaux sauvages sont également présents. Il s'agit de 41 échantillons provenant de goélands, 6 de mouettes, 10 de cygnes, 3 d'oies Bernache et 1 de courlis, suggérant des communautés bactériennes proches entre ces oiseaux.

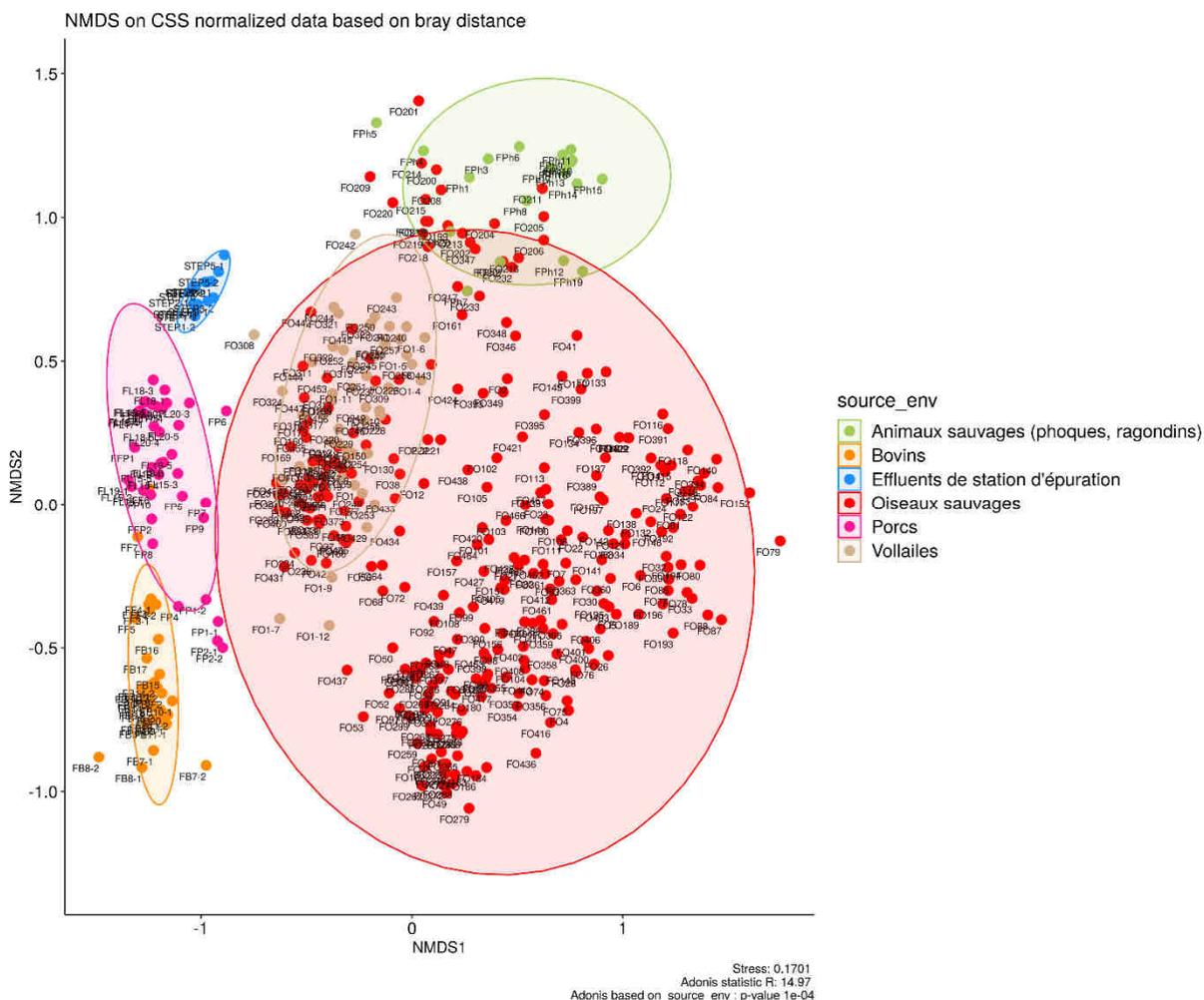


Figure 6 : Analyse nMDS, réalisée à partir d'une matrice de distance de Bray-Curtis (données normalisées). Les identifiants des sources sont colorés selon le type d'échantillon. Une valeur de stress de 0,1701 est obtenue. FO : fientes d'oiseaux ; FB : fèces de bovin ; FF fumiers de bovin ; FP : fèces de porc ; FL : lisiers de porc ; FPh : fèces de phoques ; R : fèces de ragondin ; STEP : effluents de station d'épuration.

### 5.4.5 Identification de marqueur(s) potentiel(s) par source

À la suite de cette analyse des communautés bactériennes, une exploration des ASV uniques et spécifiques à un groupe d'échantillons ou une espèce d'oiseau a été réalisée. L'idée était d'identifier des séquences spécifiques d'un hôte et donc potentiellement de développer de nouveaux marqueurs.

Un total de 12 873 ASV spécifiques d'un groupe d'échantillons a été ainsi identifié avec une abondance de 1 à 55 502 reads selon l'ASV spécifique considéré.

Toutefois, pour rechercher des séquences appropriées à la détermination de marqueurs spécifiques d'un hôte, un ASV doit correspondre à une espèce bactérienne spécifique présente dans un groupe spécifique d'échantillons ou différent d'au moins 3 % d'un autre ASV affilié au même genre (s'il n'est pas possible de descendre à l'espèce). Aussi, les ASV devaient être regroupées en OTU (Operational Taxonomic Unit ; regroupant les séquences présentant 97 % de similarité).

Pour l'obtention des OTU, une approche avait été testée en parallèle en utilisant QIIME et Mothur. Cette approche a permis d'obtenir un total de 895 OTU pour le premier run et de 1567 OTU lors du second au lieu des 8 959 ASV pour le run 1 et 21 644 ASV pour le run 2 par le workflow SAMBA v1.0.0.

La recherche des OTU présentant une spécificité d'hôte (espèce d'oiseau) ou de groupe (espèces d'oiseaux appartenant au même genre ou groupe) a permis de sélectionner 176 OTU (49 du premier run et 127 du second).

Un arbre phylogénétique (Figure 7) a été construit avec ces OTU en plus de 46 séquences supplémentaires issues de la base de données NCBI et de séquences de marqueurs connus. Une pré-sélection de 38 OTU spécifiques d'une ou plusieurs sources aviaire(s) a été réalisée. Parmi ces OTU spécifiques, quatre ont été retenus : un OTU appartenant au genre *Romboutsia* associé aux cygnes, un appartenant au genre *Bacteroides* associé aux huîtres pie, un appartenant à l'espèce *Paeniclostridium sordellii* associés aux cormorans et un appartenant à la famille des *Peptostreptococcaceae* et associé aux anatidés.

Ces séquences d'intérêts ont ensuite été blastées afin de récupérer dans la base de données GenBank une vingtaine de séquences similaires provenant d'hôtes identiques ou différents. Ces séquences ont ensuite été alignées avec ClustalX (v2.1) afin de déterminer les régions variables (spécifiques de la séquence cible) et les régions constantes (communes aux séquences non cibles).

Parmi les OTU sélectionnés, deux n'ont pas permis de dessiner des amorces en raison de l'absence de région spécifique aux hôtes ciblés (anatidés et cormoran). Pour les deux autres hôtes, les amorces et sondes ont été dessinées manuellement et à l'aide de Primer3 (v4.1.0, OligoCalc (v3.27) et Multiple Primer Analyzer. Pour l'OTU appartenant au genre *Romboutsia*, trois couples d'amorces ont été dessinés. Pour l'OTU appartenant au genre des *Bacteroides* un couple d'amorces et une sonde ont été dessinés.

Les tests réalisés pour ces quatre couples d'amorces sur des échantillons fécaux cibles et non cibles nous ont conduit à retenir qu'un seul couple, celui ciblant les cygnes. Ce marqueur s'est avéré présenter une sensibilité de 75 % (n= 16 fèces de cygnes) et une spécificité de 90,2 % (n=116 échantillons) ; les échantillons non cibles positifs correspondent à des fèces de porcs et des effluents de station d'épuration.

Des perspectives à ce travail pourront être de rechercher d'autres couples d'amorces ciblant des séquences spécifiques à des hôtes aviaires ou d'autres origines.



Figure 7 : Arbre phylogénétique construit avec les OTU spécifiques d'un hôte identifié au cours de cette étude et de 46 séquences supplémentaires issues de la base de données NCBI et de séquences de marqueurs connus.

## 6 Etude de persistance de marqueurs

Pour interpréter et, à terme modéliser par l'approche T90, les données de MST culture dépendante ou non, on se heurte à la question de la persistance dans les milieux aquatiques, des marqueurs microbiologiques utilisés (Fergusson & Signeretto, 2011 ; Solecki et al, 2011 ; Ballesté et al, 2018). En effet les bactéries fécales (pathogènes, indicateurs de contamination fécale et/ou marqueurs utilisés en MST) ne sont, en théorie, pas destinées à persister hors de leur habitat naturel qui est le tractus digestif des animaux et de l'homme. Normalement, ces bactéries trouvent dans les milieux aquatiques des conditions défavorables, notamment en termes de radiations lumineuses, température, salinité et disponibilité en nutriments. Exposées à ces différents stress, les bactéries ne peuvent survivre. Elles perdent rapidement leur capacité à croître sur un milieu de culture en évoluant vers un état dit viable non cultivable (VNC), puis meurent. Toutefois, des études ont démontré que des bactéries fécales rejetées dans le milieu aquatique pouvaient être capables de s'y multiplier et donc de s'implanter dans cet environnement. On parle alors d'un processus de naturalisation (Ishii et al, 2008).

Des expériences ont été menées au LSEM pour évaluer la persistance des marqueurs qPCR bactériens et d'une sélection de génotypes de *E. coli* (typés par ERIC-PCR ; autre approche d'identification des sources de contamination fécale retenue dans ce projet, voir rapport final BacTrac 1) dans des microcosmes d'eaux de mer, prélevées à St Anne Plouzané (29) et arrivant directement au laboratoire, et d'eaux douces de l'étang de St Derrien (29).

Les microcosmes concernaient individuellement les marqueurs humains [apport d'eau résiduaire urbaine, ERU, en entrée de la station d'épuration Maison Blanche à Brest (29) ; expérience en Novembre 2017], bovins (apport de bouses de vaches d'une ferme de Plougonvelin (29) ; Janvier 2018), ou les marqueurs Volaille [apport de fientes de volaille d'une ferme de Milizac (29) ; Mars 2018]. Une seconde expérimentation de l'ensemble des marqueurs (apport, à la fois, d'eau résiduaire urbaine, de bouses de vaches et de fientes de volaille, prélevés sur les mêmes sites que pour les contaminations par une source unique) a été réalisée en Juin 2018.

Les microcosmes ont été réalisés dans des bouteilles en verre de 10 l avec 8 l d'eau comprenant un apport de fèces ou effluents (eau résiduaire urbaine, dilution au 1/20 ; bouses de vache 1/500 et fientes de volaille 1/1000). Des flacons témoins négatifs (eau de mer et eau douce sans apport de matières fécales) ont été suivis en parallèle. La température de la pièce était à 18°C et une agitation magnétique (320 rpm) a été appliquée tout au long de l'expérience. Les expériences ont été maintenues à l'obscurité. Des prélèvements ont été réalisés tous les jours de T0 à T10 puis tous les 2 jours jusqu'à T18. En début et fin d'expérience, les teneurs en MES, en Carbone Organique Dissous et Totaux (COD et COT), en azote et en phosphore total ont été mesurés (sous-traitance).

Les marqueurs qPCR ont été recherchés par filtration (filtres de nitrocellulose de 0,45 µm de porosité, Pall). Les filtres ont été stockés à -80°C jusqu'à l'extraction des ADN par le kit Fast DNA for Soil (MP Biomedical). Les *E. coli* et les entérocoques ont été dénombrés après filtration respectivement sur géloses TBX à 44°C pendant 24 h et sur gélose Slanetz et Bartley à 37°C pendant 48 h (confirmation

sur BEA). Certaines colonies isolées à des temps déterminés ont été expédiées à EPOC pour des analyses sur les géotypes d'*E. coli*.

## 6.1.1 Etude de persistance des marqueurs humains - Cas d'une eau résiduaire urbaine

### 6.1.1.1 Conditions expérimentales

Par comparaison avec la composition chimique des eaux avant contamination (Tableau 6), on observe que l'apport en eau résiduaire urbaine enrichit nettement les eaux contaminées en matière en suspension (MES), Azote et Phosphore totaux tandis qu'il les enrichit plus modérément en carbone organique dissous (COD) et/ou particulaire (COT). Cela s'explique par la composition chimique de l'ERU qui est proportionnellement plus riche en MES, Azote et Phosphore qu'en COD ou COT. En pratique, les concentrations sont 20 fois plus faibles dans l'eau des microcosmes en début d'expérience ( $T_0$ ) que dans l'ERU correspondent bien au facteur de dilution de l'ERU (450 ml) dans l'eau douce ou marine (8500 ml) réalisée en début d'expérience.

Malgré l'enrichissement, les concentrations observées dans les microcosmes contaminés par l'ERU restent de l'ordre du mg/l (Tableau 6). Ces concentrations sont très inférieures aux concentrations optimales de croissance d'*E. coli*. Par exemple, le milieu LB utilisé pour les isolements, contient 10 g/l de tryptone et 5 g/l d'extrait de levure (notice fabricant). Les cellules d'*E. coli* seraient donc bien dans des conditions nutritives limitantes dans les eaux douces et/ou marines des microcosmes.

Après 18 jours, la baisse la plus marquée concerne les MES. Elle peut s'expliquer par (i) la biodégradation des particules organiques, (ii) l'adsorption des particules sur les parois du flacon ou (iii) la mort et la lyse des particules vivantes apportées par l'ERU, dont les *E. coli*. A l'exception du phosphore dans les microcosmes d'eau de mer, toutes les concentrations en nutriments sont plus basses après 18 jours, reflétant une activité biologique de consommation dans les microcosmes.

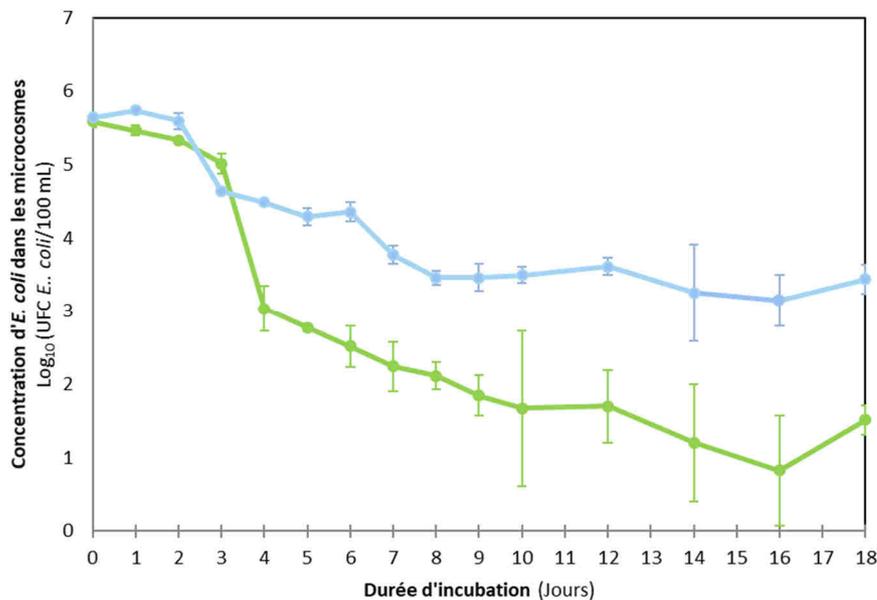
**Tableau 6. Caractéristiques physico-chimiques des eaux douces et marines, non contaminées et contaminées par des eaux résiduaires urbaines (ERU). Concentration en début et en fin d'expérience après 18 jours à 18°C, 100% d'oxygène, à l'obscurité et sous agitation permanente. MES : Matières en suspension, COD : carbone organique dissous, COT : carbone organique total.**

	ERU	Eau douce			Eau de mer		
		Non contaminée	Contaminée		Non contaminée	Contaminée	
			Debut	Fin		Debut	Fin
MES (mg/l)	351	3	22	7,8	3,4	21	10
COD (mg/l)	48,9	6,6	7,1	6,6	1,2	2,7	2
COT (mg/l)	69,4	6,7	8,9	6,9	1,3	5,1	2
Azote total (mg/l)	97	1	6,4	1,5	<1	4,9	4,4
Phosphore total (mg/l)	11,7	0,06	0,62	0,59	< 0,05	0,34	0,53

### 6.1.1.2 Courbe de survie et T90 de la population d'*E. coli*

L'évolution des concentrations en *E. coli* au cours du temps suit un patron typique de courbes de survie dans les microcosmes d'eau douce et d'eau de mer (Figure 8). La chute exponentielle des concentrations reflète l'évolution de la mortalité (ou au moins la perte de cultivabilité) au sein de la

population d'*E. coli* initialement introduite dans les microcosmes. Cela aboutit à une décroissance de la population d'*E. coli* introduite dans l'eau douce ou l'eau de mer.



**Figure 8.** Courbes de survie d'une population d'*E. coli* issue d'une eau résiduaire urbaine dans des microcosmes d'eau douce (en bleu) et d'eau de mer (en vert). Evolution de la concentration des *E. coli* exprimée en Log<sub>10</sub> d'UFC *E. coli* pour 100 ml d'eau de microcosme filtrées, sur 18 jours. Les valeurs représentées correspondent à la moyenne obtenue pour 3 microcosmes répliques, les barres d'erreur représentent l'écart type.

Pour quantifier la décroissance d'une population de bactéries rejetées dans l'environnement, il est d'usage d'utiliser le T90. Le T90 représente le temps nécessaire pour que 90 % des bactéries aient été éliminées (ne soient plus cultivables sur les milieux classiques de culture). Le T90 se calcule à partir de la formule suivante (Jeanneau et al. 2012) :

$$T90 = \frac{-\ln(0.1)}{k} \quad \text{Avec} \quad k = -t \frac{C(t)}{C_0}$$

Où  $C(t)$  représente la concentration en *E. coli* au temps  $t$ ,  $C_0$  la concentration initiale en *E. coli*,  $k$  la constante de décroissance exponentielle de la population d'*E. coli*.

Or, la cinétique de décroissance de la population bactérienne n'est pas toujours monotone et ne suit donc pas toujours un modèle de décroissance monophasique. Il peut y avoir une phase de latence qui précède la décroissance, comme observé précédemment par Mattioli et al, 2017. Il convient alors d'ajouter la durée de cette phase de latence au calcul du T90.

Par ailleurs, la décroissance peut être biphasique. Il convient alors d'appliquer le modèle mathématique suivant (Jeanneau et al. 2012) :

$$C_t = C_0 \times (f e^{-k_1 t} + (1-f) e^{-k_2 t})$$

$$\Leftrightarrow \ln\left(\frac{C_t}{C_0}\right) = \ln(f e^{-k_1 t} + (1-f) e^{-k_2 t})$$

Les deux constantes de décroissance du modèle biphasique sont données par deux valeurs de pente  $k_1$ ,  $k_2$  pour calculer le T90.

A partir de l'exploitation des courbes de survie obtenues pour chacun des 6 microcosmes (Tableau 7), le temps (T90 en jours) nécessaire pour obtenir une réduction de 90 % de la concentration initiale en *E. coli* dans les microcosmes d'eau douce contaminés par une ERU était de  $4,2 \pm 0,2$  jours (moyenne  $\pm$  écart type) et de  $3,4 \pm 0,2$  jours (moyenne  $\pm$  écart type) dans les microcosmes d'eau de mer contaminés par une ERU.

**Tableau 7. Paramètres de la cinétique pris en compte pour le calcul des T90 dans chaque microcosme d'eau douce (FWH) et d'eau de mer (SWH) contaminés avec une eau résiduaire urbaine. Choix du modèle mono ou biphasique, valeurs des constantes  $k_1$  et  $k_2$ , latence en jours déterminées à partir des points expérimentaux et utilisés pour calculer le T90 en jours.**

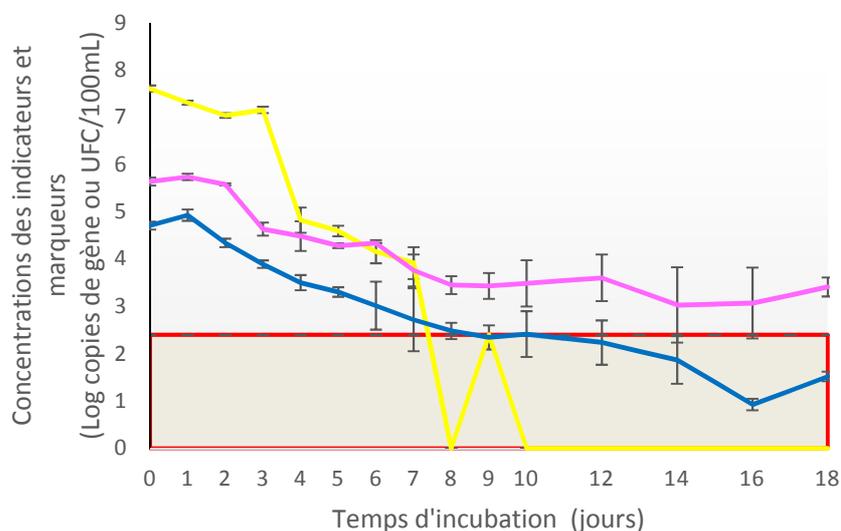
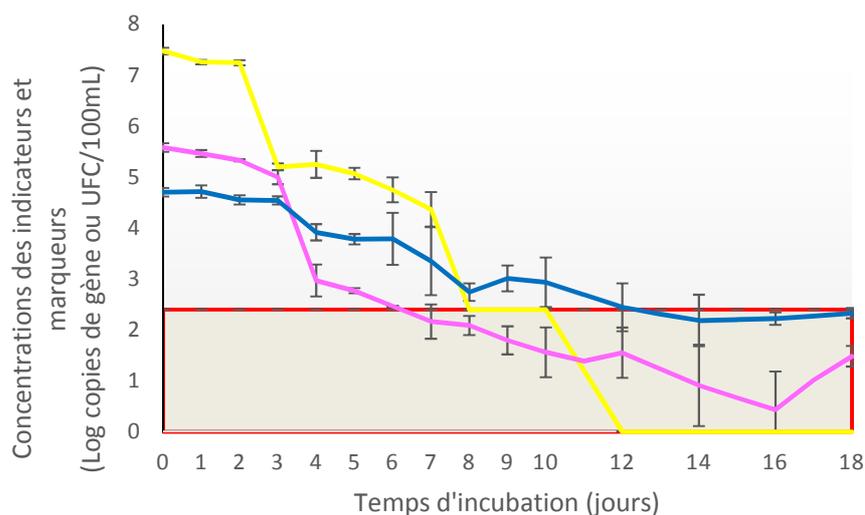
	SWH1	SWH2	SWH3	FWH1	FWH2	FWH3
Latence (jours)	3	3	3	2	2	2
Modèle	biphasique	biphasique	biphasique	biphasique	biphasique	biphasique
f	0,987	0,996	0,995	0,992	0,985	0,974
$k_1$	15,261	4,432	5,243	1,175	1,036	1,071
$k_2$	0,562	0,213	0,267	0,102	0,059	0,093
T90 (jours)	<b>3,2</b>	<b>3,5</b>	<b>3,4</b>	<b>4,0</b>	<b>4,3</b>	<b>4,3</b>

On observe que la perte de cultivabilité de la population d'*E. coli* est plus forte dans l'eau de mer que dans l'eau douce. En d'autres termes, les *E. coli* de l'ERU survivent mieux dans l'eau douce que dans l'eau de mer, résultat attendu. Des résultats similaires ont été obtenus au cours d'autres études évaluant la persistance d'une population d'*E. coli* provenant d'eaux résiduaires en microcosmes d'eaux de mer et d'eau douces (Jeanneau et al 2012).

Concernant les entérocoques, les concentrations sont plus faibles que celles des *E. coli* en début d'expérience (environ d'un facteur 10). En eau douce, les concentrations diminuent d'une manière similaire à celles des *E. coli* tout au long de l'expérience tandis qu'en eau de mer, elles diminuent plus faiblement et sont supérieures à celles en *E. coli* après le troisième jour (Figure 8).

### 6.1.1.3 Persistance des marqueurs moléculaires

Le marqueur qPCR *Bacteroidales* Humain (HF183) montre une persistance inférieure aux indicateurs de contamination fécale (*E. coli* et entérocoques par culture) en eau de mer et en eau douce (Figure 9). Les concentrations en marqueur HF183 ne sont supérieures à la limite de quantification (2,4 Log copies de gènes par 100 ml d'eau) que jusqu'à 7 jours et cela aussi bien en eau douce qu'en eau de mer. Ces résultats sont en accord avec ceux obtenus dans l'étude de Jeanneau et al (2012) avec des concentrations en marqueur HF183 qui ont pu être mesurées jusqu'au 6<sup>ème</sup> jour.



**Figure 9. Persistance des indicateurs fécaux (*E. coli* en rose et entérocoques en bleu) et du marqueur qPCR *Bacteroidales* (en jaune) Humain (HF183) dans l'eau de mer (A) et dans l'eau douce (B) inoculées avec de l'eau résiduaire urbaine. Moyenne de 3 microcosmes pour l'eau de mer contaminées et de 3 microcosmes pour l'eau douce. Les concentrations sont exprimées en UFC pour 100 ml d'eau pour les indicateurs *E. coli* et les entérocoques et en copies de gènes pour 100 ml pour le marqueur HF183. LQ : Limite de quantification du marqueur HF183 : 2,4 Log copies de gènes par 100 ml d'eau.**

## 6.1.2 Etudes de persistance des marqueurs bovins

### 6.1.2.1 Conditions expérimentales

Pour cette expérimentation, 6 bouses de vaches ont été prélevées le dimanche 7 janvier 2018 à 18 h00 à Plougonvelin (29) et stockées à 4°C jusqu'à utilisation le 8 janvier 2018. Le mélange des bouses de vaches a été utilisé à une dilution au 1/10<sup>ème</sup> dans l'eau. L'eau de mer provient de Sainte-Anne (laboratoire Dyneco) prélevée le 8 janvier à 9 h. L'eau douce provient de l'Etang de Saint Derrien, zone de baignade. Le prélèvement a été réalisé à 17h30 le dimanche 7 janvier 2018.

Pour la préparation des microcosmes contaminés, 350 g du mélange des 6 bouses de vache ont été mélangés (SM1) à 2950 ml d'eau et ensuite 160 ml de cette préparation SM1 ont été ajoutée dans chaque microcosme contenant 7840 ml d'eau douce ou d'eau de mer. Par comparaison avec la composition chimique des eaux avant contamination (Tableau 8), on observe que l'apport de bouses de vaches en suspension enrichit nettement les eaux contaminées en matière en suspension (MES), carbone organique dissous (COD) et particulaire (COT), Azote et Phosphore totaux. Cela s'explique par la composition chimique de la suspension de bouses de vaches qui est particulièrement riche en MES, COD, COT, Azote et Phosphore.

**Tableau 8. Caractéristiques physico-chimiques des eaux douces et marines, non contaminées et contaminées par un mélange de bouses de vaches. Concentrations dans les microcosmes en début et en fin d'expérience après 18 jours à 18°C, 100% d'oxygène, à l'obscurité et sous agitation permanente. MES : Matières en suspension, COD : carbone organique dissous, COT : carbone organique total.**

	Suspension de bouses de vaches	Eau douce				Eau de mer	
		Non contaminée	Contaminée		Non contaminée	Contaminée	
			Début	Fin		Début	Fin
MES (mg/L)	9260	6.4	118	ND	2.8	159	ND
COD (mg/L)	600	7.1	30.6	15.6	1.1	33.1	12.8
COT (mg/L)	1706	7.6	49.9	15.9	1	50.7	14.9
Azote total (mg/L)	417	1.1	8.2	<20	<1	6.8	<20
Phosphore total (mg/L)	606	0.14	12.4	12.1	0.05	10.6	10.8

### 6.1.2.2 Courbe de survie et T90 de la population d'*E. coli*

L'évolution des concentrations en *E. coli* provenant des bouses de vaches au cours du temps suit un patron typique de courbes de survie dans les microcosmes d'eau douce et d'eau de mer (Figure 10). La chute modérée des concentrations reflète l'évolution de la mortalité (ou perte de cultivabilité) au sein de la population d'*E. coli* initialement introduite dans les microcosmes. La décroissance de la population d'*E. coli* introduite dans l'eau douce ou l'eau de mer est probablement ralentie par la forte disponibilité en nutriments (Carbone, Azote et Phosphore) dans les microcosmes contaminés.

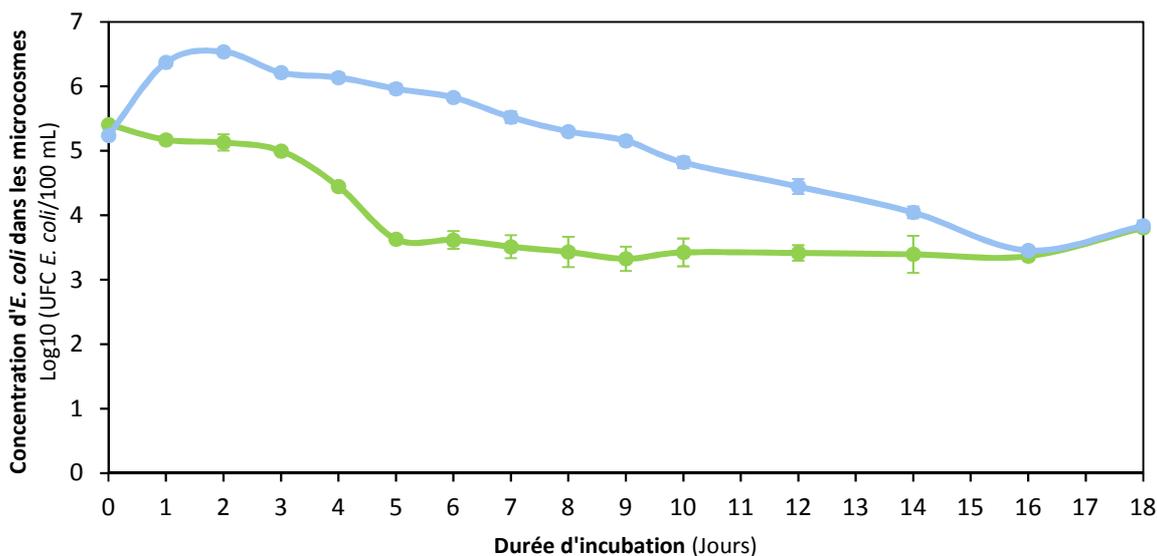


Figure 10. Courbes de survie d'une population d'*E. coli* issue d'un mélange de bouses de vaches dans des microcosmes d'eau douce (en bleu) et d'eau de mer (en vert). Evolution de la concentration des *E. coli* exprimée en Log<sub>10</sub> d'UFC *E. coli* pour 100ml d'eau de microcosme filtrées, sur 18 jours. Les valeurs représentées correspondent à la moyenne obtenue pour 3 microcosmes répliques, les barres d'erreur représentent l'écart type.

Les T90 ont été calculés comme décrit au 6.1.1.2. A partir de l'exploitation des courbes de survie (Tableau 9), le T90 dans les microcosmes d'eau douce contaminés par une suspension de bouse de vache était de 7,0 jours et de  $4,4 \pm 0,2$  jours (moyenne  $\pm$  écart type) dans les microcosmes d'eau de mer contaminés par une suspension de bouse de vache.

On observe comme précédemment que la perte de cultivabilité de la population d'*E. coli* est plus forte dans l'eau de mer que dans l'eau douce. En d'autres termes, les *E. coli* des bouses de vaches survivent mieux dans l'eau douce que dans l'eau de mer, résultat attendu.

En revanche, on voit que les T90 sont plus élevés que dans l'expérimentation précédente. Cela confirme que les fortes teneurs en nutriments dans les microcosmes contaminés pourraient avoir contribué à atténuer la mortalité des populations d'*E. coli* dans les microcosmes contaminés par une suspension de bouses de vaches.

**Tableau 9. Paramètres de la cinétique pris en compte pour le calcul des T90 dans chaque microcosme d'eau douce (FWC) et d'eau de mer (SWC) contaminés avec une suspension de bouses de vaches. Choix du modèle mono ou biphasique, valeurs des constantes  $k_1$  et  $k_2$ , latence en jours déterminées à partir des points expérimentaux et utilisés pour calculer le T90 en jours.**

	SWC1	SWC2	SWC3	FWC1	FWC2	FWC3
Latence (jours)	3	2	3	2	2	2
Modèle	biphasique	biphasique	biphasique	monophasique	monophasique	monophasique
f	0,973	0,981	0,976			
$K_1$	1,784	1,177	1,652	0,4566	0,456	0,4603
$K_2$	0,000	0,000	0,000			
T90	4,4	4,1	4,5	7,0	7,0	7,0

De plus, il a été précédemment observé que les indicateurs de contamination classiques comme *E. coli* d'origine bovine persistaient plus longtemps que ceux provenant d'eaux usées (Korarjkic et al 2013; Korarjkic et al 2019).

Les concentrations en *E. coli* et en entérocoques sont similaires en début d'expérience et tout au long de l'expérience en eau de mer. En eau douce, les concentrations sont supérieures à celles des entérocoques tout au long de l'expérience (Figure 10).

### 6.1.2.3 Persistance des marqueurs moléculaires

Le marqueur qPCR *Bacteroidales* Ruminant Rum2Bac est quantifié tout au long de l'expérience (jusqu'à T18 j) dans l'eau de mer et n'est plus quantifié au temps T7 (< LQ de 3,4 Log copies de gènes par 100 ml) dans l'eau douce puis à des concentrations proches de la limite de quantification à T8 et T9 (Figure 11).

Dans l'eau de mer, le marqueur Rum2Bac est donc présent tout au long de l'expérience comme les indicateurs *E. coli* et entérocoques (Figure 11). Dans l'eau douce, le marqueur Rum2Bac persiste moins longtemps et les *E. coli* survivent mieux que les entérocoques dans l'eau douce, comme cela a été également observé dans l'expérience précédente (apport de l'ERU). Il est surprenant d'avoir une décroissance du marqueur Rum2Bac plus importante dans l'eau douce que dans l'eau de mer. Toutefois, on peut noter que des résultats variables ont été observés dans les quelques études concernant une source bovine : décroissance plus importante en eau marine qu'en eau douce de marqueur bovin dans l'étude de Bae & Wuertz (2015) et décroissance similaire en eau douce et eau de mer du marqueur Rum2Bac dans l'étude de Korarjkic et al (2019).

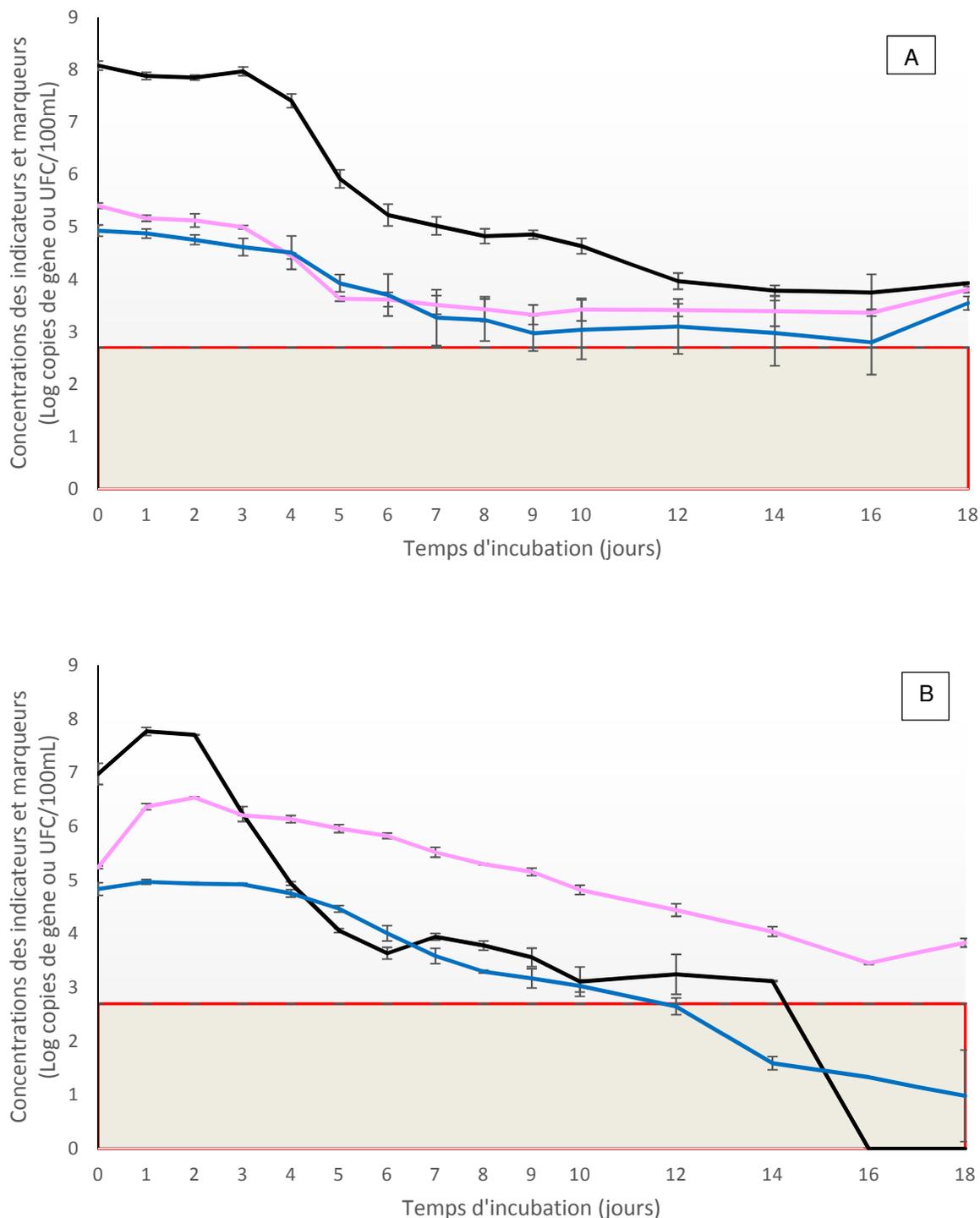


Figure 11. Persistance des indicateurs fécaux (*E. coli* en rose et entérocoques en bleu) et du marqueur qPCR *Bacteroidales* Ruminant Rum2Bac dans l'eau de mer (A) et dans l'eau douce (B) inocuées avec des bouses de vaches. Moyenne de 3 microcosmes pour l'eau de mer contaminées et de 3 microcosmes pour l'eau douce. Les concentrations sont exprimées en UFC pour 100 ml d'eau pour les indicateurs *E. coli* et les entérocoques et en copies de gènes pour 100 ml pour le marqueur Rum2Bac. Limite de quantification du marqueur Rum2Bac : 2,7 Log copies de gènes par 100 ml d'eau.

### 6.1.3 Etude de persistance des marqueurs volaille

Pour cette expérimentation, plus de 500 g de fientes fraîches de volailles ont été prélevées le lundi 12 mars 2018 à Milizac (29) et stockées à 4°C jusqu'à utilisation. Après homogénéisation, les

fientes ont été apportées dans l'eau à une dilution au 1/1000<sup>ème</sup>. L'eau de mer provient de Sainte-Anne Plouzané (29) prélevée le 12 mars 2018 à 9 h. L'eau douce provient de l'Etang de Saint Derrien (29). Le prélèvement a été réalisé à 11h30 le dimanche 11 mars 2018. Pour la préparation des microcosmes contaminés, 300 g du mélange de fientes de poules a été réalisé (SM1) dans 2700 ml d'EPHT (Eau PHysiologique Tamponnée) et ensuite 80 ml de cette préparation SM1 a été ajoutée dans chaque microcosme contenant 7920 ml d'eau douce ou d'eau de mer.

### 6.1.3.1 Conditions expérimentales

Par comparaison avec la composition chimique des eaux avant contamination (Tableau 10), on observe que l'apport de fientes de volaille en suspension enrichit nettement les eaux contaminées en matière en suspension (MES), carbone organique dissous (COD) et particulaire (COT), Azote et Phosphore totaux. Cela s'explique par la composition chimique de la suspension de fientes de volaille qui est particulièrement riche en MES, COD, COT, Azote et Phosphore.

**Tableau 10. Caractéristiques physico-chimiques des eaux douces et marines, non contaminées et contaminées par le mélange de fientes de volailles. Concentration en début et en fin d'expérience après 18 jours à 18°C, 100% d'oxygène, à l'obscurité et sous agitation permanente. MES : Matières en suspension, COD : carbone organique dissous, COT : carbone organique total**

	Mélange de fientes de volailles (1/10)	Eau douce		Eau de mer			
		Non contaminée	Contaminée		Non contaminée	Contaminée	
			Début	Fin		Début	Fin
MES (mg/L)	34710	6.7	135	65	5	145	68
COD (mg/L)	2610	4.5	27.8	7.7	0.8	26.2	8.4
COT (mg/L)	6460	4.6	33.1	9	1	49.5	13.7
Azote total (mg/L)	2050	1.4	19	4	<1	16	16
Phosphore total (mg/L)	1099	0.07	8.13	8.18	<0.05	6.8	7.61

### 6.1.3.2 Courbe de survie et T90 de la population d'*E. coli*

Comme précédemment, à partir des courbes de survie en eaux douce et marine des populations d'*E. coli* issues de fientes de volaille (Figure 12) on a pu déterminer les paramètres permettant de calculer les T90 (Tableau 11). On détermine ainsi un T90 moyen  $4,5 \pm 0,1$  jours de la population d'*E. coli* de fientes de volailles dans les microcosmes d'eau de mer et de  $3,1 \pm 0,4$  jours dans les microcosmes d'eau douce. Il faut toutefois noter que sur la durée de l'expérience les *E. coli* survivent mieux en eau douce qu'en eau de mer (concentrations supérieures d'environ 1 Log UFC par 100 ml d'eau) (Figure 12).

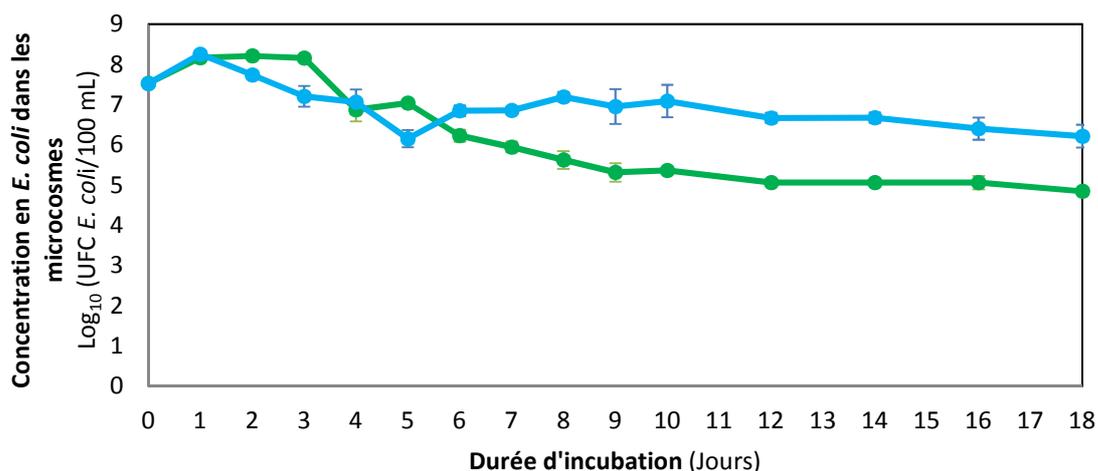


Figure 12. Courbes de survie d'une population d'*E. coli* issue de fientes de volaille dans des microcosmes d'eau douce (en bleu) et d'eau de mer (en vert) obtenues lors de l'expérimentation n°3. On observe l'évolution de la mortalité des *E. coli* exprimée en Log<sub>10</sub> d'UFC *E. coli* pour 100 ml d'eau de microcosme filtrées, sur 18 jours d'expérience. Les valeurs représentées correspondent à la moyenne obtenue pour 3 microcosmes réplicas, les barres d'erreur représentent l'écart-type.

Tableau 11. Paramètres de la cinétique pris en compte pour le calcul des T90 dans chaque microcosme d'eau douce (FWCh) et d'eau de mer (SWCh) contaminés avec une suspension de fientes de volailles. Choix du modèle mono ou biphasique, valeurs des constantes  $k_1$  et  $k_2$ , latence en jours déterminées à partir des points expérimentaux et utilisés pour calculer le T90 en jours.

	SWCh1	SWCh2	SWCh3	FWCh1	FWCh2	FWCh3
Phase de latence (jours)	3	3	3	1	1	1
Modèle	biphasique	biphasique	biphasique	biphasique	biphasique	biphasique
f	0,998	0,991	0,996	0,904	0,955	0,948
$K_1$	1,663	1,566	1,421	1,583	1,554	1,741
$K_2$	0,098	0,189	0,137	0,096	0,035	0,107
T90	4,4	4,5	4,6	3,3	3,4	2,6

Lors de cette expérience, les concentrations en *E. coli* étaient supérieures à celles des entérocoques aussi bien en eau douce qu'en eau de mer tout au long de l'expérience (Figure 12).

### 6.1.3.3 Persistance des marqueurs moléculaires

Les marqueurs qPCR bactérien Aviaires AV4143 et GFD sont quantifiés tout au long de l'expérience (jusqu'à T18 j) dans l'eau de mer et dans l'eau douce comme les indicateurs *E. coli* et entérocoques (Figure 13) ; le marqueur AV4143 présentant des concentrations supérieures au

marqueur GFD. Le marqueur Volaille est quantifié 9 jours en eau de mer et 8 jours en eau douce et n'est plus détecté ensuite (Figure 13).

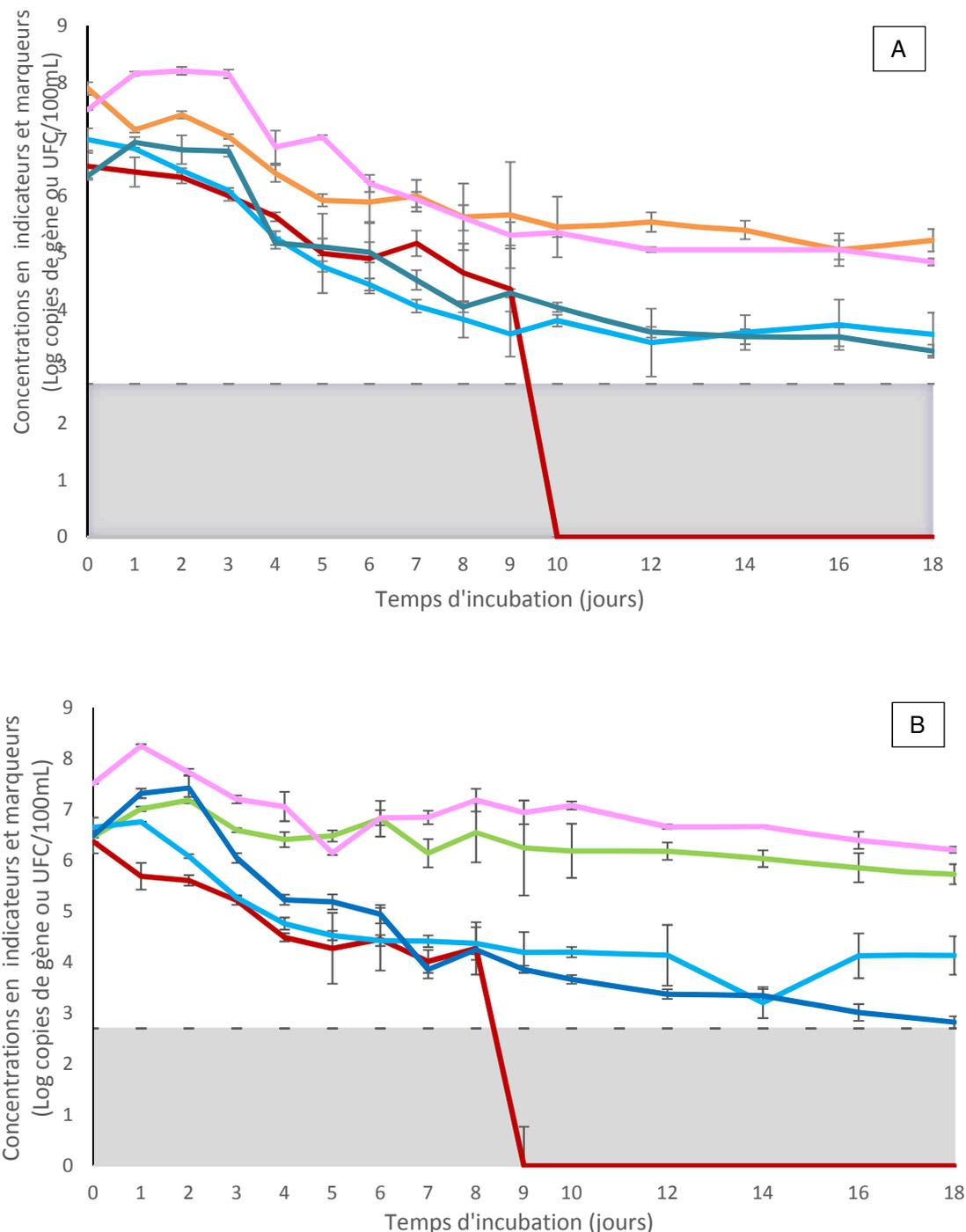


Figure 13. Persistance des indicateurs fécaux (*E. coli* en rose et entérocoques en bleu foncé) et des marqueurs qPCR bactériens Aviaire Général AV4143 (en vert) et GFD (en bleu clair) et marqueur Volaille (en marron) dans l'eau de mer (A) et dans l'eau douce (B) inoculées avec des fientes de volaille. Moyenne de 3 microcosmes pour l'eau de mer contaminées et de 3 microcosmes pour l'eau douce. Les concentrations sont exprimées en UFC pour 100 ml d'eau pour les indicateurs *E. coli* et les entérocoques et en copies de gènes pour 100 ml pour les marqueurs qPCR bactériens. LQ : Limites de quantification des marqueurs: 2,70 Log copies de gènes par 100 ml d'eau. La zone grisée correspond aux données inférieures à la limite de quantification des marqueurs.

## 6.1.4 Etude de persistance mixte

### 6.1.4.1 Conditions expérimentales

Pour cette expérimentation, plusieurs sources de contamination ont été prélevées puis mélangées pour obtenir des microcosmes de contamination mixte (humaine, bovine et volaille). L'eau ERU (8 l) a été prélevée en entrée de la station d'épuration Maison Blanche de Brest (29) le lundi 4 juin à 8h et conservée à 4°C jusqu'à l'utilisation. Pour les bouses de vaches, une solution homogène a été réalisée à partir de 300 g d'un mélange de 6 bouses de vache. Les bouses ont été récoltées le dimanche 3 juin entre 18 et 20h (4 provenant du champ et 2 en salle de traite) et conservées en glacière avec pains de glace pendant la nuit. Enfin, concernant les fientes de volaille, une solution homogène de 300 g de fientes a été réalisée. Les fientes ont été récoltées le lundi 4 juin à 8h dans une ferme de Milizac (29) et conservées à 4°C en attente d'utilisation. Puis, une solution SM1 comprenant les 3 sources a été préparée avec :

- 3 l d'eau ERU
- 60,22 g du mélange de bouses de vaches
- 60,22 g du mélange de fientes de volailles

Par comparaison avec la composition chimique des eaux avant contamination (Tableau 12), on observe que l'apport des trois sources de contamination enrichit nettement les eaux contaminées en matière en suspension (MES), carbone organique dissous (COD) et particulaire (COT), Azote et Phosphore totaux.

**Tableau 12. Caractéristiques physico-chimiques des eaux douces et marines, non contaminées et contaminées par le mélange d'eau résiduaire urbaine, de bouses de vaches et de fientes de volailles. Concentration en début et en fin d'expérience après 18 jours à 18°C, 100% d'oxygène, à l'obscurité et sous agitation permanente. MES : Matières en suspension, COD : carbone organique dissous, COT : carbone organique total**

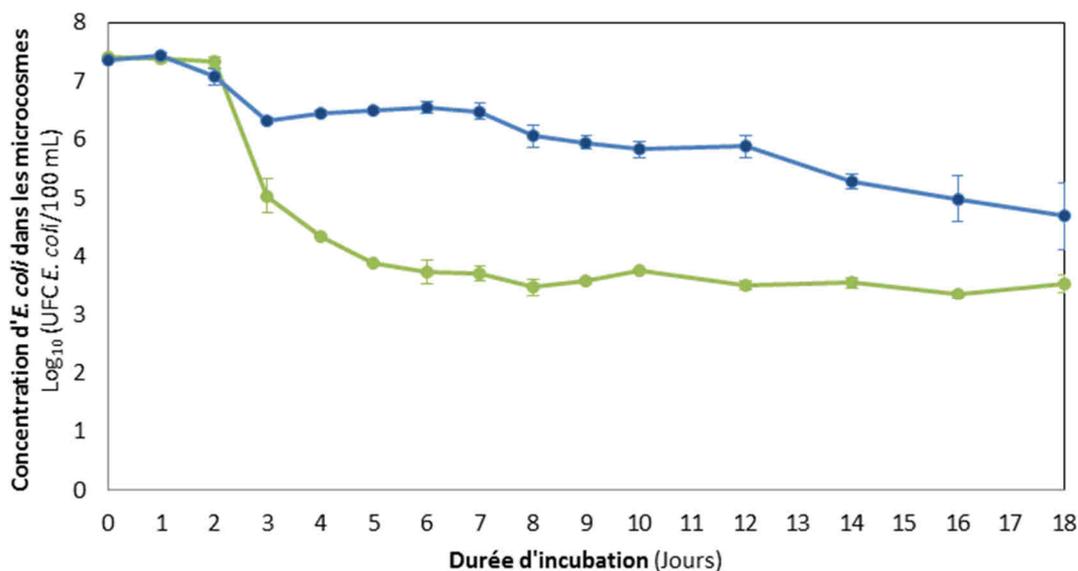
	Eau douce					Eau de mer				
	Source humaine	Source bovine	Source aviaire	Source mixte	Non contaminée	Contaminée		Non contaminée	Contaminée	
		(1/10)	(1/10)			Début	Fin		Début	Fin
MES (mg/L)	289	3850	11220	2230	5	41	22	<2	46	30
COD (mg/L)	19,7	293	1838	510	4,4	8,8	5,8	<2	8,7	4,9
COT (mg/L)	69,1	594	2370	1070	5,1	11,5	6,7	<2	15,4	6,6
Azote total (mg/L)	51	203	1650	424	< 0,5	7,9	2	<1	7	7,7
Phosphore total (mg/L)	7,01	566	698	80,3	0,04	1,08	1,1	<0,05	0,93	0,9

#### 6.1.4.2 Courbe de survie et T90 de la population d'*E. coli*

De même à partir des paramètres permettant de calculer les T90 (Tableau 13) déterminée à partir de la courbe de survie (Figure 14) des *E. coli* provenant d'un mélange de matières fécales humaines, bovines et aviaire, on a déterminé ainsi un T90 moyen  $2,5 \pm 0,1$  jours de la population d'*E. coli* dans les microcosmes d'eau de mer et de  $5,4 \pm 1,6$  jours dans les microcosmes d'eau douce.

**Tableau 13. Paramètres de la cinétique pris en compte pour le calcul des T90 dans chaque microcosme d'eau douce (FWM) et d'eau de mer (SWM) contaminés avec un mélange d'ERU, de suspension de bouses de vaches et de fientes de volailles. Choix du modèle mono ou biphasique, valeurs des constantes  $k_1$  et  $k_2$ , latence en jours déterminées à partir des points expérimentaux et utilisés pour calculer le T90 en jours.**

	SWM1	SWM2	SWM3	FWM1	FWM2	FWM3
Latence (jours)	2	2	2	1	2	1
Modèle	biphasique	biphasique	biphasique	biphasique	biphasique	biphasique
f	0,999	1,000	1,000	0,822	0,620	0,427
$K_1$	4,418	4,754	6,232	2,177	24,922	12,429
$K_2$	0,115	0,062	0,114	0,217	0,267	0,389
T90	2,5	2,5	2,4	3,8	7,0	5,4



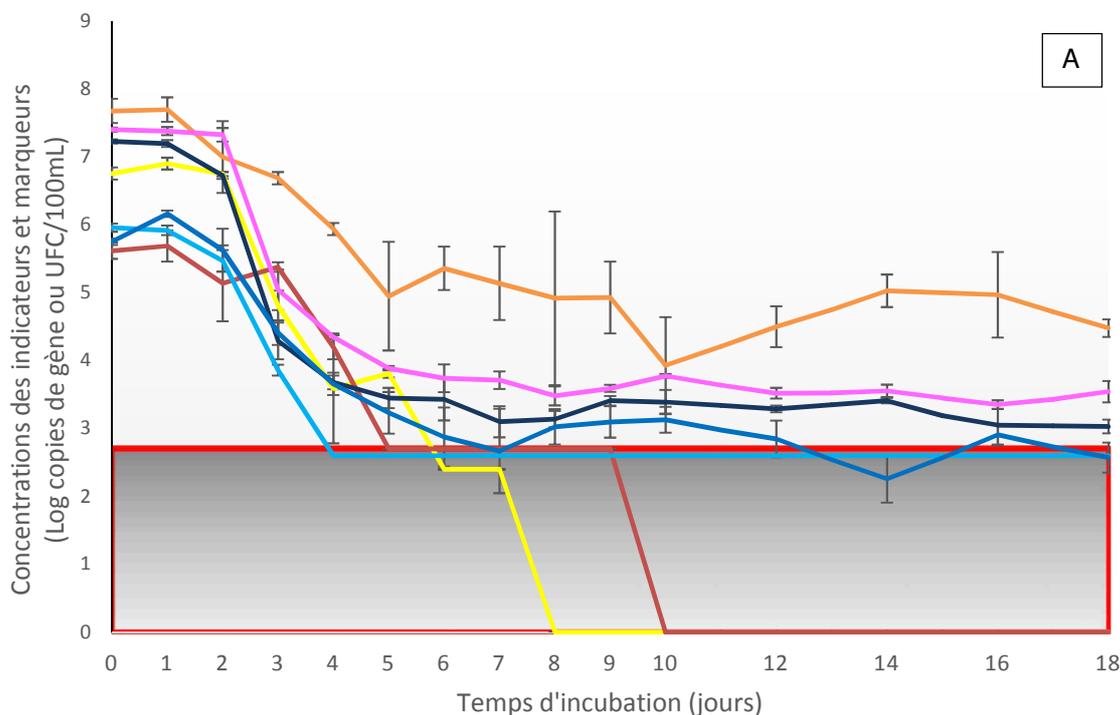
**Figure 14. Courbes de survie d'une population d'*E. coli* issue du mélange d'eau résiduaire urbaine, de bouses de vaches et de fientes de volailles fientes dans des microcosmes d'eau douce (en bleu) et d'eau de mer (en vert) obtenues lors de l'expérimentation n°4. On observe l'évolution de la mortalité des *E. coli* exprimée en  $\text{Log}_{10}$  d'UFC *E. coli* pour 100ml d'eau de microcosme filtrées, sur 18 jours d'expérience. Les valeurs représentées correspondent à la moyenne obtenue pour 3 microcosmes répliques, les barres d'erreur représentent l'écart type.**

Lors de cette expérience, tout comme pour la précédente (contamination par des fientes de volaille) les concentrations en *E. coli* étaient supérieures à celles des entérocoques aussi bien en eau douce qu'en eau de mer tout au long de l'expérience (Figure 14).

#### 6.1.4.3 Persistance des marqueurs moléculaires

Dans les microcosmes d'eau de mer, le marqueur qPCR *Bacteroidales* HF183 est quantifié pendant 5 jours puis détecté mais non quantifié (DNQ) jusqu'au 7<sup>ème</sup> jour (< LQ de 2,4 Log copies de gènes par 100 ml) et le marqueur Ruminant Rum2Bac est quantifié tout au long de l'expérience (jusqu'à T18 j). Concernant les marqueurs aviaires, le marqueur général AV4143 est quantifié tout au long de l'expérience, le marqueur général GFD n'est quantifié que pendant 3 jours, puis détecté mais pas quantifié (< LQ de 2,6 Log copies de gènes par 100 ml) jusqu'à la fin de l'expérience, enfin le marqueur AV43 est quantifié 4 jours puis détecté mais pas quantifié jusqu'au neuvième jour (Figure 15).

Dans les microcosmes d'eau douce, le marqueur qPCR *Bacteroidales* HF183 est quantifié pendant 6 jours puis détecté mais non quantifié jusqu'au 8<sup>ème</sup> jour et le marqueur Ruminant Rum2Bac est également quantifié tout au long de l'expérience. Concernant les marqueurs aviaires, le marqueur général AV4143 est également quantifié tout au long de l'expérience, le marqueur général GFD n'est quantifié que pendant 2 jours, puis détecté mais pas quantifié jusqu'au neuvième jour, enfin le marqueur AV43 est quantifié 3 jours puis détecté mais pas quantifié jusqu'à la fin de l'expérience (Figure 15).



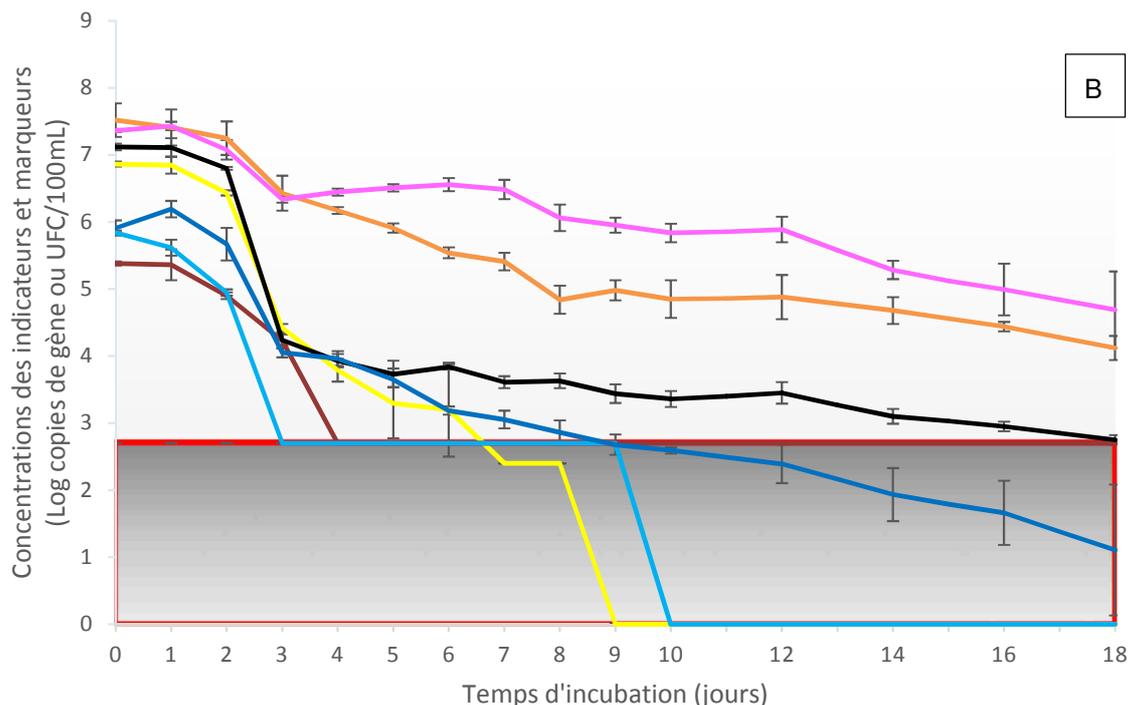


Figure 15. Persistence des indicateurs fécaux (*E. coli* en rose et entérocoques en bleu foncé) et des marqueurs qPCR bactériens Humain (HF183 ; en jaune), Ruminant (Rum2Bac ; en noir), Aviaire Général AV4143 (en vert) et GFD (en bleu clair) et Volaille (en marron) dans l'eau de mer (A) et dans l'eau douce (B) inoculées avec de l'eau résiduaire urbaine, des bouses de vaches et des fientes de volaille. Moyenne de 3 microcosmes pour l'eau de mer contaminées et de 3 microcosmes pour l'eau douce. Les concentrations sont exprimées en UFC pour 100 ml d'eau pour les indicateurs *E. coli* et les entérocoques et en copies de gènes pour 100 ml pour le marqueur HF183. LQ : Limites de quantification des marqueurs HF183, AV43 et GFD respectivement : 2,4 ; 2,70 et 2,60 Log copies de gènes par 100 ml d'eau. La zone grisée correspond aux données inférieures à la limite de quantification du marqueur AV43

La comparaison de la persistance des différents marqueurs moléculaires MST et des indicateurs de contamination fécale (*E. coli* et les entérocoques) a été réalisée en prenant en considération deux principaux critères : le T90 et le temps final de quantification (Tf), temps au-delà duquel un marqueur n'est plus quantifié (Tableau 14).

Tableau 14. Persistance de l'indicateur *E. coli* et des marqueurs moléculaires dans l'expérience de contamination mixte en eau de mer et en eau douce. T90, temps nécessaire pour que 90 % des bactéries ne soient plus cultivables. Tf, temps final de quantification (Tf), temps au-delà duquel un marqueur n'est plus quantifié. Modèle de décroissance utilisé pour les calculs des T90. Durée de la phase initiale de latence. Concentration initiale des marqueurs et d'*E. coli* dans les microcosmes contaminés.

		T90 (Jours)	Tf (Jours)	Modèle de décroissance	Durée de la phase de latence (Jours)	Concentration initiale C <sub>0</sub> (UFC ou copies de gène/100mL)
<b>Eau de mer (EM)</b>						
<i>E. coli</i>		2,5 ± 0,1	18	Biphasique	2	2,5 ± 0,2 .10 <sup>7</sup>
HF 183:	Marqueur Humain	2,4 ± 0,2	5	Biphasique	2	5,7 ± 1,2 .10 <sup>6</sup>
Rum2Bac :	Marqueur Bovin	2,3 ± 0,2	18	Biphasique	2	1,7 ± 0,12 .10 <sup>7</sup>
AV 4143:	Marqueur Aviaire général	2,6 ± 0,17	18	Biphasique	1	4,8 ± 0,2 .10 <sup>7</sup>
GFD:	Marqueur Aviaire général	2,1 ± 0,1	3	1 <sup>er</sup> ordre	1	9,1 ± 1,3 .10 <sup>5</sup>
AV 43:	Marqueur volaille	3,4 ± 0,08	4	1 <sup>er</sup> ordre	0,66	4,2 ± 1,2 .10 <sup>5</sup>
<b>Eau douce (ED)</b>						
<i>E. coli</i>		5,4 ± 1,6	18	Biphasique	1,3	2,3 ± 0,1 .10 <sup>7</sup>
HF 183:	Marqueur Humain	2,4 ± 0,2	6	Biphasique	2	5,3 ± 0,6 .10 <sup>6</sup>
Rum2Bac :	Marqueur Bovin	2,5 ± 0,3	18	Biphasique	2	1,3 ± 0,15 .10 <sup>7</sup>
AV 4143:	Marqueur Aviaire général	3,9 ± 0,2	18	Biphasique	2	3,3 ± 1,7 .10 <sup>7</sup>
GFD:	Marqueur Aviaire général	2,4 ± 0,03	2	1 <sup>er</sup> ordre	0	6,9 ± 0,48 .10 <sup>5</sup>
AV 43:	Marqueur volaille	2,8 ± 0,4	3	1 <sup>er</sup> ordre	0,66	2,4 ± 0,16 .10 <sup>5</sup>

Dans nos conditions expérimentales, si on considère le T90 des marqueurs MST vs *E. coli*, des valeurs similaires sont obtenues dans l'eau de mer et des valeurs plus faibles pour les marqueurs MST vs *E. coli* dans l'eau douce. Considérant le temps final (Tf), *E. coli* ainsi que les marqueurs Aviaire général (AV4143) et Ruminants (Rum2Bac) persistent pendant toute la durée de l'expérimentation, à la fois dans l'eau de mer et dans l'eau douce. Les marqueurs Aviaire général (GFD), Volaille (AV43), et Humain (HF183) persistent moins longtemps, à la fois dans l'eau de mer et dans l'eau douce. Les marqueurs qPCR Aviaires ont des profils de persistance différents selon le marqueur considéré (à la fois dans l'eau de mer et dans l'eau douce). Ce résultat pourrait s'expliquer par le fait que les concentrations du marqueur AV4143 sont généralement plus élevées que celles des marqueurs GFD et AV43 dans les fientes de volailles françaises (voir 5.3).

#### 6.1.4.4 Persistance des génotypes ERIC – PCR d'*E. coli* (microcosmes eau de mer)

Dans les microcosmes d'eau de mer, un total de 360 isolats ont été sélectionnés (isolements réalisés à cinq temps de l'expérience : T0, T1, T4, T10 et T14) et identifiés à l'espèce *E. coli* par MALDI-TOF (Figure 16).

##### Isolement et identification des génotypes *E. coli* (ERIC-PCR)

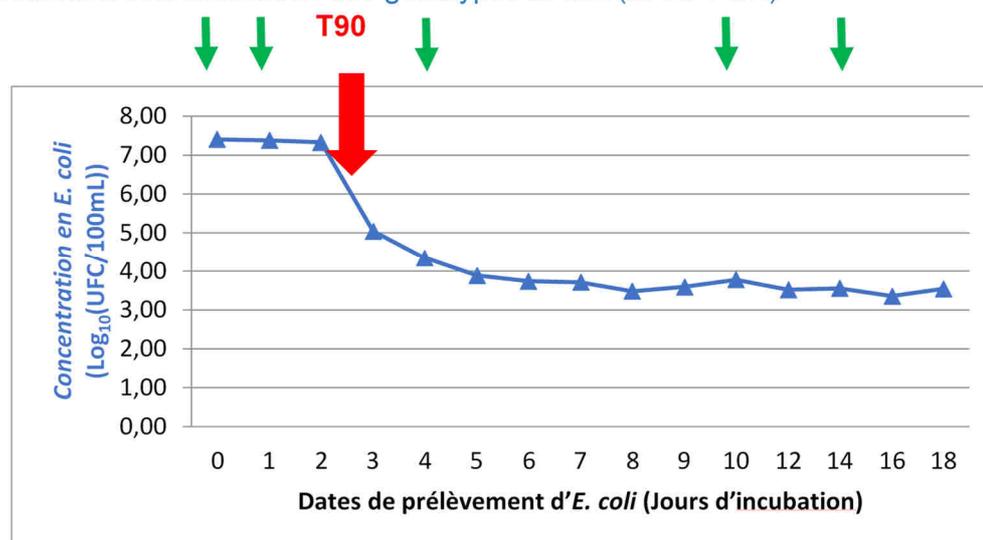


Figure 16. Courbe moyenne de survie d'une population d'*E. coli* issue d'une contamination mixte (eau résiduaire urbaine, bouses de vaches et fientes de volaille) dans des microcosmes d'eau de mer. Evolution de la concentration des *E. coli* exprimée en Log<sub>10</sub> d'UFC *E. coli* pour 100 ml d'eau de microcosme filtrées, sur 18 jours. Temps auxquels ont été isolés et génotypés une sélection d'isolats *E. coli* (flèches vertes).

Ces isolats ont été génotypés par ERIC PCR. Les 360 profils ERIC de ces isolats ont été comparés par calcul du coefficient de corrélation de Pearson et hiérarchisés par construction d'un dendrogramme UPGMA. Les profils ERIC partageant au moins 73,9 % de similarité de Pearson sont définis comme appartenant à un même génotype. Ce seuil est déterminé grâce au génotypage simultané de 24 témoins positifs WDCM00012 intercalés dans les microplaques avec ces isolats. A l'issue de cette analyse, 62 génotypes différents ont été déterminés.

Trois patrons temporels de persistance des génotypes ont été établis à partir du T90 (2,5 jours ; Figure 17) :

- PERMANENT (maintien) : les génotypes sont retrouvés tout au long de l'expérience
- PRE-T90 (disparition rapide) : les génotypes ne sont présents que dans la première partie de l'expérience au temps T0 et T1
- POST-T90 (détection tardive) : les génotypes ne sont présents qu'à partir du T4 (Figure 17).

		EM_contamination mixte						
		N°Génotype	0j	1j	4j	10j	14j	Nb d'isolats
PERMANENT	70	5		23	20	28		76
	72	17	8	2	4	1		32
	104	1	3		3			7
	51	2	1	1				4
	77		1		2			3
	95		1		1			2
	64	3	4	12	12	6		37
	1	1		6	15	12		34
	8	6	5	3	3	8		25
	52	4	4	14				22
	86	6	6		1	1		14
	63	2	6	4				12
	2		5	2	2			9
	53	2	2				1	5
	48		1	1	1		1	4
66		2				1	3	
31	1	2				1	2	
POST T90	88			2		3		5
	71					1		1
	84					1		1
	55					1		1
	60					1		1
	87					1		1
	56				1			1
	16				1			1
	23				1			1
	29				2			2
	33				1			1
	35				1			1
	38				1			1
	42				1			1
	5			1		1		1
22			1				1	
69			1				1	
110			1				1	
4						7	7	
3			3	3			6	
107			1	1		1	3	
50						2	2	
43						1	1	
46						1	1	
PRE T90	12	1						1
	24	1						1
	37	1						1
	75	1						1
	82	1						1
	83	1						1
	101	1						1
	109	1						1
	111	1						1
	9		1					1
	10		1					1
	17		1					1
	19		1					1
	25		1					1
	57		1					1
81		1					1	
7	2	1					3	
61	1	2					3	
102	2						2	
97	1						1	
59		1					1	
Nb d'isolats		65	60	78	77	80		360

Figure 17. Classement des génotypes isolés dans les microcosmes d'eau de mer selon leur persistance dans le temps. Les numéros de génotypes dans les cases blanches correspondent aux génotypes que l'on retrouve à la fois dans l'eau douce contaminée et dans l'eau de mer contaminée. Tandis que les génotypes dans les cases bleues correspondent aux génotypes spécifiques de l'eau de mer. La Heat Map est divisée en 3 sections : 1) Permanents : correspond aux génotypes présents tout au long de l'expérience 2) Post T90 : génotypes qui apparaissent après le T90 et 3) Pré T90 : génotypes qui disparaissent avant le T90

La répartition des génotypes tout au long de l'expérience est présentée sur la Figure 18. Les isolats détectés dans l'eau de mer avant ajout de la source de contamination mixte ont été écartés de l'analyse (« Discarded »). Deux fractions minoritaires de la population incluant des isolats assignés à des génotypes

- pré-T90: sous-populations disparaissant rapidement
- post-T90: sous-populations restantes (qui pourraient être révélées par le déclin des Pré-T90)

sont observées.

La majorité de la population (3/4) persiste pendant toute l'expérimentation (Figure 18). Il s'agit des génotypes permanents.

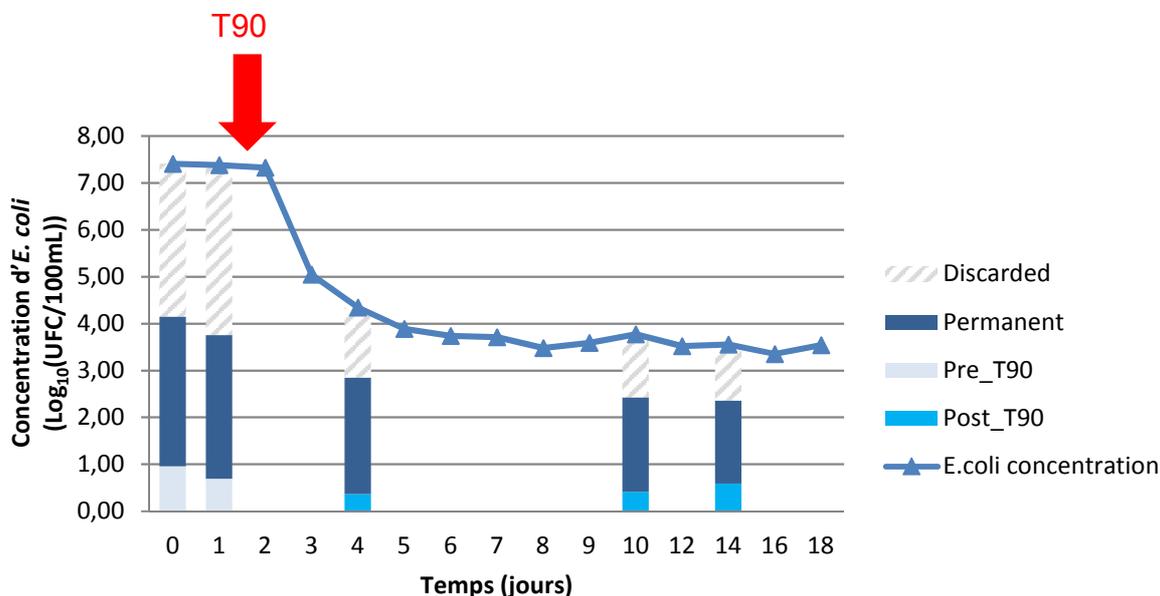


Figure 18. Répartition des génotypes isolés au cours de l'expérience de contamination mixte en microcosme d'eau de mer selon trois profils permanents (bleu foncé), pré-T90 (bleu clair) et post-T90 (bleu moyen).

Des résultats similaires sont observés dans les microcosmes d'eaux douces avec une contamination mixte et dans les microcosmes contaminés par une seule source de contamination.

### 6.1.5 Conclusion sur les études de persistance

Cette série d'expérimentation nous a permis de simuler des conditions variables (Tableau 15). Différentes sources de contamination ont été étudiées en utilisant des eaux résiduaires urbaines (source fécale humaine), des suspensions de bouses de vache (source fécale bovine) ou de fientes de volaille (source fécale aviaire). Indirectement, cela nous a également permis de simuler différentes intensités de contamination comme le montrent les concentrations en *E. coli* exprimées en UFC/100 ml (Tableau 15). Les conditions physico-chimiques ont également varié sur le plan de la salinité (eau douce, eau de mer) et de la richesse en nutriments (concentration en COT par exemple).

**Tableau 15. Comparaison des conditions de persistance testées dans des microcosmes d'eau douce ou marine contaminés par des sources fécales variées. MES : matières en suspension, COT : carbone organique total.**

Source fécale	Salinité (g/l)	MES (mg/l)	COT (mg/l)	<i>E. coli</i> (UFC/100 ml)	Marqueur qPCR bactériens (copies de gènes / 100 ml)				
					HF183	Rum2Bac	AV43	GFD	AV4143
Humaine	0	22	8,9	4,41 10 <sup>5</sup>	4,0 10 <sup>7</sup>				
Bovine	0	118	49,9	1,74 10 <sup>5</sup>		1,0 10 <sup>7</sup>			
Aviaire	0	135	33,1	3,33 10 <sup>7</sup>			2,5 10 <sup>6</sup>	4,5 10 <sup>6</sup>	3,0 10 <sup>6</sup>
Mixte	0	41	11,5	2,31 10 <sup>7</sup>	5,3 10 <sup>6</sup>	1,3 10 <sup>7</sup>	2,4 10 <sup>5</sup>	6,9 10 <sup>5</sup>	3,3 10 <sup>7</sup>
Humaine	35	21	5,1	3,85 10 <sup>5</sup>	3,0 10 <sup>7</sup>				
Bovine	35	159	50,7	2,58 10 <sup>5</sup>		1,2 10 <sup>8</sup>			
Aviaire	35	145	49,5	3,38 10 <sup>7</sup>			3,7 10 <sup>6</sup>	1,0 10 <sup>7</sup>	8,0 10 <sup>7</sup>
Mixte	35	46	15,4	2,55 10 <sup>7</sup>	5,7 10 <sup>6</sup>	1,7 10 <sup>7</sup>	4,2 10 <sup>5</sup>	9,1 10 <sup>5</sup>	4,8 10 <sup>7</sup>

Au cours de ces expérimentations, nous avons essayé d'avoir des concentrations proches en marqueurs qPCR bactériens en début d'expériences (au T0).

Pour les 3 premières expériences, elles ont varié de 2,5 10<sup>6</sup> copies de gènes par 100 ml pour le marqueur AV43 (microcosme eau douce/ fientes de volaille) à 1,2 10<sup>8</sup> copies de gènes pour le marqueur Rum2Bac (microcosme eaux de mer / bouses de vaches) tandis que les concentrations en *E. coli* variaient de 1,7 10<sup>5</sup> UFC par 100 ml d'eau (microcosme eaux douces / bouses de vaches) à 3,38 10<sup>7</sup> UFC par 100 ml d'eau (microcosme eaux de mer / fientes de volaille ; Tableau 15). Ces résultats montrent un rapport concentrations en *E. coli* / concentrations en marqueurs bactériens qPCR différent au T0 selon la source de contamination apportée dans les microcosmes d'eau. A l'exception de ceux contaminés par les fientes de volaille, les microcosmes se caractérisent par des concentrations initiales en marqueurs moléculaires supérieures aux concentrations des indicateurs fécaux comme *E. coli* au T0 (Tableau 15). Les fientes de volaille présentaient des concentrations en *E. coli* beaucoup plus fortes que les bouses de vaches. Par exemple, les fientes de volaille apportées dans les microcosmes de la contamination mixte présentaient des concentrations en *E. coli* de 4,3 10<sup>8</sup> UFC par g de fèces tandis que les bouses de vaches présentaient des concentrations de 9,3 10<sup>4</sup> UFC par g de fèces. Des concentrations initiales en marqueurs moléculaires supérieures aux concentrations en indicateurs fécaux ont été également observées dans les études d'évaluation de la persistance de *E. coli* et des marqueurs moléculaires MST (Korajkic et al, 2019 ; Balleste et al 2018 ; Jeanneau et al 2012).

Pour l'expérience de contamination mixte, les concentrations des marqueurs qPCR bactériens ont varié de 2,4 10<sup>5</sup> copies de gènes par 100 ml pour le marqueur AV43 (microcosme eau douce) à 4,8 10<sup>7</sup> copies de gènes pour le marqueur AV4143 (microcosme eaux de mer) tandis que les concentrations en *E. coli* variaient de 2,3 10<sup>7</sup> UFC par 100 ml d'eau (microcosme eaux douces) à 2,55 10<sup>7</sup> UFC par 100 ml d'eau (microcosme eaux de mer ; Tableau 15).

Les conditions recréées au cours de cette expérimentation ont influencé la survie des populations de bactéries associées aux matières fécales utilisées pour contaminer les microcosmes d'eau douce et d'eau de mer. On peut le constater à partir des T90 calculés pour les populations d'*E.*

*coli* suivies au cours de ces expériences. Comme on pouvait s'y attendre, la survie des populations d'*E. coli* paraît moins bonne en eau de mer qu'en eau douce, sauf pour la population d'*E. coli* issue de fientes de volaille (si on prend en compte le T90). Il semble également que la survie soit meilleure quand le milieu est enrichi par les nutriments contenus dans les matières fécales (cas des sources bovine et aviaire notamment).

L'étude réalisée permet de préciser les conditions de la persistance des indicateurs de contamination comme *E. coli*. Quelle que soit la source de contamination (contamination mixte ou contamination par une source unique) et l'environnement (eau douce ou eau de mer), le même patron de persistance d'isolats d'*E. coli* qualifiés de permanents est observé. Les populations d'*E. coli* correspondant à ces génotypes permanents sont dominantes (> 60% d'abondance relative) et leur abondance relative tend à augmenter au cours de la persistance, notamment dans l'eau douce. Ces résultats rejoignent les observations faites sur la collection de références de BacTrac1 (isolats d'*E. coli* de matières fécales) ainsi que les conclusions d'une étude réalisée sur une collection environnementale (isolats d'*E. coli* d'eaux, sols ; Lyautey et al., 2010) : une très grande proportion des isolats d'*E. coli* correspondent à des génotypes ubiquistes. L'ensemble des résultats obtenus pour les marqueurs moléculaires au cours de ces quatre expériences montrent que, dans nos conditions expérimentales, les marqueurs Ruminant (Rum2Bac) et Aviaire général (AV4143) sont les marqueurs qui ont persisté le plus longtemps (en contamination simple et en contamination mixte). Le marqueur Aviaire général GFD a persisté plus longtemps en contamination simple qu'en contamination mixte ; il faut toutefois signaler que les concentrations initiales du marqueur GFD en contamination simple (fientes de volaille uniquement ; mars 2018) étaient environ 10 fois plus importantes qu'en contamination mixte (fientes collectées en juin 2018). Enfin, les marqueurs Humain (HF183) et Volaille (AV43) ont présenté des persistances plus faibles dans les contaminations simples et mixtes : quantifications du marqueur HF183 pendant 5 à 7 jours et du marqueur AV43 pendant 3 à 9 jours. Dans les deux expériences impliquant des fientes de volaille, les marqueurs, du plus persistant au moins persistant, étaient le marqueur AV4143, le marqueur GFD et le marqueur AV43. Il faut aussi souligner que les concentrations du marqueur AV4143 étaient supérieures dans les fientes de volaille apportées comme nous l'avons observé également pour les fientes de volaille analysées en Bretagne ou Nouvelle Aquitaine dans ce projet (Gourmelon et al., 2019).

## 7 Etude de cas par la trousse BacTrac

### 7.1 Echantillonnage : critères de sélection, choix des stations, stratégie et modalités

#### 7.1.1 Généralités sur les bassins versants sélectionnés pour échantillonnage

L'objectif étant de développer une méthodologie applicable sur une large palette de sites, 5 bassins versants, différant par leur surface, leur occupation des sols, leur morphologie, leur fonctionnement hydrologique et leurs sources de contamination potentielles, ont été retenus : les

bassins versants de l'Untxin, de l'Uhabia, de l'Adour, de la Nive et le Bassin d'Arcachon (Tableau 16). La méthodologie finale sera ainsi mise au point sur une grande diversité de cas de figure et permettra de comprendre les paramètres et contraintes à prendre en compte en fonction des spécificités de chaque site atelier.

**Tableau 16. Tableau récapitulatif des caractéristiques générales de chaque bassin versant (source : SIE Adour Garonne).**

Bassin versant	Surface (km <sup>2</sup> )	Longueur fleuve (km)	Nombre d'affluents /confluents	Temps de lessivage estimé (h)	% occupation du sol					Sources potentielles générales de contamination			
					Territoire artificialisé	Territoire agricole	Forêt et milieux naturels	Zone humide	Surface en eau	Humaine	Agricole	Aviaire	Domestique
Untxin	34	9,4	6	3	16,88	54,79	30,06	0,64	0	X	X		X
Uhabia	79	15,1	15	3	35,09	39,87	25,32	0,32	0	X	X	X	X
Adour	16912	307,1	213	dépend des affluents et BV associés	3,11	48,91	47,66	0,03	0,29	X	X	X	X
Nive	988	78,9	89	12 à 15	2,62	29,82	67,57	0	0	X	X		
Bassin d'Arcachon canal des Landes	438	29,3	13	/	12,62	8,5	65,38	0,65	12,87	X	X	X	X

Sur chaque bassin versant, les sources potentielles de contamination ont été identifiées en prenant en compte les profils de baignade des sites d'intérêt et les cartographies d'occupation du sol et infrastructurales, fournis par les collectivités gestionnaires (Tableau 17).

Tableau 17. Tableau récapitulatif des sources de contamination potentielles sur chaque bassin versant.

Nom du bassin versant	Site de baignade d'intérêt BacTrac	Sources de pollution potentielles identifiées (profils de baignade et informations collectivités)	Vulnérabilité
Untxin	Ciboure, Plage de Ciboure	* Risques modérés : - Poste de refoulement - 2 stations d'épuration - 2 déversoirs d'orage - bassin de stockage * Risque faible : - 9 postes de refoulement - 3 déversoirs d'orage - 4 bassins de stockage	Pluie >5mm Conditions de marée Vent d'ouest Nord Ouest Rejets d'eau douce
Uhabia	Bidart, Uhabia sud	* Risques significatifs : - rejets eaux usées dans Uhabia - poste de relèvement - branchement assainissement - assainissement non connecté - agriculture et élevage - décharge à ciel ouvert (oiseaux marins et rapaces) * Risque faible : - fréquentation touristique - installations industrielles	Débit de l'Uhabia Pluie
Adour	Anglet, Plage de la Barre	* Risque significatif : - apports du bassin versant * Risque modéré : - réseau d'assainissement	Pluie Moyen à fort débit de l'Adour
Nive	Sans objet	* Risque significatif : - agriculture et élevage - branchement assainissement - assainissement non connecté	Pluie Rejets des affluents
Bassin d'Arcachon	La Hume	* Risque significatif : - Assainissement non connectés - Elevages de canards	Pluie

## 7.1.2 Choix et emplacement des stations de prélèvement

### 7.1.2.1 Critères de choix des stations

Plusieurs critères ont été pris en compte afin de définir l'emplacement définitif de chaque station pour chaque bassin versant.

- Pour la mise au point et l'évaluation des performances strictement techniques de chacun des marqueurs de la trousse à outils, des points impactés par une source unique ou en tout cas par une source majoritaire ont été retenus. En effet; ces points permettent d'évaluer la cohérence des résultats ainsi que la sensibilité de réponse de chaque marqueur sur sa propre source. Ces stations ont été utilisées pour évaluer la sensibilité diagnostique de marqueurs (voir 7.2.1).

- Pour la mise au point de l'utilisation de la trousse à outils multimarqueurs, des points impactés par diverses sources ont également été pris en compte, ceci afin d'évaluer le bon fonctionnement,

l'applicabilité et la complémentarité de tous les marqueurs confondus. La possibilité d'accéder à des proportions de sources de contamination au sein d'un échantillon sera également évaluée à ce niveau.

- Quelques stations pas ou peu contaminées, choisies en tant que référence, permettront d'évaluer la sensibilité de la trousse à outils (bruit de fond).

- Pour l'application de la boîte à outils sur cas réels, « à l'aveugle », un point dont l'origine reste inexplicée a été fixé.

L'ensemble de ces stations, montrant des sources potentielles de contamination diverses, majoritaires ou diffuses, permettront ainsi de mettre au point (i) chaque marqueur individuellement, (ii) la trousse à outil dans son ensemble et (iii) les critères d'applicabilité de la méthode.

### 7.1.2.2 Choix des stations par bassin versant

- Bassin versant de l'Adour

Six stations ont été sélectionnées en fonction des sources potentielles de contamination identifiées sur la zone (Tableau 18).

**Tableau 18. Tableau récapitulatif des stations sélectionnées sur le bassin versant de l'Adour.**

Station	Coordonnées GPS (Lambert 93)	Sources potentielles de contamination	Critères de choix pour la mise au point de la boîte à outil BacTrac
AD-REF (Pont de Pitres à Urt)	X : 352656,49 Y : 6276094,14	i/ Apport du bassin versant ii/ Epandages ponctuels iii/ Zone agricole	Amont des autres stations
AD-1 (Embarcadère CCI)	X : 340326,60 Y : 6275152,72	i/ Zone urbaine ii/ STEP de Mouguerre	Multisources (apports bassin versant) agricole/humain
AD-2 (Pont St Frédéric)	X : 339124,47 Y : 6275579,37	i/ Zone urbaine ii/ STEP de St Frédéric	Source majoritaire : humaine
AD-3 (Embarcadère CCI Port)	X : 336326,26 Y : 6279824,69	i/ Zone urbaine ii/ STEP St Bernard, Pont de l'Aveugle, St Frédéric et Mouguerre en amont	Source majoritaire : humaine
AD-4 (Plage de La Barre)	X : 334370,75 Y : 6280295,07	i/ Zone urbaine ii/ STEP en amont iii/ Lors de crues, rejets de l'Adour iv/ Activités de charriage	Source majoritaire : humaine
NIV-AD (Pont du génie)	X : 338059,90 Y : 6275684,74	i/ Zone urbaine ii/ Apports du bassin versant de la Nive	i/ Multisources (agricole/humain) ii/ Apports de la Nive dans l'Adour

La Figure 19 montre l'emplacement des points de prélèvements d'eau ainsi que les sources potentielles à risque significatif.

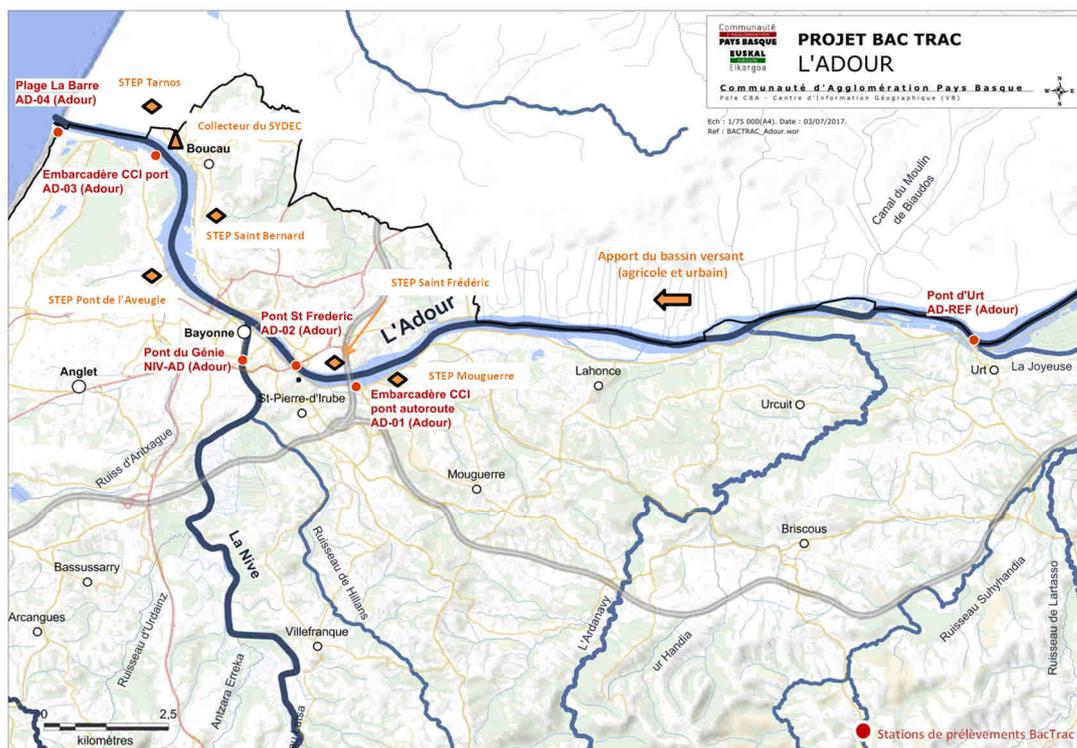


Figure 19. Cartographie des stations d'échantillonnage et des sources potentielles de contamination présentant un risque significatif sur la partie du bassin versant de l'Adour d'intérêt dans le projet.

- Bassin versant de l'Untxin

Quatre stations ont été sélectionnées en fonction des sources potentielles de contamination et une a été retenue en tant que référence donc peu contaminée. Le Tableau 19 répertorie les différentes stations.

Tableau 19. Tableau récapitulatif des stations sélectionnées sur le bassin versant de l'Untxin.

Station	Coordonnées GPS (Lambert 93)	Sources potentielles de contamination	Critères de choix pour la mise au point de la boîte à outil BacTrac
UNT-REF (référence)	X : 318333,28 Y : 6260927,78	i/ Aucune ii/ Epandage rare et ponctuel	Station très peu contaminée => « blanc » analytique, bruit de fond
UNT-1 (Amont seuil Urtubie)	X : 319682,63 Y : 6263013,76	i/ Assainissement collectif ii/ Poste de déversement en amont iii/ Activité agricole bovine	i/ Amont des 3 autres stations ii/ Multisources (humain/agricole)
UNT-2 (Lizzaragua)	X : 320167,41 Y : 6263385,50	i/ Assainissement non collectif ii/ Champs de pâture (20aine de bovins) iii/ Ferme (élevage volailles et bovins)	Multisources (humain/agricole)
UNT-3 (Aggoreta)	X : 320210,60 Y : 6264097,68	i/ Camping ii/ Lac avec activités de loisir iii/ Exploitation agricole avec installations vétustes (bovins)	Multisources (humain/agricole)

Station	Coordonnées GPS (Lambert 93)	Sources potentielles de contamination	Critères de choix pour la mise au point de la boîte à outil BacTrac
UNT-4 (plage de Socoa)	X : 320540,58 Y : 6265794,68	i/ Fin de parcours de l'Untxin ii/ Forte activité humaine en période touristique	Baignade

La Figure 20 cartographie les stations de prélèvements ainsi que les risques de contamination répertoriés et considérés comme à risque significatif.



Figure 20. Cartographie des stations d'échantillonnage et des sources potentielles de contamination présentant un risque significatif sur le bassin versant de l'Untxin.

- Bassin versant de l'Uhabia

Sept stations ont été sélectionnées en fonction des sources potentielles de contamination. Le Tableau 20 répertorie les différentes stations.

**Tableau 20. Tableau récapitulatif des stations sélectionnées sur le bassin versant de l'Uhabia.**

Station	Coordonnées GPS (Lambert 93)	Sources potentielles de contamination	Critères de choix pour la mise au point de la boîte à outil BacTrac
UHA-REF (au sein de la décharge à ciel ouvert)	X : 329504,22 Y : 6264479,10	i/ 1000 goélands et 150 cigognes présentes sur le site ii/ Déchets ménagers compactés et alvéolés mis sous bâches	i/ Point décharge ii/ Source majoritaire : aviaire
UHA-1 (aval décharge)	X : 329348,74 Y : 6266267,26	i/ 1000 goélands et 150 cigognes présentes sur le site ii/ Quelques bovins présents en amont	i/ Aval de la décharge ii/ Source majoritaire : aviaire iii/ Blanc analytique humain
UHA-2 (Lamissolako)	X : 329496,53 Y : 6268034,31	i/ Elevage de chevaux espagnols ii/ Centre équestre iii / Poste de relèvement et de récupération des eaux usées d'Ahetze avant envoi sur STEP de Bidart	Multisources (équien, humain)
UHA-3 (Alhorga aval)	X : 330741,21 Y : 6269560,38	i/ Assainissement collectif ii/ Zones d'agriculture à proximité	Multisources (humain, agricole)
UHA-4 (Pont ASF)	X : 329653,90 Y : 6269966,87	i/ Zone industrielle ii/ Ancienne décharge recouverte	Source majoritaire : humain
UHA-5 (Uronea)	X : 328459,09 Y : 6269885,34	i/ Ruisseau de source non précisée se jetant dans l'Uhabia ii/ Constat de fortes contaminations depuis 2016. iii/ A proximité, STEP de Bidart, bassin de rétention, habitations	Contamination inexplicée
UHA-6 (Gaxonenia)	X : 327840,72 Y : 6269985,54	i/ A priori, humaine ii/ Proche embouchure plage de Bidart	Contamination inexplicée
UHA-7 (Plage Uhabia sud)	X : 327473,02 Y : 6270010,02	i/ Fin de parcours de l'Uhabia ii/ Zone touristique en été	Baignade

La Figure 21 cartographie les stations de prélèvements ainsi que les risques de contamination répertoriés et considérés comme à risque significatif.

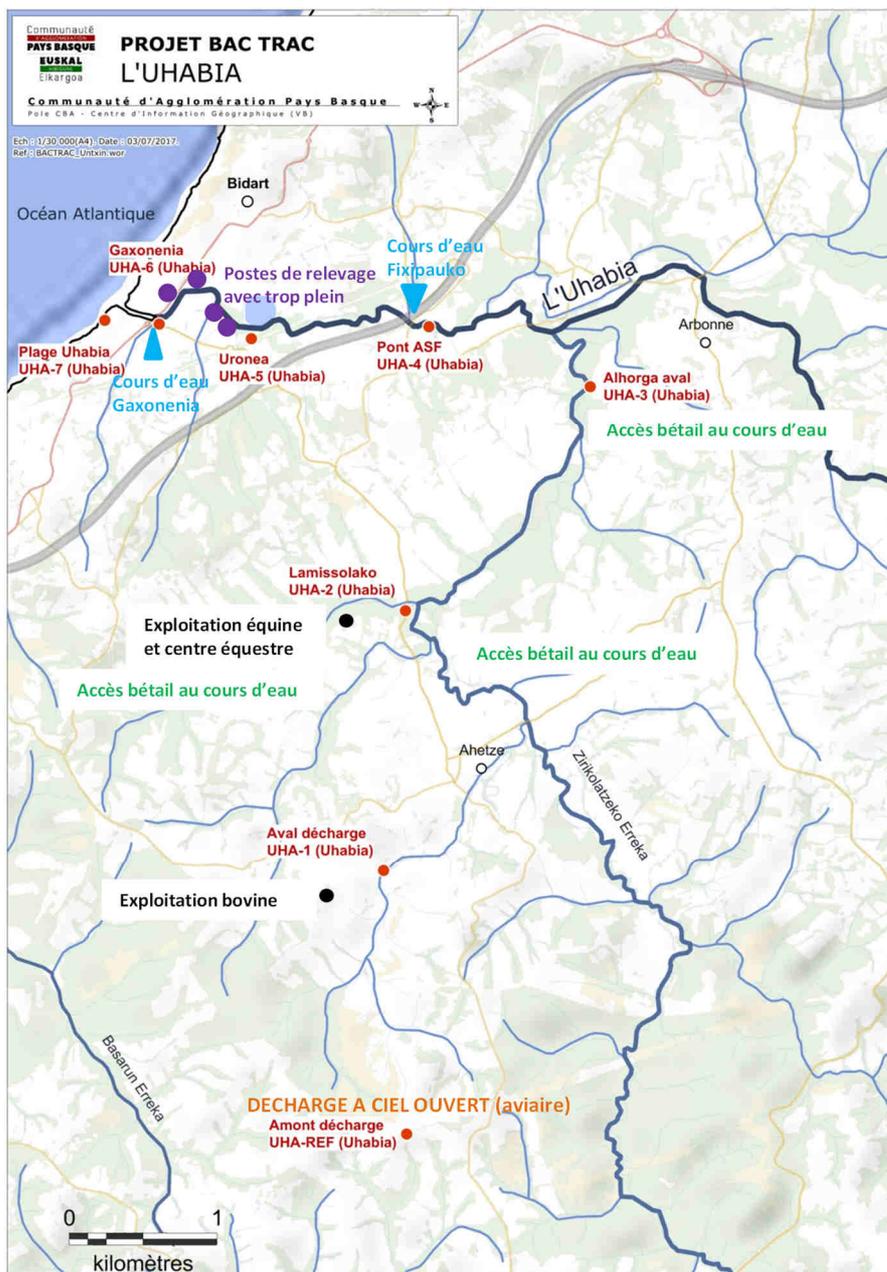


Figure 21. Cartographie des stations sur le bassin versant de l’Uhabia et sources de contamination potentielles identifiées.

- Bassin versant de la Nive

Huit stations ont été sélectionnées en fonction des sources potentielles de contamination identifiées sur la zone (Tableau 21). Une seule station est située sur la Nive, les autres étant sur des affluents à risque.

Tableau 21. Tableau récapitulatif des stations sélectionnées sur le bassin versant de la Nive.

Station	Coordonnées GPS (Lambert 93)	Sources potentielles de contamination	Critères de choix pour la mise au point de la boîte à outil BacTrac
NIV-1 (Lasse 1, Nive d'Arnéguy)	X : 352554,90 Y : 6235082,40	i/ Fortes contaminations constatées depuis 2016 ii/ Elevages de bovins et ovins iii/ Rejet de lisier	Source majoritaire : agricole
NIV-2 (Lasse 2, Nive d'Arnéguy))	X : 352671,54 Y : 6235378,60	i/ Elevages bovins et ovins ii/ Rejet de lisier iii/ Ventas iv/ Assainissement non collectif	Multisources : humain et agricole
NIV-3 (Banca, Nive des Aldudes)	X : 343203,80 Y : 6234877,68	i/ Forte activité agricole ii/ 3000 porcs basques (Kintoa, Pie noir) iii/ Quelques élevages ovins	Source majoritaire : agricole (porc)
NIV-4 (Irrissary, Lakako Erreka)	X : 354850,87 Y : 6249489,74	i/ Elevages de canards ii/ Quelques élevages ovins/bovins	Source majoritaire : agricole (canards)
NIV-5 (Ossès, Lakako Erreka)	X : 350976,39 Y : 6247113,05	i/ Elevages de canards ii/ Elevages ovins/bovins iii/ Maisons isolées assainissement non connectées	Source majoritaire : agricole
NIV-6 (Macaye, La Mouline)	X : 348275,04 Y : 6255597,40	i/ Elevages de bovins et ovins	Amont STEP Louhossoha
NIV-7 (Louhossoa, La Mouline)	X : 346940,13 Y : 6255514,90	i/ STEP Louhossoa (travaux de mise aux normes prévus en 2018)	Source majoritaire : humain
NIV-8 (Ustarritz, Nive)	X : 339424,73 Y : 6264948,63	i/ Elevages ii/ STEP iii/ Rejets ANC	i/ Seule station située sur la Nive ii/ Point de convergence des contaminations provenant des autres stations iii/ Multisources

La Figure 22 cartographie les stations de prélèvements ainsi que les risques de contamination répertoriés et considérés comme à risque significatif.

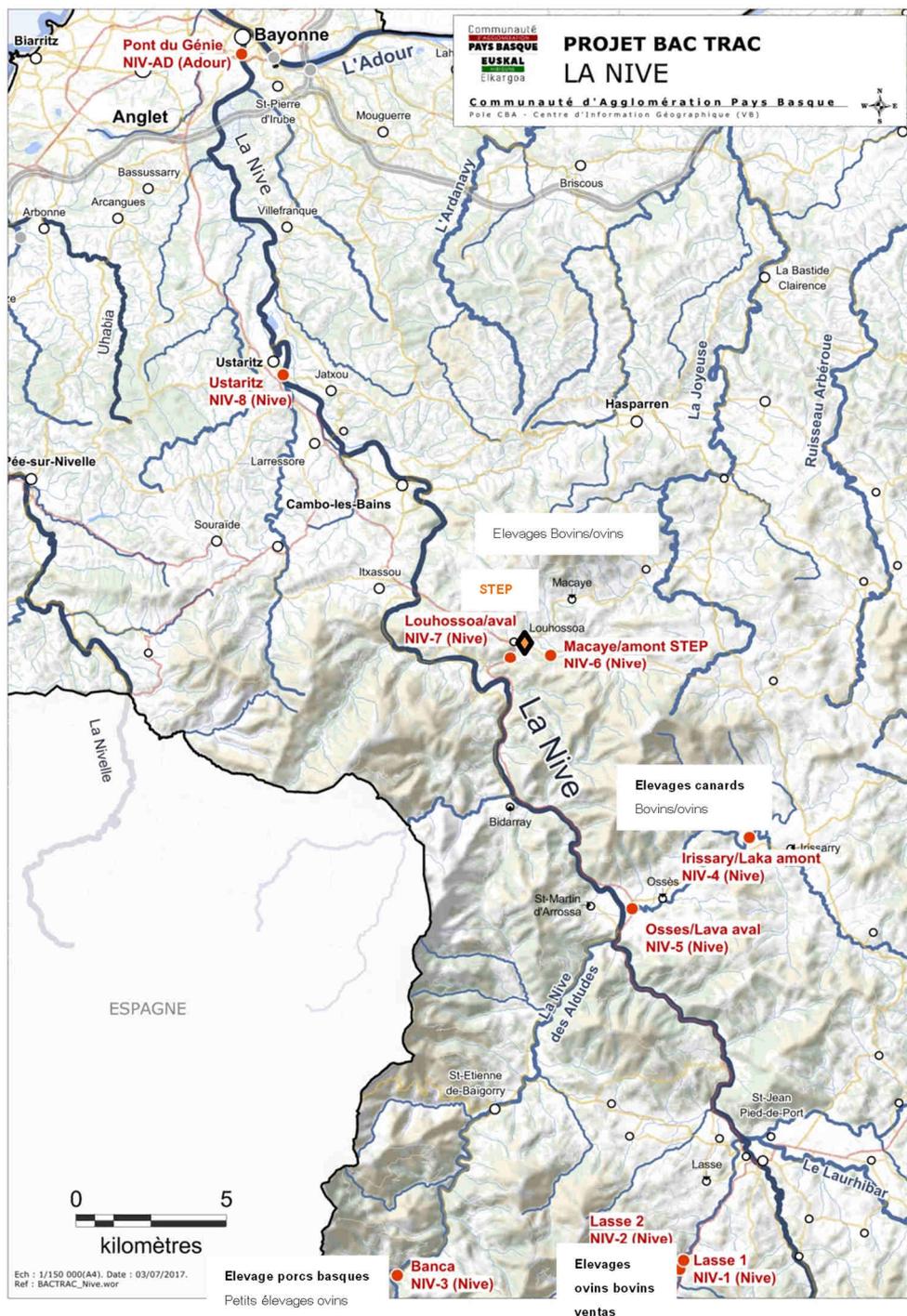


Figure 22. Cartographie des stations sélectionnées sur le bassin versant de la Nive et sources potentielles de contamination identifiées.

- Bassin d’Arcachon

Le choix des stations et les prélèvements sont assurés par le SIBA (Tableau 22). Trois stations ont été sélectionnées autour du canal des Landes, cours d’eau artificiel de 20 km de long et reliant le lac de Cazaux et le lac de Parentis au bassin d’Arcachon, et montrant des épisodes de contamination ponctuels : La Hume, le Canal des Landes et la Craste de Nezer.

Tableau 22. Tableau récapitulatif des stations sélectionnées sur le bassin d’Arcachon.

Station	Coordonnées GPS (Lambert 93)	Sources potentielles de contamination	Critères de choix pour la mise au point de la boîte à outil BacTrac
Canal des Landes	X : 373639,85 Y : 6401778,33	i/ Assainissement non connectés ii/ Elevages de canards	Multisources + se jette au niveau de la baignade de la Hume
Craсте de Nezer	X : 373511,26 Y : 6401879,53	Assainissement non connectés	Se jette au niveau de la baignade de la Hume
La Hume	X : 373636,40 Y : 6402538,12	Apports du canal des Landes	Seule baignade qui ne soit pas classée en excellente qualité

La Figure 23 cartographie les stations de prélèvements sur le Bassin d’Arcachon.



Figure 23. Cartographie des stations sélectionnées sur le Bassin d’Arcachon.

### 7.1.3 Plan d’échantillonnage

L’objectif est d’obtenir un large panel de situations climatiques et hydrologiques afin d’évaluer la robustesse de la méthode BacTrac et l’impact de ces différentes situations sur les épisodes de contaminations et les résultats qui en découlent. Le seuil minimum de contamination pour lequel la méthodologie est applicable sera défini à partir de l’ensemble des données générées. En effet, ce paramètre est indispensable pour la cohérence des résultats d’identification des sources de contamination car, comme toute méthode analytique, la méthode montre une limite de détection en dessous de laquelle est analysé un bruit de fond et non pas une contamination.

Quatre situations climatiques et hydrologiques ont été sélectionnées : 3 tranches de pluviométrie différentes (2-10 mm/24h, 10-25 mm/24h, >25 mm/24h), une situation de hautes eaux (période au cours de laquelle les hauteurs d'eaux sont maximales/spécifique à chaque cours d'eau), une situation de basses eaux (période au cours de laquelle les hauteurs d'eaux sont minimales/spécifique à chaque cours d'eau) et une situation de temps sec. Ce dernier point est défini par un relevé de 0 mm sur les 72 dernières heures et/ou <2 mm sur 5 jours consécutifs. Neuf campagnes d'échantillonnage ont été définies et sont répertoriées dans le Tableau 23. Le Bassin d'Arcachon est un cas particulier car il ne montre que de rares épisodes de contamination au-dessus de 500 *E coli*/100 ml, ce qui, par expérience acquise dans le cadre du projet IDFEC, peut être trop faible pour obtenir un résultat cohérent. De même à Ifremer, une recherche de marqueurs dans les eaux présentant des concentrations en *E. coli* au-dessus de 500 *E coli*/100 ml a été recommandée selon les résultats acquis précédemment sur des bassins versants (Mauffret et al., 2012 ; Jardé et al., 2018). Ainsi, il a été décidé, dans un premier temps et sur la période 2016-fin 2018, des campagnes régulières réalisées par le SIBA et, lors d'un résultat de dénombrement supérieur à 500 *E coli*/100 ml (méthode IDDEX au SIBA), les échantillons sont transmis aux LPL pour analyse. Début 2019, un bilan a montré que la contrainte des dénombrements Idexx pour l'analyse des marqueurs était trop restrictive. Les échantillons ont donc été envoyés sans prise en compte du dénombrement avant analyse, sur 3 sites connectés.

**Tableau 23. Tableau récapitulatif du nombre de campagnes prévues pour chaque critère de pluviométrie.**

Bassin versant	Tranches de Pluviométrie			Hautes eaux	Basses eaux	Temps sec
	0-10 mm/24h	10-25 mm/24h	>25mm/24h			
Adour	2	2	2	1	1	1
Uhabia	2	2	2	1	1	1
Untxin	2	2	2	1	1	1
Nive	2	2	2	1	1	1
Bassin d'Arcachon	Selon dénombrements IDDEX <i>E coli</i> jusqu'à fin 2018, puis 7 campagnes en 2019 sans critères de dénombrements					

## 7.1.4 Critères de déclenchement de campagnes d'échantillonnage

### 7.1.4.1 Cas des Bassins versants soumis à l'influence des marées : Uhabia, Untxin, Adour

Trois bassins versants, l'Untxin, l'Uhabia et l'Adour, sont soumis à l'influence des marées. Les stations peuvent donc être impactées par un effet de dilution. Les heures de marée du 1<sup>er</sup> octobre 2016 au 1<sup>er</sup> mars 2019 ont été relevées et les jours de prélèvements possibles ont été répertoriés. De plus, un certain nombre de contraintes s'ajoutent aux horaires de marées : horaires et jours de travail, sécurité, disposition du matériel et des véhicules, disponibilité des personnels renforts et accompagnants. L'ensemble de ces critères a été appliqué systématiquement pour évaluer la possibilité d'échantillonnage.

### 7.1.4.2 Cas particulier de l'Adour : prise en compte du débit

L'Adour étant un fleuve de taille importante, la prise en compte de la pluviométrie seule ne suffit pas à obtenir des épisodes de contaminations. Son débit doit donc être également pris en compte. Le déclenchement des campagnes de prélèvements sur l'Adour est donc soumis à la fois à l'heure de

marée, à la pluviométrie et au débit dans le cas des campagnes des 3 tranches de pluviométrie, en plus des autres critères cités plus haut. Cette prise en compte ne s'applique pas pour les campagnes « temps sec » et « basses eaux », pour lesquelles le débit reste faible.

### 7.1.5 Stratégie d'échantillonnage

Les prélèvements sur les bassins versants de l'Adour, de la Nive, de l'Untxin et de l'Uhabia sont assurés par les LPL, et ceux du Bassin d'Arcachon par le SIBA. Les bassins versants de la Nive et de l'Adour sont échantillonnés seuls. Les bassins versants de l'Untxin et de l'Uhabia, plus petits et proches géographiquement, sont échantillonnés lors de la même campagne.

Les agents des LPL chargés des échantillonnages ont été formés par les équipes des services logistiques internes aux LPL selon le protocole de l'Agence de l'eau (Guide technique, Novembre 2006) pour les prélèvements en rivière et selon le protocole appliqué dans le cadre des surveillances pour l'Agence Régionale de Santé (ARS) pour les eaux de baignade, avant le démarrage des campagnes.

Avant chaque campagne, les différents paramètres (marée, débit, pluviométries) sont analysés pour chacun des bassins. La pluviométrie est prise en compte la veille sur 24 h pour un départ le lendemain. L'idéal aurait été une prise en compte de la pluviométrie sur 3 heures avec départ immédiat pour échantillonnage. Cette option a été étudiée sur le plan logistique et organisationnel par les LPL et s'est avérée infaisable. Le pas de temps de 24h a donc été retenu.

Pour chaque station, 3 flacons d'eau de 250 ml sont prélevés ; le premier est destiné au dénombrement bactérien *E coli* et entérocoques pour évaluer le degré de contamination selon la norme EN ISO 9308-3, le deuxième à l'analyse par marqueurs PCR et le dernier à l'analyse par MST culture (voir rapport final BacTrac1). Les paramètres physico-chimiques tels que l'oxygène dissous, le pourcentage de saturation en oxygène, la conductivité, la salinité, le pH et les températures de l'air et de l'eau sont relevés systématiquement sur sites. Une fiche de description terrain est également remplie et archivée.

Les échantillons sont transportés en glacière jusqu'au laboratoire où ils sont stockés à 4°C jusqu'à traitement dans les 18 heures.

### 7.1.6 Campagnes de prélèvements réalisées

Les campagnes de prélèvements ont démarré en janvier 2017 et se sont terminées en juin 2019. Au total, 49 campagnes ont pu être effectuées (Tableau 24).

**Tableau 24. Bilan des campagnes de prélèvements sur tous les bassins versants ateliers. DS = débit stable ; DA = débit ascendant ; DF = débit faible**

Bassin versant	Tranches de Pluviométrie			Hautes eaux	Basses eaux	Temps sec
	0-10 mm/24h	10-25 mm/24h	>25mm/24h			
Adour*	01/03/17 (DS) 03/04/17 (DA) 11/05/17 (DS)	20/02/18 (DA) 06/06/18 (DA)	12/09/17 (DA) 15/10/18 (DA)	16/05/18 (DA)	07/08/2017 (DF)	17/10/17 (DF)
Uhabia	01/03/17 11/05/17	17/01/17 06/06/17	15/10/18 24/01/2019	17/01/18	23/08/2017	10/10/17
Untxin	01/03/17 11/05/17	17/01/17 25/07/17	15/10/18 24/01/2019	17/01/18	23/08/2017	10/10/17
Nive	28/06/17 12/12/17	06/02/17 06/11/17	11/01/17 09/04/18	21/05/2019	18/07/2017	16/10/17
Bassin d'Arcachon	31/05/2017 – 12/06/2017 – 28/06/2017 – 12/06/2018 – 03/12/2018 23/01/2019 – 19/02/2019 – 19/03/19 – 03/04/19 – 18/04/2019 – 14/05/19 – 04/06/19					

## 7.2 Résultats

### 7.2.1 Evaluation de marqueurs *in situ* : « spécificité diagnostique »

La spécificité diagnostique d'une méthode est définie par sa capacité à identifier un échantillon de statut connu et à lui donner un statut identique. Par analogie, 6 marqueurs ont pu être testés *in situ* sur des échantillons prélevés à proximité immédiate de la source de contamination d'intérêt, majoritaire et pouvant ainsi être statués comme positifs pour cette source et donc pour ce marqueur. Sept stations réparties sur la Nive et l'Uhabia ont été sélectionnées pour évaluer la spécificité diagnostique des marqueurs humain, volaille, équin, laridés et porcine. Chacune a été échantillonnée à plusieurs reprises et selon un plan d'échantillonnage précis, comme pour une étude de bassin versant, soit en temps de pluie (3 tranches de pluviométrie définies), en temps de hautes ou de basses eaux et en temps sec. Ces deux dernières conditions n'ont pas été retenues pour l'évaluation de la spécificité diagnostique pour ne considérer que les conditions de forte contamination.

Les analyses ont montré que les sources attendues sont détectées sur 75% à 100 % des campagnes de prélèvements selon la source considérée (Tableau 25). Concernant le marqueur volailles, il est intéressant de noter que la détection du marqueur augmente si la période de vide sanitaire, lors de la crise de la grippe aviaire, n'est pas prise en compte (puisque aucun canard n'est présent dans l'élevage) ce qui montre que cet événement particulier a pu être mis en évidence. Les marqueurs testés montrent ainsi une spécificité diagnostique satisfaisante. Ces résultats montrent le bon fonctionnement de la trousse BacTrac sur des échantillons *in situ* et ainsi la pertinence de son application dans le cadre d'études à plus grande envergure.

**Tableau 25. Pourcentages de détection des marqueurs Laridés (Gull2), Equin (HofACH), humain (HF183), Volaille (AV43) et Porc (Pig2Bac) sur stations à source attendue. Pourcentages calculés sur 7 campagnes hors temps sec et basses eaux.**

Station	Contexte	Marqueur attendu	Moyenne E coli NPP/100 ml	Moyenne entérocoques NPP/100 ml	% de détection
Uha-Ref	Centre d'enfouissement 1000 Laridés 		4 660 +/- 4 182	31 500 +/- 42 196	100 %
Uha-2	Centre équestre 		2 947 +/- 3 487	1 434 +/- 1 934	83 %
Niv-2	Aval de ventas espagnoles 		765 +/- 296	451 +/- 390	100 %
Niv-4 et 5	Elevage de canards 		4 672 +/- 3 879	2 736 +/- 3 426	64 % (75% hors vide sanitaire)
Niv-7	Aval STEP 		4 357 +/- 3 473	1 208 +/- 808	100 %
Niv-3	Aval élevage de porcs Kintoa 		689 +/- 748	130 +/- 119	100 %

## 7.2.2 Etude des bassins versants

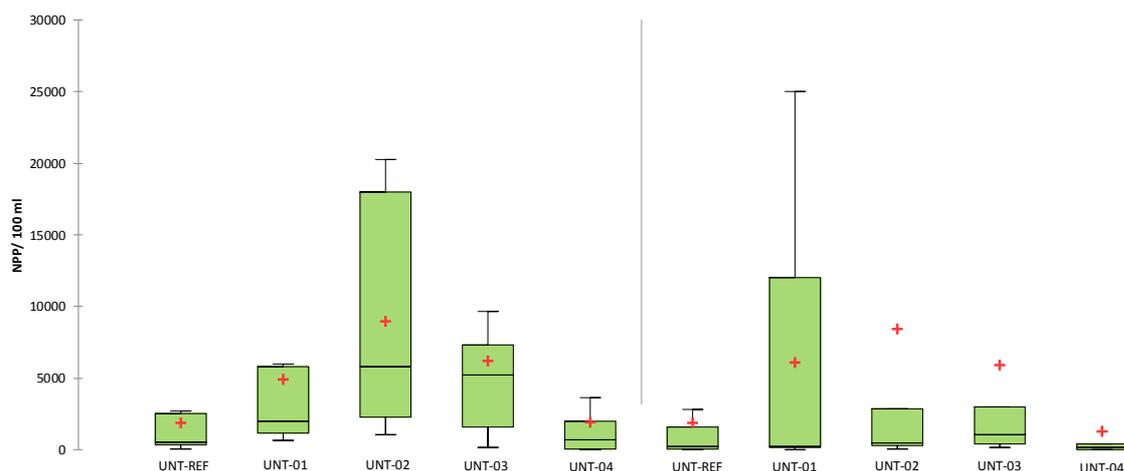
Au démarrage de l'étude, la trousse BacTrac devait associer une méthodes MST-PCR et une méthode MST-Culture. Cependant, comme décrit dans le rapport final BacTrac 1, le développement de cette méthode par culture n'a pas donné les résultats escomptés pour une application d'analyse en routine. La trousse BacTrac n'est donc constituée que de marqueurs PCR sélectionnés ou développés dans le projet BacTrac 2 et validés selon la norme NF U 47-600 (cf 5.2). Les résultats présentés ci-après reposent donc exclusivement sur ces marqueurs. Ils ont été analysés de manière à (i) comprendre le fonctionnement de chaque bassin versant vis-à-vis des marqueurs, (ii) comprendre le comportement des marqueurs en fonction des spécificités de chaque bassin versant, (iii) en déduire une carte d'identité de chaque bassin versant montrant les tendances générales. Les analyses des 10096 données acquises (paramètres physico-chimiques, dénombrements *E. coli* et entérocoques, résultats de chaque marqueur, valeurs de pluviométrie et/ou de débit), ont été explorées à l'aide d'outils statistiques descriptifs et exploratoires tels que des tests de corrélations ou de Krustall-Wallis, des analyses en composantes principales, analyses des correspondances multiples ou classifications ascendantes hiérarchiques, à l'aide du logiciel XLSTAT (Addinsoft). Des représentations (graphiques à bulles) de ces résultats ont également été réalisées afin d'avoir un visuel simplifié de ceux-ci.

### 7.2.2.1 Bassin versant de l'Untxin

Le bassin versant de l'Untxin est le plus petit bassin exploré au Pays Basque avec 32 km<sup>2</sup> pour un cours d'eau de 9,45 km traversant la commune d'Urrugne jusqu'à la baie de Soccoa à Ciboure. L'étude de ce bassin est basée sur 3 stations dans la zone agglomération (UNT-1, UNT-2, UNT-3), 1 sur la zone baignade (UNT-4) et une station amont (UNT-REF) (Figure 20 et Tableau 19).

## Degré de contamination

Les moyennes générales de dénombrement des indicateurs fécaux, *Escherichia coli* et entérocoques, sur le bassin versant de l'Untxin sont respectivement de  $4776 \pm 5209$  et  $4726 \pm 8352$  NPP/100 ml. La zone présentant les plus forts degrés de contamination pour les deux indicateurs est l'agglomération rassemblant les 3 stations UNT-01, UNT-02 et UNT-03, UNT-02 étant la plus contaminée en *Escherichia coli* et UNT-01 en entérocoques (Figure 24).



**Figure 24. Représentation par boîte à moustaches des dénombrements des indicateurs fécaux *Escherichia coli* (à gauche) et Entérocoques (à droite) pour chacune des stations du bassin versant de l'Untxin. La croix rouge représente la moyenne.**

La Figure 25 montre les dénombrements relevés en fonction des tranches de pluviométrie. Les degrés de contamination sont les plus faibles en « temps sec » et « basses eaux », pour les deux indicateurs. Viennent ensuite les degrés plus élevés lors des tranches « hautes eaux », « 2-10 mm/24 h » et « 10-25 mm/24 h ». Enfin, le plus fort degré de contamination est observé pour la tranche de pluviométrie « >25 mm/24 h » pour laquelle les dénombrements atteignent  $10668 \pm 7210$  NPP/ 100 ml pour *Escherichia coli* et  $17879 \pm 13573$  NPP/ 100 ml pour entérocoques. Le degré de contamination semble donc lié à la pluviométrie. Cette hypothèse est confirmée par le test de corrélation de Spearman ( $p < 0,001$ ).

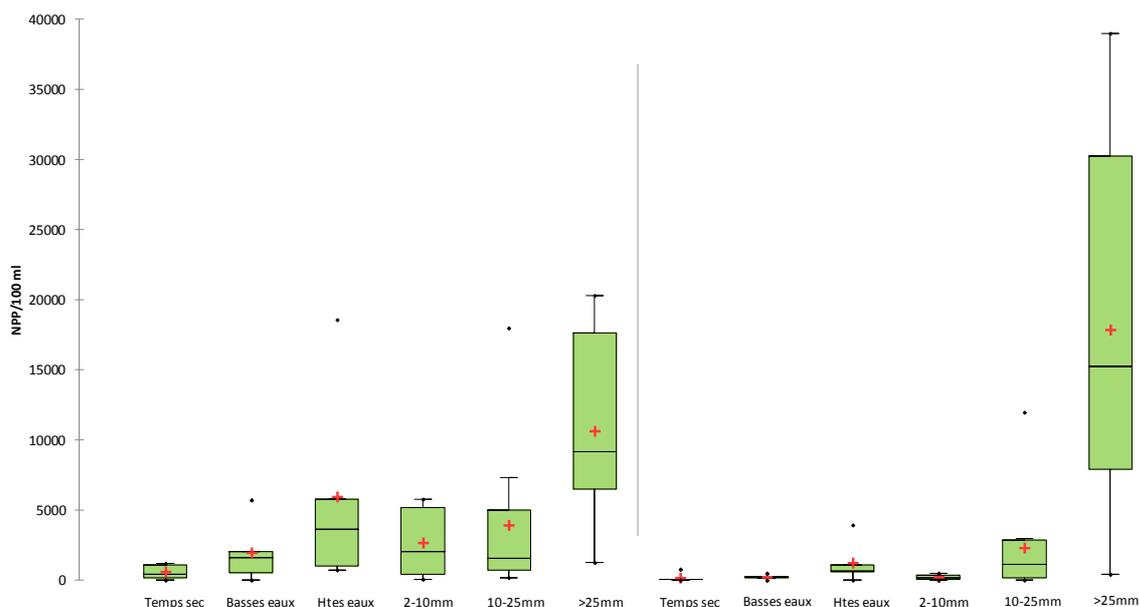
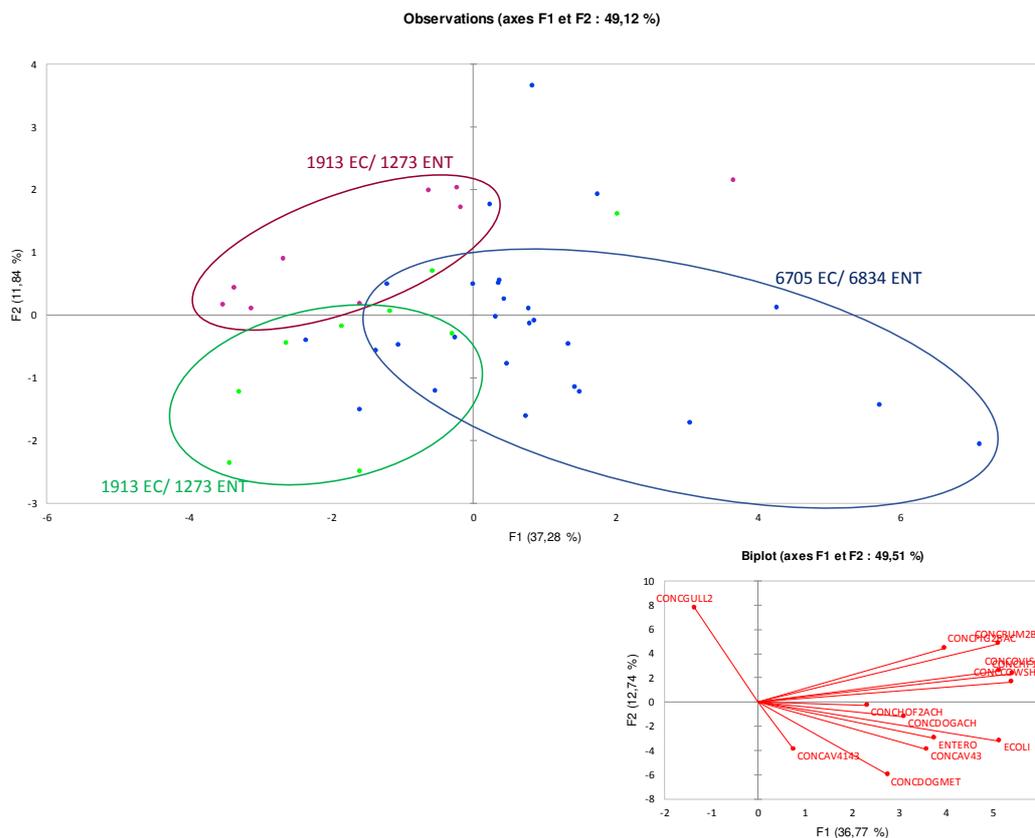


Figure 25. Représentation par boîte à moustaches des indicateurs fécaux *Escherichia coli* (à gauche) et Entérocoques (à droite) en fonction des tranches de pluviométries du bassin versant de l'Untxin.

### Profil de marqueurs

La trousse de marqueurs PCR a été appliquée sur l'ensemble des échantillons prélevés sur l'Untxin. Au total, 11 marqueurs ont été testés. Les 2 autres marqueurs de la trousse, ciblant l'oie et le cygne, n'ont pas été utilisés sur ce bassin car non cohérents avec le contexte de contamination. Nous avons d'abord recherché comment se répartissaient les échantillons en fonction de diverses variables afin d'avoir une vue générale du profil du bassin versant de l'Untxin vis-à-vis des marqueurs et des indicateurs fécaux. Les échantillons forment 3 groupes distincts : un groupe correspondant à la zone « Amont » (UNT-REF), un deuxième à la zone « Agglomération » (UNT-01, UNT-02 et UNT-03) et un dernier à la zone « Baignade » (UNT-04) (Figure 26). Les échantillons se répartissent donc selon la zone géographique à laquelle ils appartiennent en fonction de la concentration des marqueurs et du degré de contamination spécifique de la zone concernée. En effet, chaque zone montre des caractéristiques propres :

- Zone « Agglomération » => plus fort degré de contamination assorti de fortes concentrations en marqueurs PCR excepté le marqueur Laridés.
- Zone « Amont » => plus faible degré de contamination et plus faibles concentrations de marqueurs PCR par rapport à la zone précédemment citée et Laridés absents.
- Zone « Baignade » => plus faible degré de contamination et plus faible concentration en marqueurs par rapport à la zone « Agglomération » mais forte concentration en marqueur Laridés.



**Figure 26. Répartition des échantillons du BV de l'Untxin en fonction des marqueurs PCR et des indicateurs fécaux par analyse en composante principale. Le cercle de corrélation est présenté en bas à droite. En violet, zone Amont ; en bleu, zone Agglomération ; en vert, zone Baignade. EC = *Escherichia coli* ; ENT = entérocoques ; CONC « marqueur » = concentration en marqueur.**

Le profil de marqueurs proprement dit de chaque zone est présenté dans la Figure 26. De manière générale, la zone « Amont » est caractérisée par la présence des marqueurs humain, ruminant, bovin et cheval et peuvent être campagne dépendant. Ce profil est cohérent avec le contexte de la station puisque l'on peut noter une activité agricole à proximité, des assainissements non connectés au réseau et la présence de chevaux à côté de la station prélevée. La zone « Agglomération » compte plus de marqueurs et est fortement marquée par la présence des marqueurs humain, canin, ruminant, ovin, bovin et porcin. De même que précédemment, ce profil correspond au contexte des stations excepté pour le marqueur porcin qui n'était pas attendu et pourtant retrouvé sur les 3 stations, probablement lié aux sangliers. Enfin, sur la zone « Baignade » sont retrouvés les mêmes marqueurs en moindre concentration, suggérant un effet de dilution. Elle est également fortement marquée par la présence des Laridés et par la présence du marqueur canin exclusivement hors saison touristique.

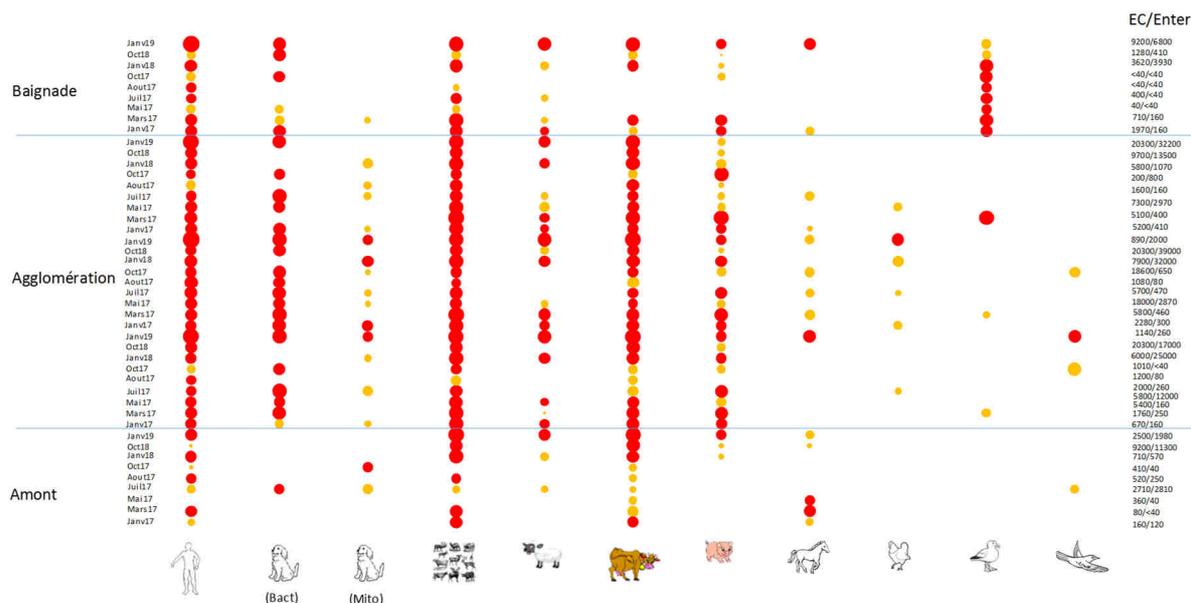
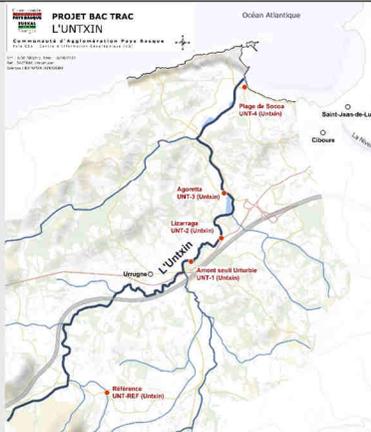


Figure 27. Profil de marqueurs du bassin versant de l'Untxin. Point rouge : marqueur présent ; point orange : marqueur en suspicion.

Les tests statistiques de corrélation de Spearman menés sur les données du BV Untxin indiquent l'existence d'une corrélation entre 4 marqueurs (humain, ruminant, bovin et ovin), le dénombrement des indicateurs fécaux et la pluviométrie. Le bassin versant de l'Untxin est donc très réactif à la pluviométrie et ces observations permettent de prédire qu'en cas de pluie, un lessivage s'effectue et laisse place à une forte contamination dont l'origine est multisource principalement humaine et agricole.

Le bassin de l'Untxin est donc un petit bassin versant qui, bien que réactif à la pluviométrie, montre un profil de marqueurs de contamination se structurant en fonction des zones géographiques. En effet, les 3 zones échantillonnées présentent une composition de marqueurs commune mais comprend également chacune sa spécificité : « Amont », présence de l'équin ; « Agglomération », présence du porcine ; « Baignade », présence des Laridés ». Elles diffèrent également sur la fréquence de présence des 6 marqueurs (Humain, Chien, Ruminants, Ovin, Bovin et Porcin) les plus observés sur les 9 campagnes, bien plus élevée dans l'agglomération (74% en moyenne) qu'au niveau des autres zones (Amont = 31% en moyenne et Baignade = 37% en moyenne).

**Carte d'identité du BV de l'Untxin**



**Nom : UNTXIN**

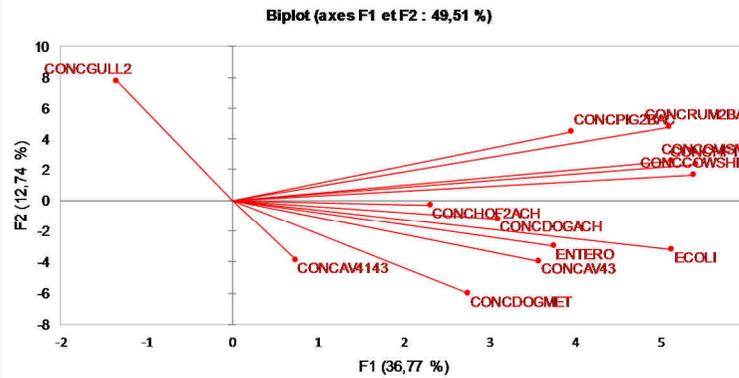
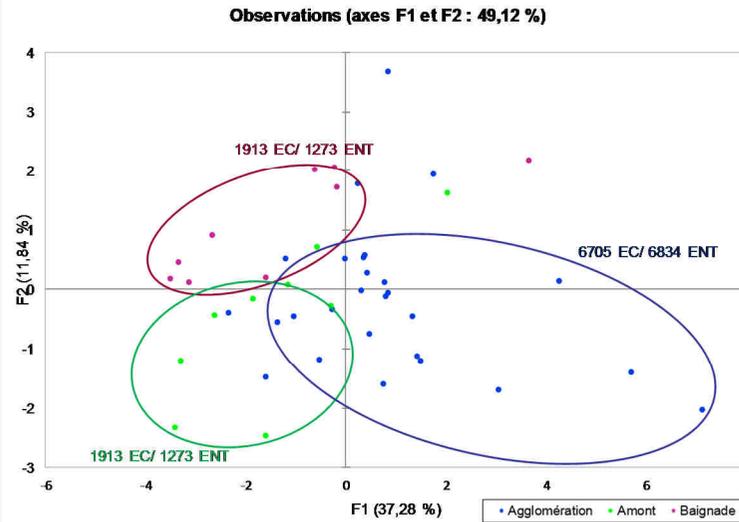
**Longueur du fleuve : 9,45 km**

**Taille du bassin versant : 32 km<sup>2</sup>**

**Débit moyen : 0,3-0,5 m<sup>3</sup>/s (temps sec)**

**Nb de stations échantillonnées : 5**  
(1 amont, 3 agglo et 1 baignade)

**Moyenne EC : 4776 +- 5209 NPP/100 ml**  
**Moyenne ENT : 4726 +- 8352 NPP/100 ml**



**Caractéristiques :**

**Indicateurs fécaux** ↔ **4 Marqueurs**

↕ **Corrélation ( p-value = <0,01)** ↕

**Pluviométrie**

---

**Réactif à la pluviométrie**

---

**Profil des marqueurs (9 campagnes)**

**Amont**

↔

**Agglomération**

↔

**Baignade**

↔

Effet de dilution

Hors saison

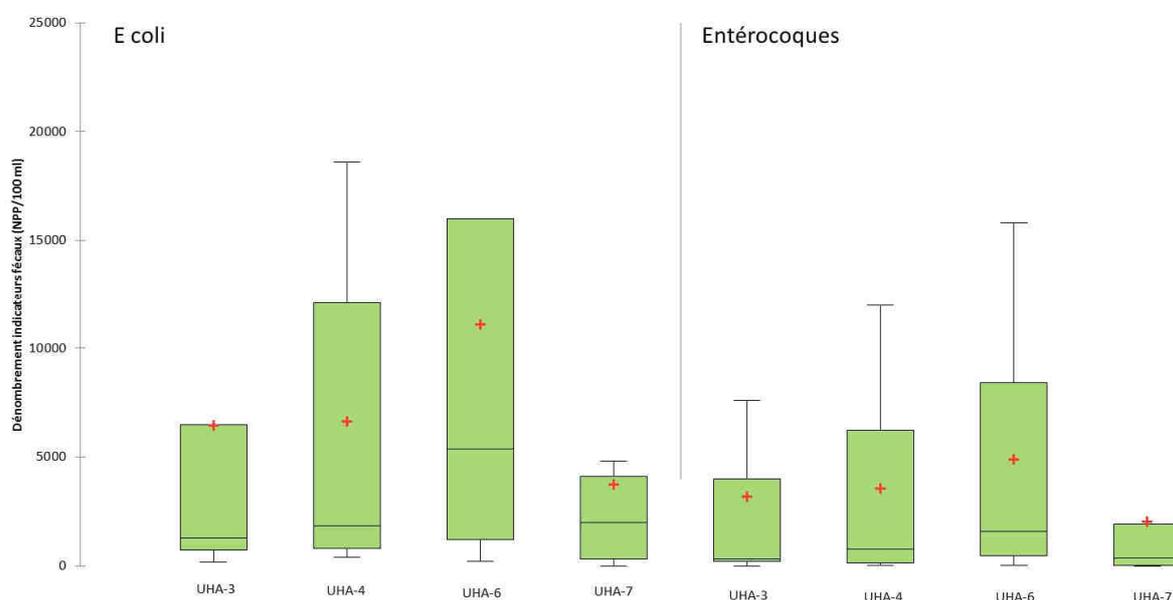
### 7.2.2.2 Bassin versant de l'Uhabia

L'Uhabia est une rivière de 15,1 km se jetant dans l'océan au niveau de la plage qui porte son nom à Bidart. Son bassin versant s'étend sur 61 km<sup>2</sup> de terres agricoles et de zone urbaine. Comme détaillé dans la partie 7.1.5, certaines stations du bassin ont permis d'explorer le comportement des marqueurs *in situ*. Elles sont situées en amont sur des affluents directs et leur comportement n'impactent pas directement l'Uhabia. Elles ne seront donc pas prises en compte dans cette partie. L'étude porte plus précisément sur la partie aval du bassin, avec une station amont située sur l'affluent juste avant sa connexion avec l'Uhabia (UHA-3), 2 stations agglomérations (UHA-4 et UHA-6) et une station baignade (UHA-7).

#### Degré de contamination

De manière générale, le bassin versant de l'Uhabia présente un degré de contamination élevé avec des moyennes de  $6979 \pm 9114$  NPP/100 mL et  $3416 \pm 4433$  NPP/100mL respectivement pour *E. coli* et Entérocoques.

Les stations montrent un degré de contamination compris entre 3752 et 11081 *E. coli*/100 ml et 2037 et 4883 entérocoques /100 ml (Figure 28). Bien que l'analyse de variance de Kruskal-Wallis ne conclut à aucune différence statistique entre les moyennes des stations, UHA-7, station de baignade dans laquelle se jette l'Uhabia, montre une plus faible contamination qui pourrait être liée à un effet de dilution.



**Figure 28. Représentation par boîte à moustaches des dénombrements des indicateurs fécaux *Escherichia coli* (à gauche) et Entérocoques (à droite) pour chacune des stations du bassin versant de l'Uhabia. La croix rouge représente la moyenne.**

Les dénombrements par tranches de pluviométrie montrent une forte variabilité selon la tranche considérée (Figure 29). En effet, de manière générale, les tranches de pluviométrie, contrairement aux tranches basses eaux, hautes eaux et temps sec, montrent les plus forts dénombrements avec un pic pour la tranche >25 mm/ 24 h ( $13950 \pm 5537$  *Escherichia coli* et  $9042 \pm 4732$  entérocoques/100 ml),

suggérant une forte influence de la pluviométrie sur le degré de contamination du bassin. Cette hypothèse est confirmée par le test de corrélation de Spearman montrant une corrélation entre la pluviométrie et chaque indicateur fécal et entre les indicateurs fécaux.

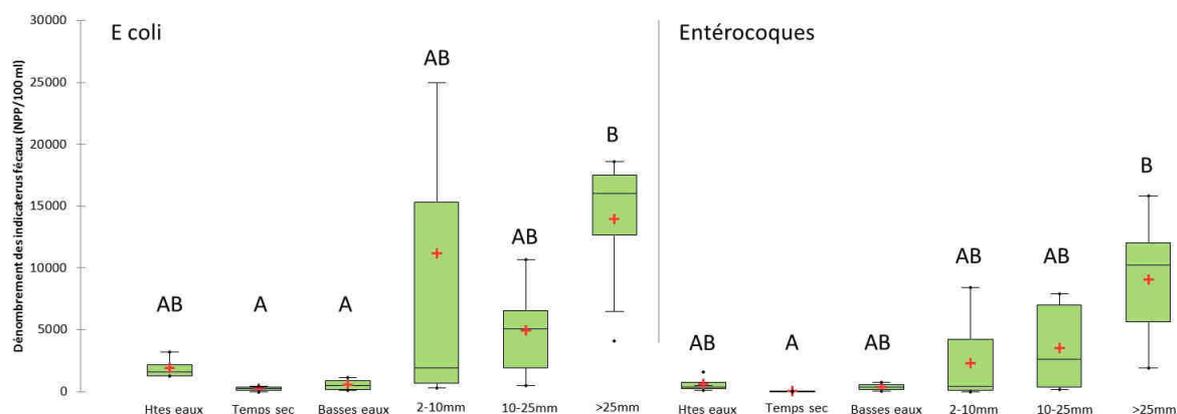


Figure 29. Représentation par boîte à moustaches des dénombrements des indicateurs fécaux *Escherichia coli* (à gauche) et Entérocoques (à droite) par tranche de pluviométrie du bassin versant de l’Uhabia. La croix rouge représente la moyenne. Les lettres représentent les résultats de la comparaison de variances de Kruskal-Wallis.

Le bassin de l’Uhabia, en terme de contamination, se structure en fonction de la pluviométrie et non en fonction des stations ce qui était le cas pour le bassin de l’Untxin.

### Profil de marqueurs

Les 11 marqueurs de la trousse BacTrac, utilisés pour le bassin versant de l’Untxin, ont été utilisés sur chaque échantillon du bassin de l’Uhabia. La classification hiérarchique ascendante a été réalisée à l’aide de diverses variables à savoir la pluviométrie, la concentration de chacun des 11 marqueurs PCR et le dénombrements des indicateurs fécaux (Figure 30). Les échantillons se structurent très clairement en fonction des tranches de pluviométrie, comme précédemment lors de l’analyse du degré de contamination basé exclusivement sur les indicateurs fécaux. La pluviométrie joue donc un rôle important dans le profil des marqueurs et chaque tranche montre un profil propre.

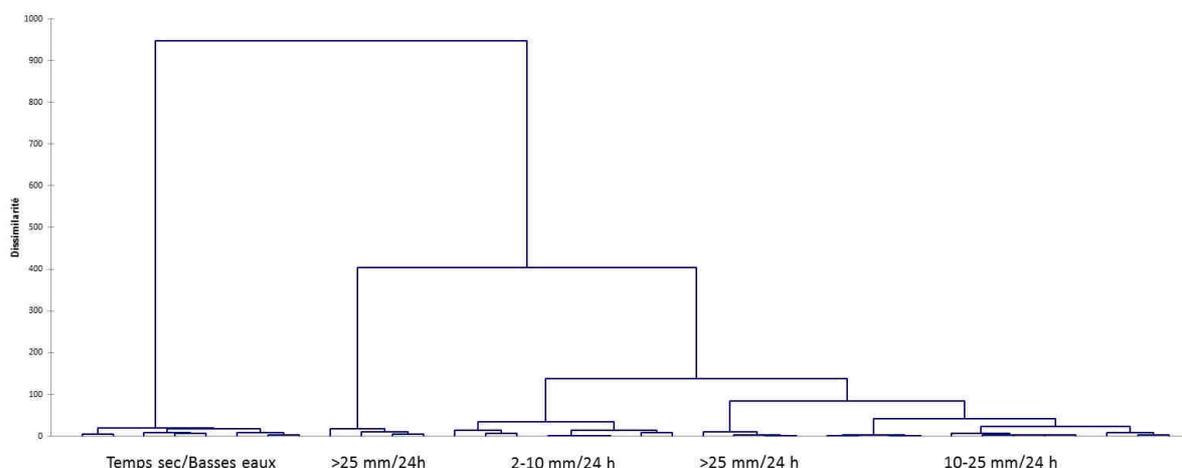
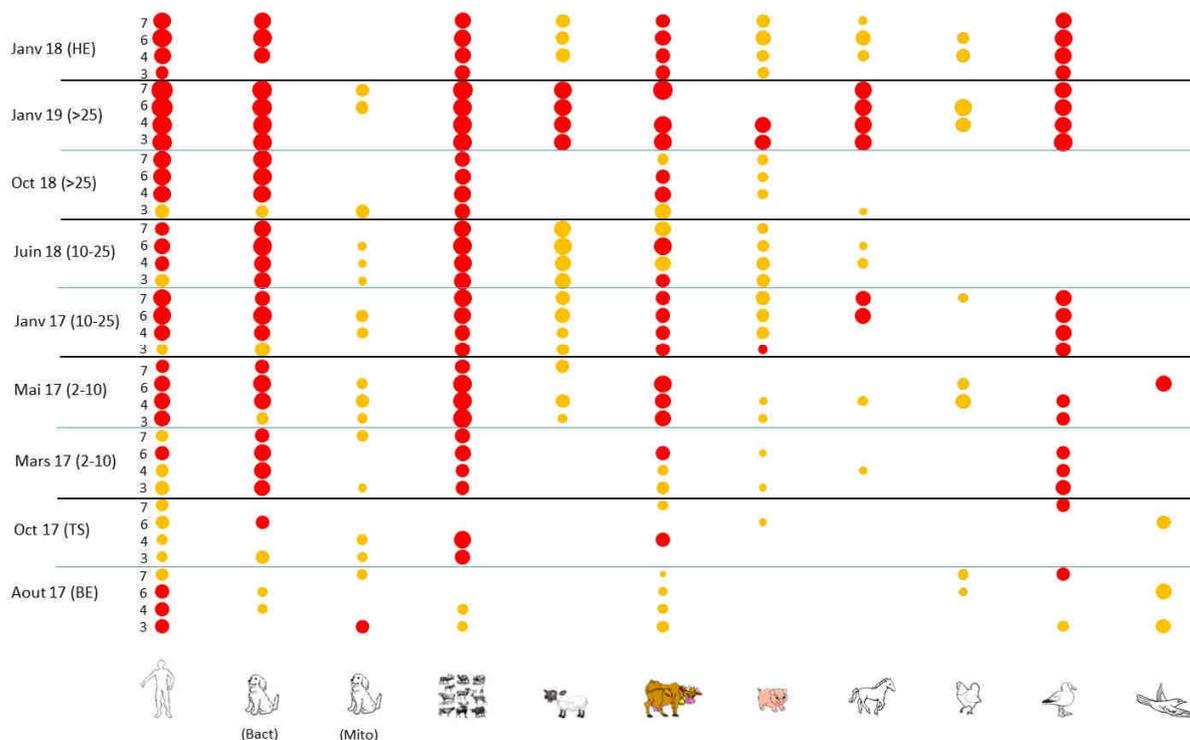


Figure 30. Structuration des échantillons du bassin versant de l’Uhabia selon les tranches de pluviométrie, par Classification Ascendante Hiérarchique.

La répartition des marqueurs est représentée en Figure 31 par tranche de pluviométrie. De manière très générale, 2 profils peuvent être mis en évidence :

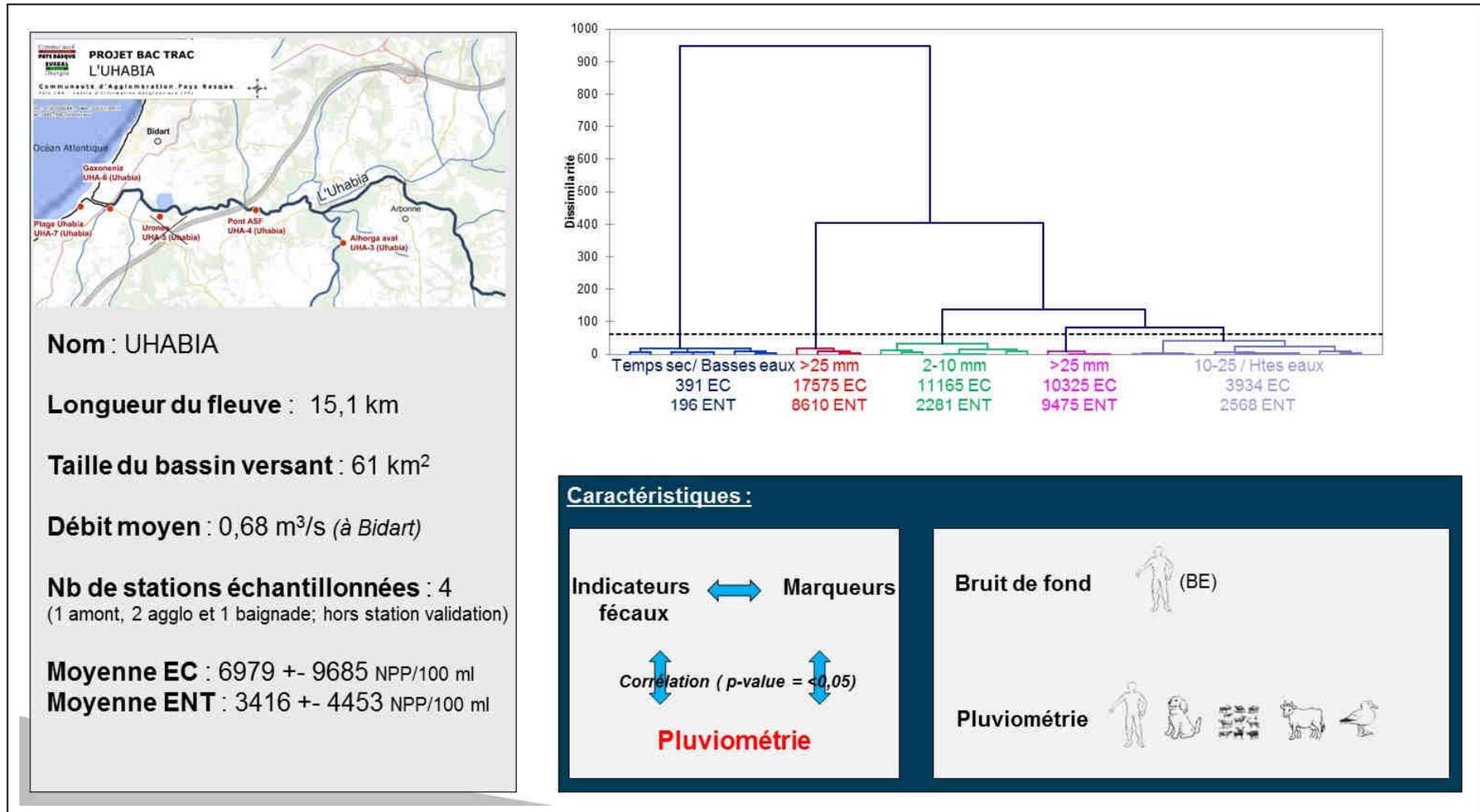
- Le bruit de fond, visible sur la campagne réalisée en « basses eaux », très peu contaminée (moyenne de 552 *Escherichia coli* et de 372 entérocoques/100 ml) révèle la présence du marqueur humain sur l'ensemble des stations avec une concentration plus faible en basses eaux au niveau de la baignade par effet de dilution. Le reste des marqueurs est campagne dépendant et ne peut pas être associé à un véritable bruit de fond. Afin de confirmer cette conclusion, des campagnes supplémentaires dans cette tranche seraient souhaitables.
- Le profil correspondant à la pluviométrie montrant une empreinte multisources comptant la présence récurrente de l'humain, du chien, du ruminant, du bovin et du Laridé sur l'ensemble des stations et des campagnes.



**Figure 31. Profil de marqueurs du bassin versant de l'Uhabia. Point rouge : marqueur présent ; point orange : marqueur en suspicion.**

Le bassin versant de l'Uhabia est le bassin montrant les plus fortes concentrations en *Escherichia coli* et entérocoques. Il est caractérisé par une forte réactivité à la pluviométrie avec une corrélation de ce paramètre à la fois avec les indicateurs fécaux et les marqueurs PCR. La contamination y est multisources et est essentiellement d'origine humaine, canine, ruminant, bovine et Laridés.

**Carte d'identité du bassin versant de l'Uhabia**

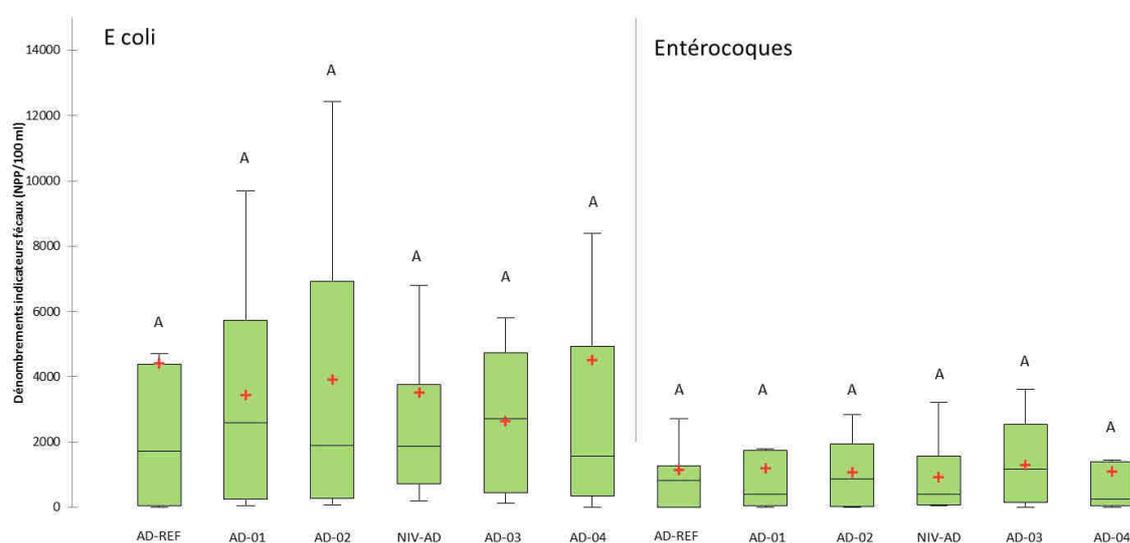


### 7.2.2.3 Bassin versant de l'Adour

Le bassin versant de l'Adour est le plus grand bassin versant étudié dans BacTrac, avec une taille de 16 912 km<sup>2</sup> et une de rivière de 335 km. L'étude porte sur la zone de Bayonne avec 3 stations urbaines (AD-1, AD-2, AD-3) et une station baignade (AD-4). Les apports pouvant venir de l'amont de Bayonne sont évalués à l'aide d'une station située à Urt (AD-REF) et les apports provenant de la Nive, connectée à l'Adour au sein de l'agglomération, sont évalués par une station située en amont de la connexion, NIV-AD.

#### Degré de contamination

De manière générale, le bassin versant de l'Adour présente le degré de contamination le plus faible des 3 bassins versants étudiés dans BacTrac avec des moyennes de  $3740 \pm 4981$  NPP/100 ml et  $1119 \pm 1434$  NPP/100 ml respectivement pour *E. coli* et entérocoques.



**Figure 32. Représentation par boîte à moustaches des dénombrements des indicateurs fécaux *Escherichia coli* (à gauche) et Entérocoques (à droite) pour chacune des stations du bassin versant de l'Adour. La croix rouge représente la moyenne. Les lettres représentent les résultats de la comparaison de variances de Kruskal-Wallis.**

Les stations montrent des dénombrements d'indicateurs fécaux équivalents avec des moyennes allant de 2646 à 4512 *Escherichia coli* et de 919 à 1291 entérocoques/100 ml (Figure 32). La station amont AD-REF, révélant les apports en provenance de la partie amont de l'agglomération de Bayonne atteint 4408 EC/100 ml et 1135 EC/100 ml. La station placée sur la Nive révélant les apports de ce fleuve dans l'Adour montre des dénombrements de 3523 *Escherichia coli* et 919 entérocoques/100 ml.

L'Adour étant un fleuve conséquent, son débit, d'une moyenne de 150 m<sup>3</sup>/s, joue un rôle fondamental dans la dynamique des contaminants. En effet, la moyenne du degré de contamination diffère en fonction du débit du fleuve (Figure 33). Le degré le plus important est observé lorsque le débit est en phase ascendante, relevé sur les 7 jours précédents l'échantillonnage, avec une moyenne de 6511 *Escherichia coli* et 1973 entérocoques. Les échantillons prélevés en débit faible (<19 m<sup>3</sup>/s)

montrent la plus faible moyenne avec 160 *Escherichia coli* et 33 entérocoques et ceux en « débit stable » (débit n'évoluant pas durant les 7 jours précédant les échantillonnages) ont une moyenne plus élevée de 587 *Escherichia coli* et 132 entérocoques. La pluviométrie joue un rôle indirect sur le degré de contamination par son influence sur le débit de l'Adour.

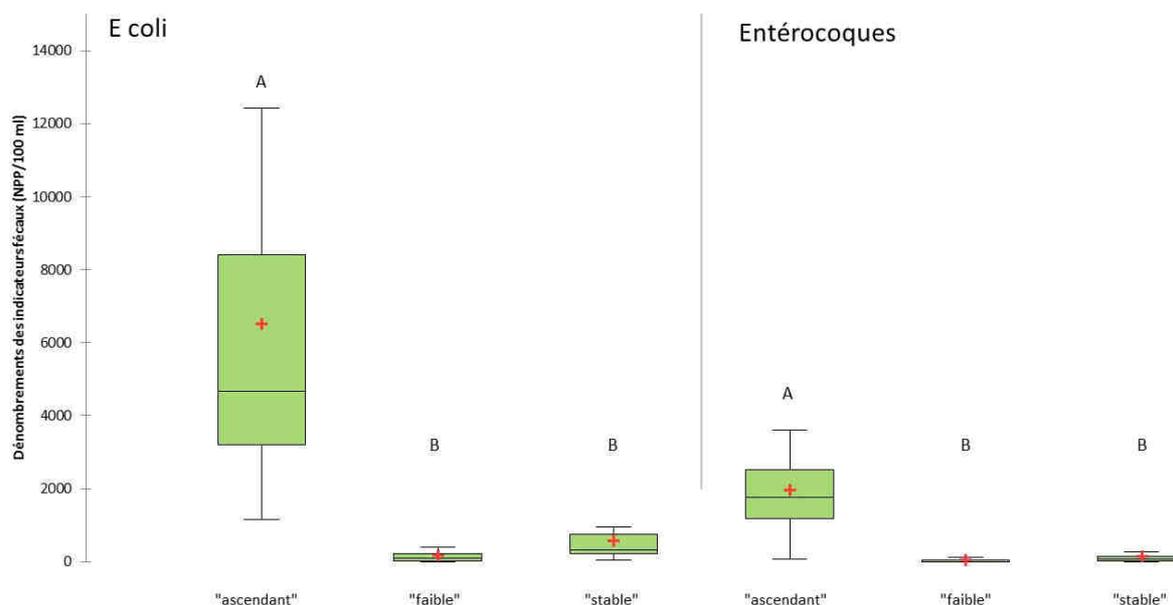
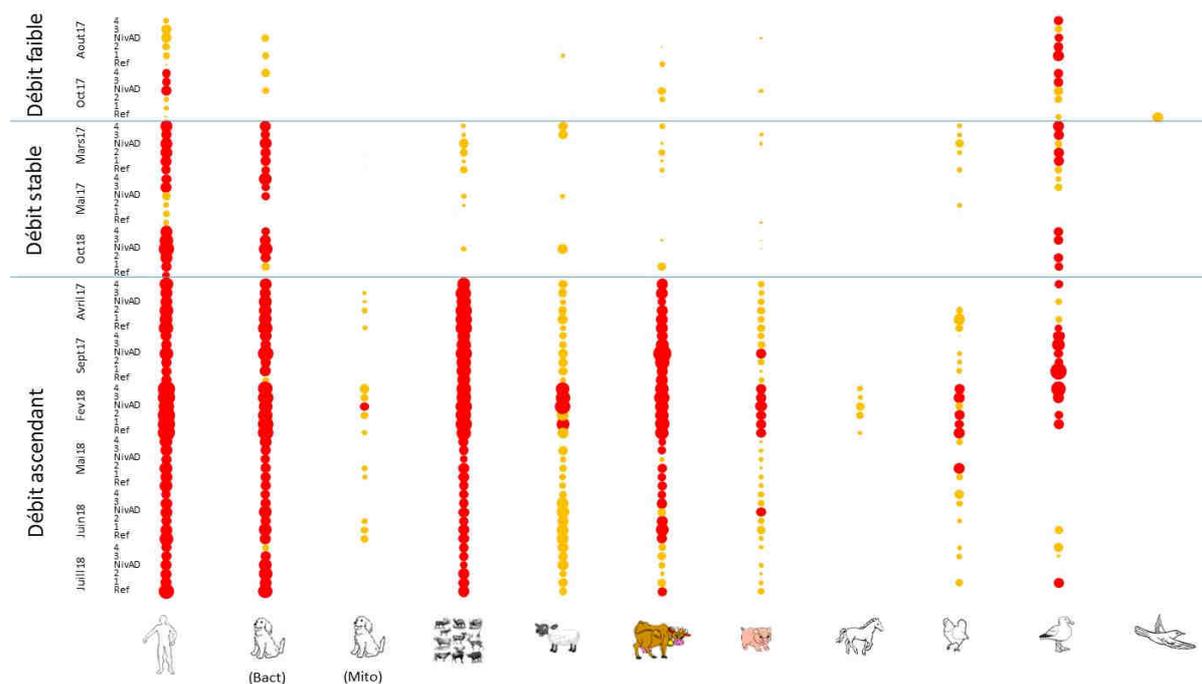


Figure 33. Représentation par boîte à moustaches des dénombrements des indicateurs fécaux *Escherichia coli* (à gauche) et Entérocoques (à droite) par type de débit. La croix rouge représente la moyenne. Les lettres représentent les résultats de la comparaison de variances de Kruskal-Wallis.

### Profil de marqueurs

De même que précédemment, les 11 marqueurs de la trousse BacTrac ont été utilisés sur chaque échantillon du bassin de l'Adour. La structuration des échantillons sur la bassin versant de l'Adour se fait très clairement en fonction du débit (Figure 34). Les échantillons prélevés en débit « faible » et « stable » forment un groupe inversement corrélé aux concentrations des marqueurs PCR et indicateurs fécaux. *A contrario*, les échantillons du groupe « débit ascendant » est corrélé aux fortes concentrations des variables citées précédemment. Ainsi, plus le débit sera important, plus le degré de contamination sera fort et plus la concentration en marqueurs PCR sera élevée. Cette observation est d'ailleurs confirmée par le test de corrélation de Spearman ( $p < 0,05$ ).

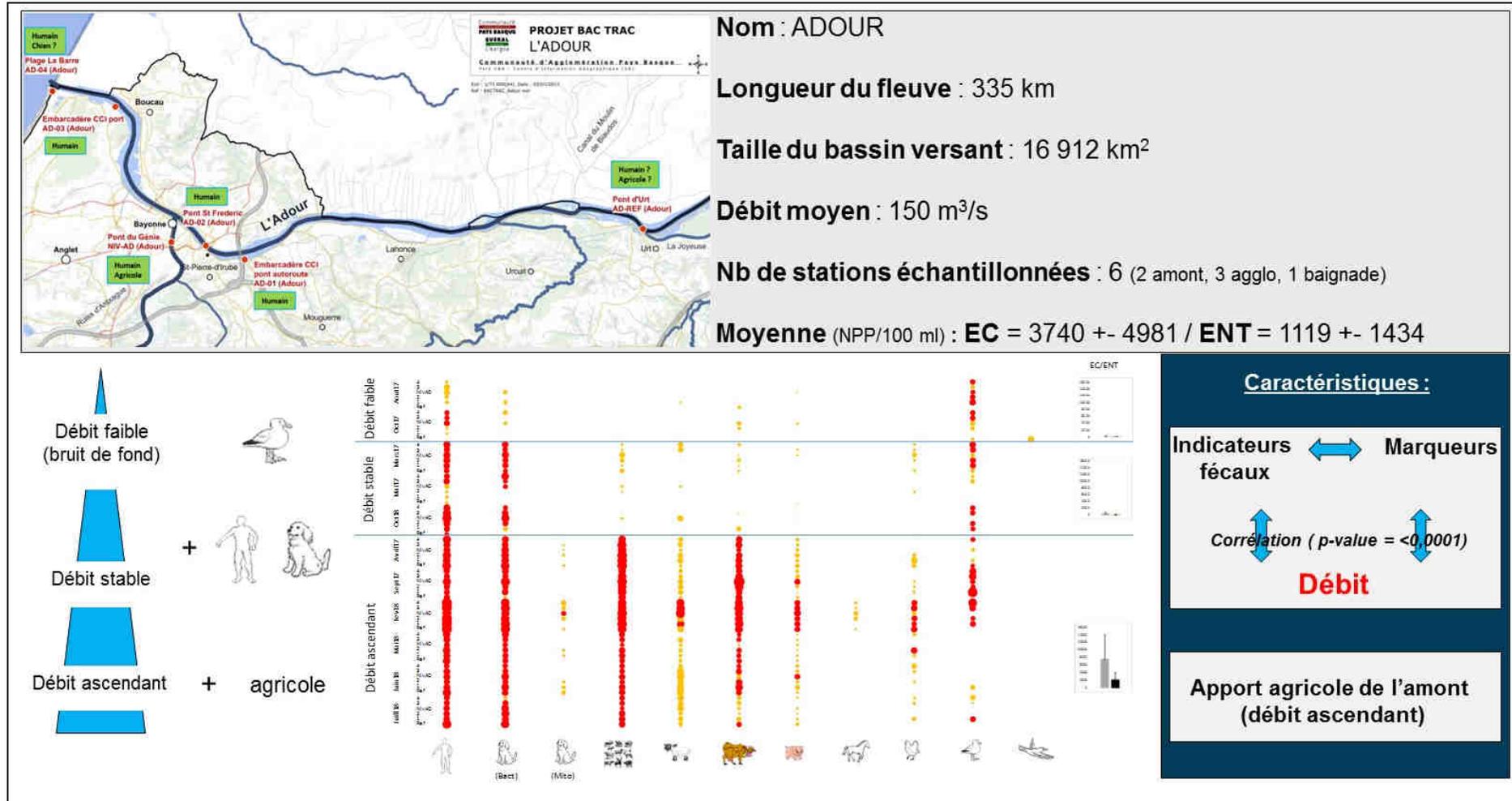




**Figure 35. Représentation graphique de la répartition des marqueurs PCR sur le bassin versant de l'Adour. Points orange : marqueur en suspicion ; point rouge : marqueur présent.**

Comme pour les autres bassins versants, la contamination sur le bassin versant de l'Adour est multisources et est observée selon le débit du fleuve. Ces contaminations sont d'origine humaine, canine, agricole avec la présence du Laridé sur le littoral ce qui est en adéquation avec le contexte de la zone. Ce bassin versant est le seul montrant une forte réactivité au débit.

**Carte d'identité du bassin versant de l'Adour**



### 7.2.2.4 Bassin d’Arcachon :

L’étude sur le bassin d’Arcachon porte sur 3 stations : une rivière, une craste (fossé d’écoulements des eaux) et une zone de baignade. Bien que des campagnes avec des résultats probants aient été menés en 2017 et 2018, nous nous concentrerons dans ce rapport sur celles de 2019, échantillonnées sans restriction de dénombrements (cf 7.1.3). Pour rappel de la problématique, cette zone géographique est surtout liée à une population d’oiseaux sauvages conséquente et à une activité touristique intense et non à des problématiques agricoles ou d’infrastructures humaines comme cela peut être le cas au Pays Basque. Au vu du contexte, les 14 marqueurs composant la trousse BacTrac, ciblant notamment une palette plus large d’oiseaux, a été utilisée.

Le premier point notable est le nombre relativement faible des indicateurs fécaux,  $224 \pm 214$  *Escherichia coli*/100 ml et  $171 \pm 218$  entérocoques/100 ml. Malgré tout, il est relevé la présence systématique, à des taux bien supérieurs à la limite de quantification, du marqueur chien (moyenne de 3,66 log ; LQ = 2 log). Les autres marqueurs détectés de manière plus aléatoire et à des taux variables sont ceux correspondant à la faune aviaire : Oiseau général (AV4143 et GFD), Laridés, Cygne et Oie (Figure 36). Deux particularités sont à approfondir : (i) la réponse faible mais récurrente du marqueur bovin alors que le marqueur ruminant ne répond pas et que le contexte ne s’y prête pas forcément, (ii) la présence suspicieuse (concentrations inférieures à la limite de quantification) presque systématique du marqueur humain. Dans ce dernier cas, nous ne pouvons pas exclure qu’il s’agit de faux positifs liés à la présence à des concentrations importantes du marqueur chien. En effet, il a été montré que des individus humain ou animal partageant le même foyer pouvaient présenter des similitudes au niveau du microbiote intestinal (Coelho et al, 2018).

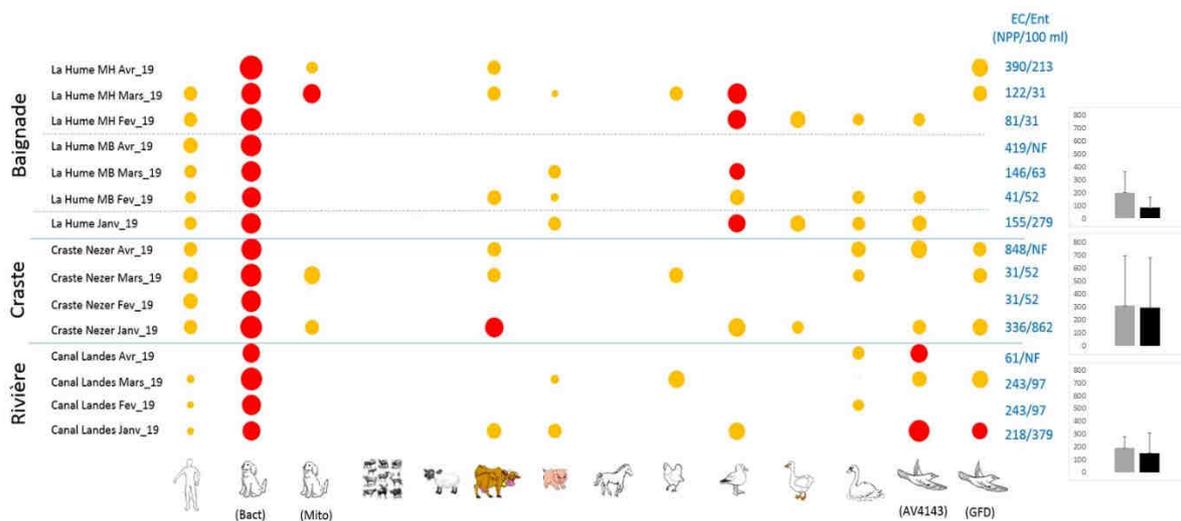
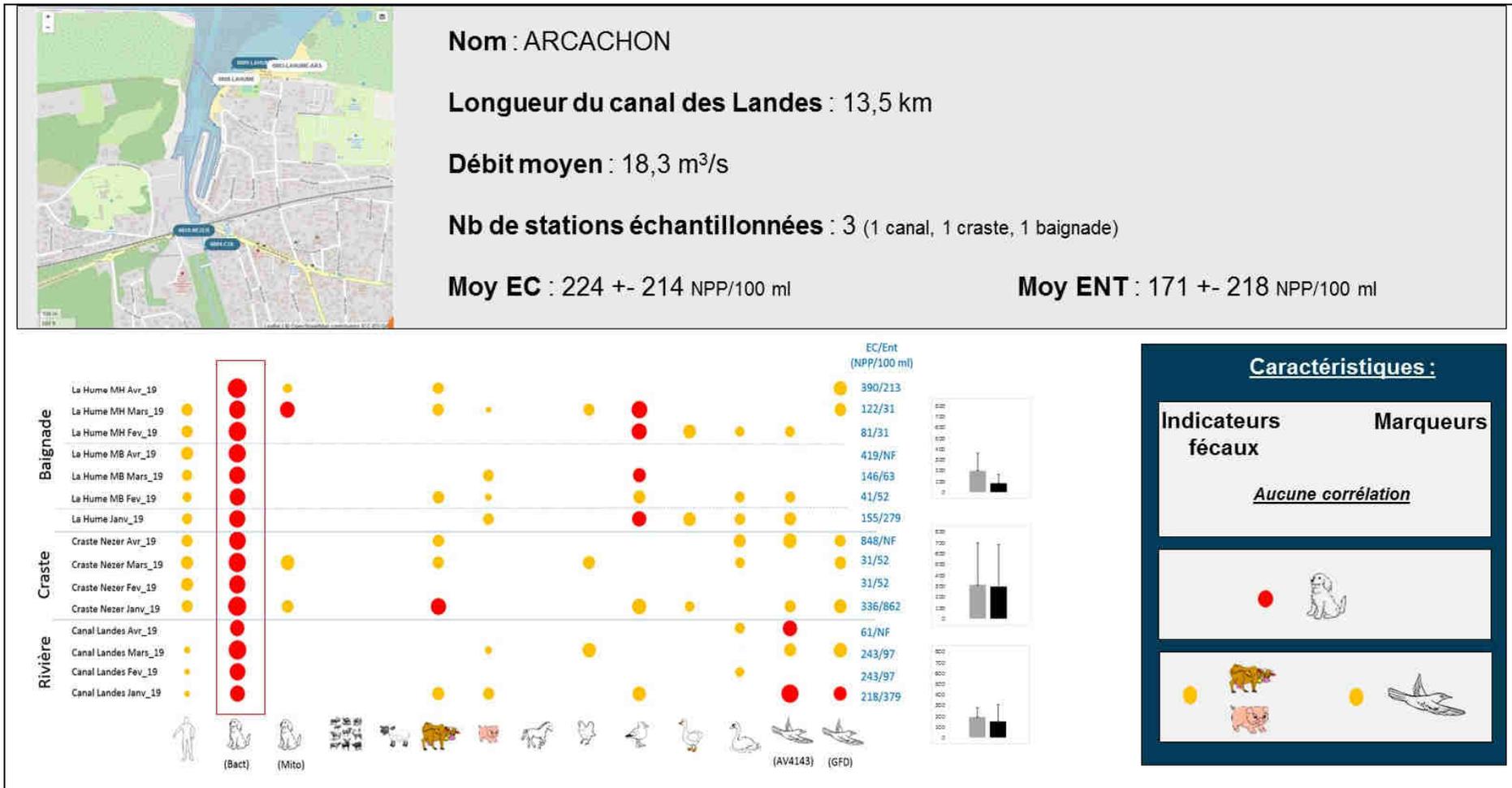


Figure 36. Profil de marqueurs PCR du Bassin d’Arcachon. Point jaune : marqueur en suspicion ; point rouge : présence du marqueur.

Sur le bassin d’Arcachon aucune corrélation n’a pu être mise en évidence. Les réponses des marqueurs sont aléatoires et non liées aux indicateurs fécaux.

**Carte d'identité du Bassin d'Arcachon**



#### 7.2.2.5 Bilan de l'application sur bassin versant des marqueurs de la trousse BacTrac :

Dans le cadre de cette étude, 4 zones géographiques, impliquant 3 bassins versants et une partie du Bassin d'Arcachon, ont été choisies de manière à en avoir un panel très diversifié en termes de taille de bassin versant et de fleuve, de fonctionnement hydrologique, de structuration infrastructurelle, de diversité des activités sur les sols et de contexte de contamination en découlant.

L'étude a permis de mettre en évidence des tendances et des caractéristiques propres à chaque bassin. Ainsi, le bassin versant de l'Untxin, bassin le plus petit de l'étude et caractérisé par des activités agricoles (essentiellement élevages de bovins) et humaines (STEP ; tourisme, habitations), par la présence de postes de déversement et d'assainissement non collectif, montre une réactivité à la pluviométrie et un profil de contamination propre au type de station considéré (Amont, Agglomération et Baignade). De plus, comme attendu par le contexte, la zone la moins contaminée demeure la zone Amont, station située sur un petit affluent de l'Untxin, au niveau d'habitations et à proximité d'une zone pastorale. Elle avait été choisie comme référence pour en déduire le bruit de fond, s'avérant d'origine humaine par analyse des marqueurs. La zone montrant le plus fort degré de contamination est l'agglomération montrant la présence en forte concentration des marqueurs attendus soit humain, canin et agricoles. Seul la présence du marqueur porcine est inattendue mais explicable par la présence de sangliers. La zone baignade est plus faiblement contaminée et est caractérisée par la présence récurrente du marqueur Laridé. Sur ce bassin, les indicateurs fécaux et les marqueurs les plus présents et la pluviométrie sont corrélés.

Le bassin versant de l'Uhabia est le bassin « intermédiaire » de l'étude avec une plus grande taille, caractérisé par des activités agricoles, des assainissements non collectifs, la présence d'une décharge à ciel ouvert comprenant environ 1000 têtes de laridés à demeure, des postes de refoulement et une fréquentation touristique élevée. C'est le bassin le plus réactif à la pluviométrie et le profil de contamination lui est totalement corrélée : le bruit de fond, basé sur les basses eaux, montre la présence d'une origine humaine (prélèvement réalisé en août) et en pluviométrie, la présence d'origine multiple (humain, canin, ruminant, bovin, laridés), la concentration des marqueurs variant avec les tranches de pluviométrie. Les indicateurs fécaux, les concentrations en marqueurs et la pluviométrie sont corrélés.

Le bassin versant de l'Adour est le plus gros bassin de l'étude comprenant un fleuve très important. La zone échantillonnée ici, restreinte à l'agglomération de Bayonne et à sa baignade, est caractérisée par la présence de nombreuses stations d'épuration. Seul le marqueur humain est donc attendu. Deux stations évaluant les apports amont à l'Adour (partie est de l'Adour et Nive) ont été également choisies. Ce bassin est caractérisé par une réactivité très importante au débit. Par conséquent, le profil de contamination est dépendant du type de débit considéré. En débit faible, considéré comme le bruit de fond, le marqueur Laridés est prépondérant. Le débit stable est caractérisé par des origines humaines, canines et laridés, comme attendu. En débit ascendant, les mêmes marqueurs que précédemment restent présents avec un apport des marqueurs agricoles par les zones amont, en fortes concentrations. Les indicateurs fécaux, les marqueurs et le débit sont fortement corrélés.

Le Bassin d’Arcachon est un cas un peu à part dans l’étude car seuls 3 stations connectées ont été considérées, couvrant un très faible périmètre du bassin. La station baignade a été choisie car elle est la seule à montrer des épisodes de contamination et à ne pas rentrer en qualité excellente par rapport aux autres baignades. L’enjeu était donc d’évaluer des pistes pour comprendre le cheminement de cette contamination. Bien que le degré de contamination soit relativement faible, les analyses de marqueurs ont montré la présence récurrente et à forte concentration du chien sur l’ensemble des stations et des campagnes. D’autres marqueurs, aviaires et agricoles, sont en suspicion. Pour compléter cette étude, il serait intéressant d’évaluer les marqueurs lors de fortes contaminations. La présence du chien sur cette zone reste cohérente avec le contexte de lieu promenade inhérent à l’ensemble du Bassin d’Arcachon.

Par cette étude sur bassins versants aux caractéristiques diversifiées, la trousse de marqueurs Bactrac a pu mettre en évidence des tendances et des profils de contaminations propres au fonctionnement et à la structure intrinsèque de chacun, liées à divers paramètres tels que la pluviométrie, le débit ou encore l’activité. La trousse a également permis d’évaluer le bruit de fond qui peut donner des informations utiles sur un apport faible mais chronique. Comme attendu, les contaminations sont généralement multisources. Cette étude met également en lumière l’importance du plan d’échantillonnage et l’échantillonnage multiple permettant de consolider les conclusions.

### 7.2.3 Cas de contamination inexpliquée

Dans le cadre du projet, une station, révélant des cas de fortes contaminations inexpliquées depuis 2016, a été retenue pour un test à l’aveugle. Elle est située sur l’Uronea, qui se jette dans l’Uhabia et dont la source est inconnue, et se trouve à proximité de la station d’épuration de Bidart, d’habitations et d’un bassin de rétention.

Les degrés de contamination sur l’ensemble des campagnes montrent que, comme sur le reste du bassin versant, cette station répond fortement à la pluviométrie. Les tranches montrant les dénombrements les plus importants sont « 10-25 mm/24h » et « >25 mm/24h » avec des moyennes respectives de  $2250 \pm 1937$  et  $3105 \pm 2397$  *E coli*/100 ml et de  $755 \pm 841$  et  $3160 \pm 2743$  entérocoques/100 ml (Figure 37). Les autres tranches ne dépassent pas 520 *E coli* et 580 entérocoques/100 ml. Lors d’un évènement pluvieux dépassant 10 mm/24h, la station montre donc une forte contamination dont les origines ont été recherchées par la trousse BacTrac. Les autres tranches de pluviométrie, ne révélant aucune contamination, permettront également d’en évaluer le bruit de fond présent.

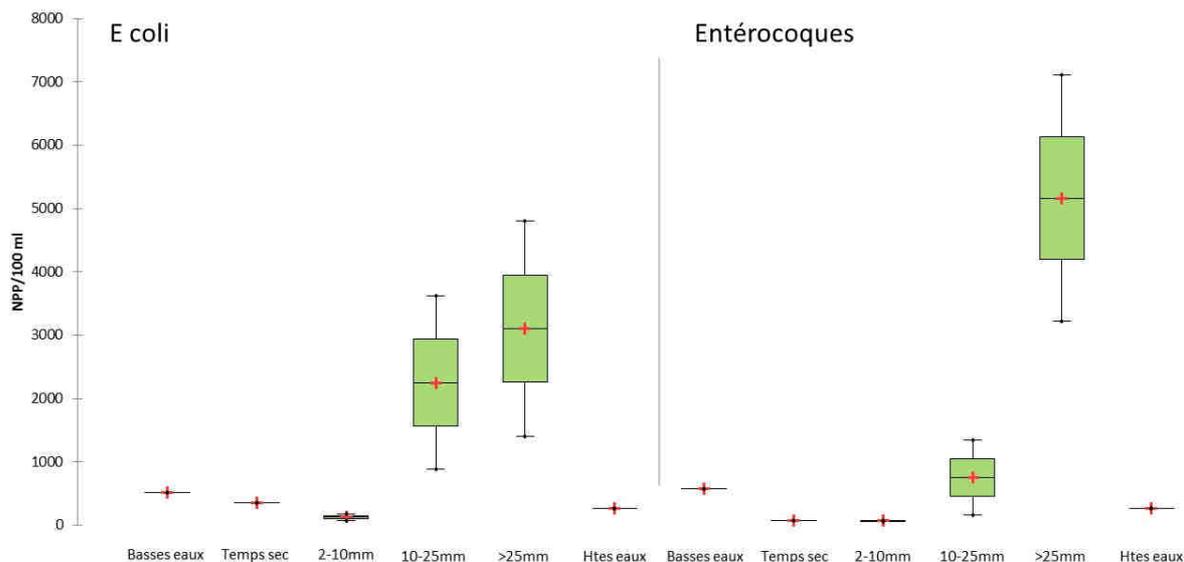


Figure 37. Dénombrements des indicateurs fécaux (*E coli* et entérocoques) par tranches de pluviométrie pour la station Uronea (UHA-5).

Le profil de contamination pour chaque campagne est présenté en Figure 38. Deux origines de contamination récurrentes ressortent de ce profil : l'humain et le canin. Il existe donc un bruit de fond lié à ces deux sources, bruit intensifié en cas de pluie de 10 à 25 mm et très intensifié pour des pluies supérieures à 25 mm.

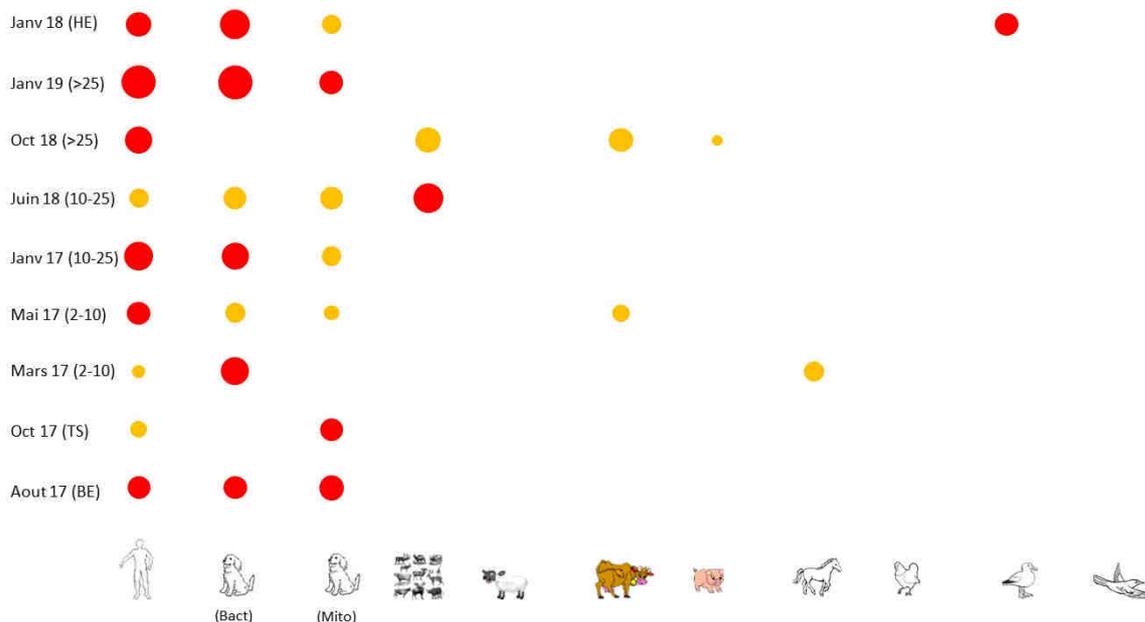


Figure 38. Profil de contamination de la station UHA-5 prélevée sur l'Uronea.

Les origines détectées par la trousse sont en adéquation avec le contexte de cette station, située effectivement à proximité d'une zone d'habitation et d'une zone aménagée pour la promenade.

## 8 Méthodologie BacTrac : description et recommandations

L'évaluation des marqueurs de contamination sur des fèces cibles et non cibles ainsi que les différentes études réalisées dans ce projet de recherche ont permis d'établir une méthodologie complète d'identification des sources de contamination fécales dans les eaux, applicable dans divers contextes, dans laquelle s'intègre la trousse de marqueurs développée (Figure 39).

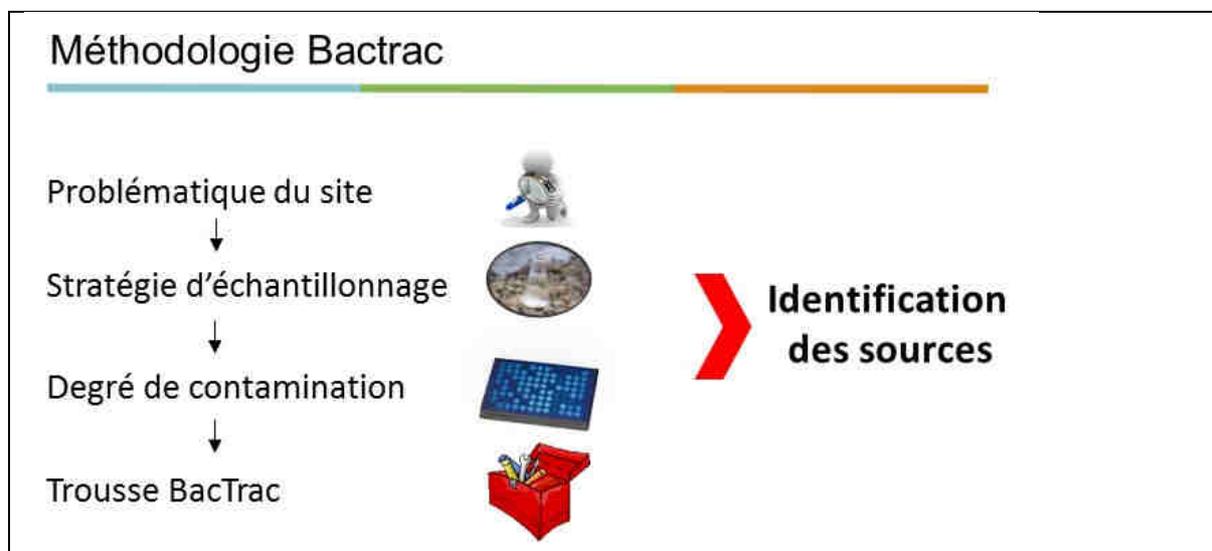


Figure 39. Schématisation de la méthodologie BacTrac.

La méthodologie est constituée de 4 grandes étapes, la connaissance de la problématique du site, la stratégie d'échantillonnage, l'évaluation du degré de contamination et l'application de la trousse BacTrac. Chaque étape est détaillée par la suite.

### - Problématique du site

Lors d'une recherche d'origine de contamination, il est indispensable d'avoir une très bonne connaissance du contexte infrastructurel, des activités agricoles et anthropiques, du fonctionnement hydrologique, de l'historique de contamination en termes de degré, basé sur la mesure des indicateurs fécaux, .... Un maximum d'informations doit être compilé et ces informations doivent être mises en relation les unes avec les autres afin de permettre et de faciliter l'interprétation de l'analyse technique.

### - Stratégie d'échantillonnage

Cette étape est cruciale pour l'interprétation. En effet, de cette stratégie découle directement la capacité à interpréter un profil de contamination et à confirmer une origine par la récurrence de la présence du ou des marqueurs. Les études BacTrac ont permis de mettre en évidence l'importance de la répétition des campagnes dans diverses conditions de pluviométrie et également, de la réalisation d'un prélèvement amont et d'un prélèvement aval de la source soupçonnée pour en confirmer l'origine. En effet ; une analyse ponctuelle sur un seul prélèvement ne donnera que très peu d'informations et ne sera pas interprétable pour déterminer la source de contamination.

- Degré de contamination

Le degré de contamination permet de déterminer le niveau de qualité d'une eau analysée vis-à-vis des seuils officiels fixés pour les baignades (directive 2006/7/CE). Ces seuils permettent ainsi de classer les eaux comme contaminées ou non contaminées et participent à l'interprétation des marqueurs déterminés. Il est réalisé à l'aide des techniques de dénombrements par méthodes de microbiologie selon la norme NF EN ISO 9308-3 ou par méthode de PCR en temps réel.

Il est généralement recommandé d'analyser les marqueurs en prenant en compte les seuils de classement de qualité des eaux de baignade (directive 2006/7/CE) afin de déterminer une contamination avérée (Mauffret et al, 2012 ; Jardé et al, 2018). Ces seuils sont les suivants, se basant sur le seuil de basculement entre un classement d'excellente qualité à un classement de bonne qualité :

	Eaux intérieures (eaux douces)	Eaux côtières et eaux de transition (eaux de mer)
Escherichia coli (NPP/100 ml)	500	250
Entérocoques (NPP/100 ml)	200	100

Cependant, les études de bassins versants du projet BacTrac ont montré que la trousse de marqueurs était fonctionnelle quel que soit le degré de contamination. Afin de retenir un référentiel et selon le besoin, les marqueurs pourraient donc être déterminés dans le cadre d'un bruit de fond en cas de dénombrements inférieurs aux seuils de qualité et déterminés dans le cadre d'une contamination avérée si les dénombrements sont supérieurs à ces seuils.

Notons que le bruit de fond permet d'appréhender un apport faible chronique d'une ou plusieurs source(s) et peut apporter des informations sur le fonctionnement ou la susceptibilité d'un site. Mesurer le bruit de fond peut être également intéressant sur les cours d'eau alimentant la baignade, car un cours d'eau, de par sa longueur en amont par exemple, peut être sujet à des rejets chroniques impactant cette baignade.

Quoi qu'il en soit, il est indispensable de garder en tête qu'une stratégie d'analyse par marqueurs en fonction des dénombrements doit se faire selon les connaissances du contexte local et de l'historique de contamination. En effet, le référentiel cité précédemment pourrait ne pas être adapté lors d'une recherche d'une origine de contamination si l'historique de contamination propre à une zone d'étude montre de base un bruit de fond supérieur aux seuils réglementaires. Ainsi, le plus fort degré de contamination possible est idéal pour confirmer une source dans le cas d'une contamination ponctuelle ou récurrente, avec une répétition des échantillonnages pour le dernier cas. Dans le cas d'une étude de bassin versant, il est idéal de prendre en compte divers degrés de contamination dans diverses conditions environnementales (pluviométrie, hydrologie, typologie) pour en comprendre le fonctionnement général et ainsi en hiérarchiser les sources, y compris provenant du bruit de fond.

- Trousse Bactrac

La trousse Bactrac est constituée au total, à ce jour, de 13 marqueurs PCR permettant de cibler 11 sources (humain, ruminant, ovin, bovin, canin, porcin, volaille, Laridés, oiseau général, oie, cygne). Elle est constituée de marqueurs ciblant des bactéries intestinales ou des mitochondries, constitutives des cellules de l'hôte. Le choix des marqueurs à tester pour analyse doit être orienté par les étapes précédentes et notamment par l'étude de la problématique du site d'intérêt, en précisant les sources susceptibles et identifiées comme telles d'être à l'origine d'une contamination, afin d'obtenir une interprétation la plus fine et précise possible. Ainsi, une stratégie d'analyse par marqueur unique ou par groupes de marqueurs pourra être adoptée. Notons que les différentes études de *Microbial Source Tracking* (cette présente étude ; Jardé et al., 2018) ont montré que la plupart du temps, les cas de contamination sont multisources. Quoiqu'il en soit, le choix des marqueurs doit se faire au cas par cas.

- Interprétation : identification des sources de contamination

L'interprétation des résultats des marqueurs se fait en mode qualitatif en se basant sur la limite de quantification PCR permettant de déterminer le statut du marqueur en tant que « présence », « absence » ou « suspicion ». Chaque marqueur analysé sera ainsi statué et l'ensemble des informations acquises lors des précédentes étapes sera alors rassemblé afin de conclure à une interprétation générale en termes de sources de contamination de l'échantillon voire de la station si le nombre de campagnes et les conditions le permettent. En cas d'étude à grande échelle sur bassin versant, l'interprétation pourra se faire en termes de tendances générales de fonctionnement de bassins, comme décrit en 7.2.2.

L'accès aux proportions de chaque source lors d'une contamination multisources, cas le plus fréquent, n'est pour le moment pas possible. Les LPL travaillent actuellement sur le sujet. Une étude de faisabilité a permis d'orienter les recherches sur la possibilité d'évaluer les proportions des sources humaines et des sources non humaines. Une méthode de définition des proportions de chacune des espèces est difficilement accessible et ne sera pas développée. Ce point particulier fera l'objet d'une note spécifique ne figurant pas dans ce rapport.

## 9 Valorisation du projet

Le projet Bactrac a pu être présenté à plusieurs reprises lors de conférences nationales et internationales, et a permis également de valider le diplôme de plusieurs étudiants. Le détail des différentes actions de communication et de valorisation est décrit par la suite.

### 9.1 Communications orales

- S. Béat. Table ronde. Séminaire GIS Littoral Basque, Bidart, 27 novembre 2019.
- M. Gourmelon et al. Persistence of Microbial Source Tracking markers, *E. coli* genotypes and fecal indicator bacteria in seawater and freshwater microcosms, 20<sup>th</sup> International Symposium on Health Related Water Microbiology, Vienne, 15-20 septembre 2019.

- I. Vitte. Présentation du programme, Commission territoriale littorale du Comité de Bassin Adour-Garonne, Centre Condorcet, Pessac, 13 mai 2019
- S. Bétat. Présentation du programme, Commission territoriale littorale du Comité de Bassin Adour-Garonne, 8 décembre 2017
- I. Vitte. Présentation du programme, 2ème conférence sur l'eau, 4 novembre 2016, Anglet

## 9.2 Présentations par affiche

- M. Gourmelon et al. Validation of an avian MST toolbox to identify bird fecal pollution in environmental waters in France, 20th International Symposium on Health Related Water Microbiology, Vienne, 15-20 septembre 2019.
- I. Vitte et al. Development of the BacTrac Microbial Source Tracking toolbox and its application on a large environmental study to identify fecal pollution in French waters. SETAC Europe 30th Annual Meeting, 3-7 mai 2020. Résumé accepté.

## 9.3 Rapports de stage diplômants

- Leïla Lachkar, Stage de licence professionnelle biotechnologie à l'université de Pau et des pays de l'Adour, en alternance. Année 2016-2017.
- Antoine Sabourin. Stage de Master Bioinformatique, Biostatistique de l'Université de Nantes. 2017.
- Solène Tropis. Stage de BTS Analyses Agricoles Biologiques et Biotechnologiques du LGETA de Blanquefort. 2017.
- Floriane Dupreuilh. Stage de Licence Sciences de la Vie de l'Université de Bordeaux. 2018.
- Luc Dantan, Stage de M2 Microbiologie, Janv-Juin 2019.
- Lauriane Limozin, Stage de licence professionnelle biotechnologie à l'université de Pau et des pays de l'Adour. Année 2018-2019.
- Paula Mesnard. Stage de BTSA ANABIOTEC du Lycée de l'Agricampus Rodez La Roque, session 2019.

## Références bibliographiques

Ahmed W, Harwood VJ, Nguyen K, Young S, Hamilton K, Toze S., 2016. Utility of *Helicobacter* spp. associated GFD markers for detecting avian fecal pollution in natural waters of two continents. *Water Research* 88:613-622.

Bae S and Wuertz S. 2015. Decay of host-associated *Bacteroidales* cells and DNA in continuous-flow freshwater and seawater microcosms of identical experimental design and temperature as measured by PMA-qPCR and qPCR. *Water Research* 70 (1) : 205-213.

Ballesté E., C. Garcia-Aljaro and A.R. Blanch. 2018. Assessment of the decay rates of microbial source tracking molecular markers and faecal indicator bacteria from different sources. *Journal of Applied Microbiology*, 125 : 1938-1949c

Bernhard AE and Field KG. 2000. Identification of nonpoint sources of fecal pollution in coastal waters by using host-specific 16S ribosomal DNA genetic markers from fecal anaerobes. *Appl Environ Microbiol.* 66(4):1587-94.

Boehm A.B., Van De Werfhorst L.C., Griffith J.F., Holden P.A., Jay J.A., Shanks O.C., Wang D. and Weisberg S.B (2013). Performance of forty-one microbial source tracking methods: A twenty-seven lab evaluation study. *Water Research* 47 : 6812-6828.

Brown, K.I., Graham, K.E., Soller, J.A., and Boehm, A.B. 2017. Estimating the probability of illness due to swimming in recreational water with a mixture of human- and gull-associated microbial source tracking markers. *Environ Sci Process Impacts.* 19(12):1528-1541.

Callahan BJ, McMurdie PJ and Holmes SP.2017. Exact sequence variants should replace operational taxonomic units in marker-gene data analysis. *The ISME Journal* 11: 2639-2643

Coelho LP, Kultima JR, Costea PI, Fournier C, Pan Y, Czarnecki-Maulden G, Hayward MR, Forslund SK., Benedikt Schmidt TS, Descombes P, Jackson JR., Li Q and Bork P. 2018. Similarity of the dog and human gut microbiomes in gene content and response to diet. *Microbiome* 6 (72).

Dick LK, Bernhard AE, Field KG et al 2005 Host distribution of uncultivated fecal Bacteroidales bacteria reveal genetic markers for fecal source identification. *Appl Environ Microbiol* 71 (6) : 3184-3191.

Directive 2006/7/CE du Parlement européen et du Conseil du 15 février 2006 concernant la gestion de la qualité des eaux de baignade et abrogeant la directive 76/160/CEE. Numéro d'identification : 32006L0007.

Ebentier DL, Hanley KT, Cao Y, Badgley BD, Boehm AB, Ervin JS, Goodwin KD, Gourmelon M, Griffith JF, Holden PA, Kelty CA, Lozach S, McGee C, Peed LA, Raith M, Ryu H, Sadowsky MJ, Scott EA, Santo Domingo J, Schriewer A, Sinigalliano CD, Shanks OC, Van De Werfhorst LC, Wang D, Wuertz S, Jay JA, 2013. Evaluation of the repeatability and reproducibility of a suite of qPCR-based microbial source tracking methods. *Water Research* 47:6839-6848.

Ferguson D and C. Signeretto. 2011. Environmental persistence and naturalization of fecal indicator organisms. pp 379 – 398. In Hagedorn C, Blanch A. R. and Harwood V. (Eds): Microbial source tracking: methods, applications and case studies. Springer. ISBN 978-1-4419-9385-4.

Garabetian F, E. Lyautey, L. Bourasseau, G. Daffe, E. Girault, F. Jude-Lemeilleur, M. Leconte, E. Persilié, N. Raymond, A. Thévand, I. Vitte. 2013. Identification des sources de contamination fécales en milieu côtier (IDFEC), Validation d'une base de données de Microbial Source Tracking pour le bassin d'Arcachon. TSM numéro 4 108e année.

Gourmelon M., Quenot E., Charrier A., Lesne M., Jouanillou A., Boukerb A., Lachkar L., Dantan L., Weidhaas J., Vitte I., 2019. Validation of an avian MST toolbox to identify bird fecal pollution in environmental waters in France, 20<sup>th</sup> International Symposium on Health Related Water Microbiology, Vienne, 15-20 septembre 2019.

Green, H.C., Dick, L.K., Gilpin, B., Samadpour, M., and Field, K.G. 2012. Genetic markers for rapid PCR-based identification of gull, Canada goose, duck, and chicken fecal contamination in water. *Appl Environ Microbiol* 78: 503-510.

Harwood J.J. 2014. Molecular markers for identifying municipal, domestic and agricultural sources of organic matter in natural waters. *Chemosphere*, 95 : 3-8.

Harwood V. J., Staley C., Badgley B. D., Borges K and Korajkic A. 2014. Microbial source tracking markers for detection of fecal contamination in environmental waters: relationships between pathogens and human health outcomes. *Fems Microbiology Reviews*, 38 : 1-40.

Ishii S and Sadowsky MJ. 2008. *Escherichia coli* in the environment: implications for water quality and human health. *Microbes and Environments*, 23(2) : 101-108

Jardé E., Jeanneau L., Harrault L., Quenot E., Solecki O., Petitjean P., Lozach S., Chevé J., Gourmelon M. 2018. Application of a microbial source tracking based on bacterial and chemical markers in headwater and coastal catchments. *Science of the Total Environnement*, 610-611: 55-63.

Jeanneau L., Solecki O, Wéry N, Jardé E, Gourmelon M, Communal PY, Jadas-Hécart A, Caprais MP, Gruau G, and Pourcher AM. 2012. Relative decay of fecal indicator bacteria and human-associated markers: a microcosm study simulating wastewater input into seawater and freshwater. *Environmental Sciences and Technology*, 46 : 2375-2382

Kildare BJ, Leutenegger CM, McSwain BS, Bambi DG, Rajal BV and Wuertz S. 2007. 16S rRNA-based assays for quantitative detection of universal, human-, cow-, and dog-specific fecal Bacteroidales: A Bayesian approach. *Water Research* 41 : 3701-3715.

Korajkic A, McMinn BR, Ashbolt NJ, Harwood VJ, Shanks OC, Fout GS and Ashbolt NJ. 2013. Differential decay of enterococci and *Escherichia coli* originating from two fecal pollution sources. *Applied Environmental Microbiology*, 79 : 2488-2492.

Korajkic A, McMinn BR, Ashbolt NJ, Sivaganesan M, Harwood VJ and Shanks OC. 2019. Extended persistence of general and cattle-associated fecal indicators in marine and freshwater environment. *Science of the Total Environment*, 650 : 1292-1302.

Lu J, Santo Domingo JW, Lamendella R, Edge T and Hill S. 2008. Phylogenetic Diversity and Molecular Detection of Bacteria in Gull Feces. *Appl Env Microbiol* 74 (13) : 3969-3976.

Lyautey E, Lu Z, Lapen DR, Wilkes G, Scott A, Berkers T, Edge TA and Topp E. 2010. Distribution and diversity of *Escherichia coli* populations in the South Nation River drainage basin, eastern Ontario, Canada. *Appl Environ Microbiol.* 76(5):1486-96.

Mattioli MC, Sassoubre LM, Russell TL and Boehm AB. 2017. Decay of sewage-sourced microbial source tracking markers and fecal indicator bacteria in marine waters. *Water Res.* 1(108) :106-114.

Mauffret A, Caprais MP, Gourmelon M., 2012. Relevance of *Bacteroidales* and F-specific RNA bacteriophages for efficient fecal contamination tracking at the level of a catchment in France. *Appl Environ Microbiol.* 78(15):5143-5152.

Mieszkin S., Furet J.P., Corthier G. and Gourmelon M., 2009. Estimation of pig fecal contamination in a river catchment by real-time PCR using two pig-specific *Bacteroidales* 16S rRNA genetic markers, *Applied and Environmental Microbiology*, 75 : 3045-3054.

Mieszkin S., Yala J.-F., Joubrel R. and Gourmelon M. 2010. Phylogenetic analysis of *Bacteroidales* 16S rRNA gene sequences from human and animal effluents and assessment of ruminant faecal pollution by real-time PCR. *J Appl Microbiol.* 2010 Mar;108(3):974-84.

NF U 47-600. 2015. Méthodes d'analyse en santé animale. Norme française, AFNOR.

Ohad, S., Ben-Dor, S., Prilusky, J., Kravitz, V., Dassa, B., Chalifa-Caspi, V. et al. 2016. The Development of a Novel qPCR Assay-Set for Identifying Fecal Contamination Originating from Domestic Fowls and Waterfowl in Israel. *Front Microbiol* 7: 145.

Raith MR, Kelty CA, Griffith JF, Schriewer A, Wuertz S, Mieszkin S, Gourmelon M, Reischer GH, Farnleitner AH, Ervin JS, Holden PA, Ebentier DL, Jay JA, Wang D, Boehm AB, Aw TG, Rose JB, Balleste E, Meijer WG, Sivaganesan M, Shanks OC. 2013. Comparison of PCR and quantitative real-time PCR methods for the characterization of ruminant and cattle fecal pollution sources. *Water Research* 47:6921-6928.

Ryu H, Griffith JF, Khan IUH, Hill S, Edge TA, Toledo-Hernandez C, Gonzalez-Nieves J and Santo Domingo J. 2012. Comparison of Gull Feces-Specific Assays Targeting the 16S rRNA Genes of *Catellibacterium marimammalium* and *Streptococcus* spp. *Appl and Environ Microbiol* 78 (6) : 1909–1916.

Schill W.B. and Mathes M.V. 2008 Real-time PCR detection and quantification of nine potential sources of fecal contamination by analysis of mitochondrial cytochrome b targets. *Environmental Science and Technology* 42(14) : 5229-5234.

Solecki O, Jeanneau L, Jardé E, Gourmelon M, Marin C, and Pourcher AM, 2011. Persistence of microbial and chemical pig manure markers as compared to faecal indicator bacteria survival in freshwater and seawater microcosms. *Water Research*, 45(15) : 4623-4633.

Sinigalliano, C.D., J.M. Fleisher, M.L. Gidley, H.M. Solo-Gabriele, T. Shibata, L.R.W. Plano, S.M. Elmir, D. Wanless, J. Bartkowiak, R. Boiteau, K. Withum, A.M. Abdelzaher, G. He, C. Ortega, X. Zhu, M.E. Wright, J. Kish, J. Hollenbeck, T. Scott, L.C. Backer, and L.E. Fleming. Traditional and molecular analyses for fecal indicator bacteria in non-point source subtropical recreational marine waters. *Water Research* 44(13) : 3763-3772.

Tambalo DD, Fremaux B, Boa T and Yost CK. 2012. Persistence of host-associated Bacteroidales gene markers and their quantitative detection in an urban and agricultural mixed prairie watershed. *Water Res.* 46(9):2891-904.

Vadde KK, McCarthy AJ, Rong R, Sekar R., 2019. Quantification of Microbial Source Tracking and Pathogenic Bacterial Markers in Water and Sediments of Tiaoxi River (Taihu Watershed). *Front Microbiol* 24;10:699.

Villemur R., Imbeau M., Vuong M.N., Masson L., and Payment P. 2015. An environmental survey of surface waters using mitochondrial DNA from human, bovine and porcine origin as fecal source tracking markers. *Water Res.*, 69 : 143-153.

Weidhaas, J. and Lipscomb E. (2013). A new method for tracking poultry litter in the Potomac Basin headwaters of West Virginia, *Journal of Applied Microbiology*, 115(2) : 445-54.

Xue, J., Lin, S., Lamar, F.G., Lamori, J.G. and Sherchan, S. 2017. Assessment of fecal pollution in Lake Pontchartrain, Louisiana. *Mar Pollut Bull.* 129(2):655-663.

Yahya M, Blanch AR, Meijer WG, Antoniou K, Hmaied F, Ballesté E. Comparison of the Performance of Different Microbial Source Tracking Markers among European and North African Regions. *J Environ Qual.* 2017 Jul;46(4):760-766.

Zhang Y, Wu R, Lin K, Wang Y, Lu J., 2020 Performance of host-associated genetic markers for microbial source tracking in China. *Water Res.* 2;175:115670.

ANNEXE

# Validation of an avian MST toolbox to identify bird fecal pollution in environmental waters in France

Gourmelon Michèle<sup>1</sup>, Quenot Emmanuelle<sup>1</sup>, Charrier Amélie<sup>2</sup>, Lesne Mélanie<sup>2</sup>, Jouanillou Adeline<sup>2</sup>, Boukerb Amine<sup>1</sup>, LachkarLeïla<sup>2</sup>, Dantan Luc<sup>1</sup>, Weidhaas Jennifer<sup>3</sup>, Vitte Isabelle<sup>2</sup>

✉ Michele.Gourmelon@ifremer.fr

<sup>1</sup> IFREMER, RBE-SCMM-LSEM, 29280 Plouzané, France

<sup>2</sup> Laboratoires des Pyrénées et des Landes, Lagor, France

<sup>3</sup> Civil and Environmental Engineering, University of Utah, Salt Lake City, Utah, United States



Environmental water quality can be impaired by bird droppings due to the presence of bacterial pathogens. The aim of this study was to evaluate the performances of a selection of Microbial Source Tracking (MST) markers targeting birds by screening avian and non-avian fecal samples from two contrasting regions in France (Brittany and New Aquitaine).

## Sampling sites and description of fecal samples

**Brittany** (Fig. 1): collection of shorebird feces (n=86), poultry feces and litter samples (n=31) and non avian feces and effluent samples (n=55). Environmental waters (n=48) were sampled in two rivers in an coastal intensive livestock farming area<sup>1</sup>.

**New Aquitaine** (Fig. 1): collection of wild bird feces (n=92), poultry (n=107) and non avian feces samples (n=275). Environmental waters (n=46) were sampled at 6 sites potentially contaminated by wild bird or duck droppings.



Fig 1: Sampling sites

## Materials & methods

**Brittany samples were analyzed at Ifremer (LSEM).** DNA extracted from fecal (250 mg) and water (filters of 1 L water) samples using Fast DNA for soil kit (MP Biomedicals).

5 avian qPCR assays targeting *Helicobacter* spp. (GFD<sup>2</sup>; general bird marker), *Lactobacillus* spp. (AV4143<sup>3</sup>; general bird marker), Firmicutes (AV43<sup>3</sup>; poultry marker), *Brevibacterium* (LA35<sup>4</sup>; poultry litter marker) and *Catellibacoccus marimammalius* (Gull4<sup>5</sup>; gull marker). Limit of Quantification (LQ) of these qPCR markers was set at 10, 10, 10, 5, and 5 gene copies per PCR well, respectively.

**New Aquitaine samples were analyzed at LPL.** DNA extracted from fecal (15 mg) and water (filters of 0.1 L water) samples using NucleoSpin Soil Extraction Kit (Macherey Nagel). The same avian qPCR assays as above except for the gull marker (Gull2<sup>6</sup>). LQ was set at 100 gene copies.

## Results on MST markers sensitivity & specificity

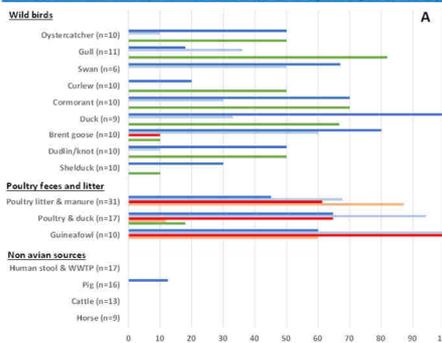
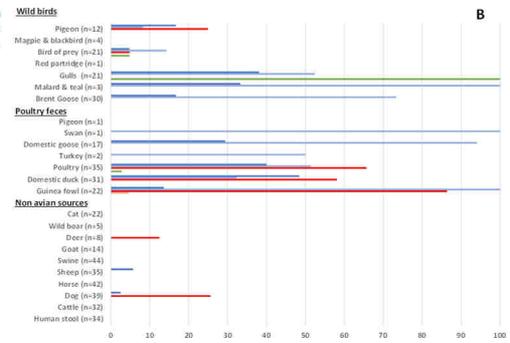


Fig 2: Presence of avian markers in avian fecal and non-avian fecal samples in Brittany (A) and in New Aquitaine (B).



When used in combination, general bird markers (GFD and AV4143) both allowed the identification of a bird source in 67.4% and 73.6% of avian fecal samples in Brittany and New Aquitaine, respectively (Fig. 2A-2B). The LA35 marker was confirmed to be an efficient poultry litter marker in Brittany with 87.1% positive samples but only 29.7% in poultry feces. The AV43 marker was poultry-associated and quantified in 70.2% of the Brittany and 66.7% of the New Aquitaine samples. The gull markers (i.e. Gull4 in Brittany and Gull2 in New Aquitaine) were frequently detected in gull feces in both regions (81.8% and 100%, respectively). The frequent detection of Gull4 marker in seabirds suggests that it could be a shorebird marker in France (Fig. 2A and Fig. 3). These markers had a specificity above 96%.

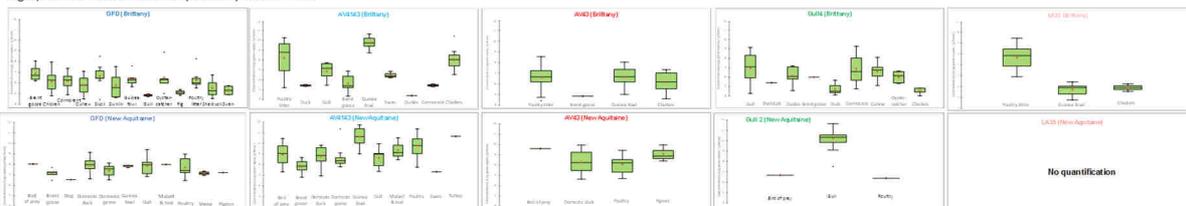


Fig 3: Boxplots of concentrations of GFD, AV4143, Gull4, AV43, LA35 avian-associated markers in fecal samples. Values below the LQ were not considered. The concentrations are expressed in log<sub>10</sub> gene copies/g.

Higher concentrations of the AV4143 marker than the GFD marker were obtained in the avian feces samples. Higher concentrations of the LA35 marker were obtained in the poultry litter samples than the poultry feces samples. Similar concentrations of the Gull4 marker were obtained in cormorant and wading bird fecal samples.

## Application on environmental waters (Brittany & New Aquitaine)

Table 1: Presence of avian MST markers in sampling sites (Values below the LQ were not considered).

Sites	Context	No. of samples	[E. coli] [mean ± SD]	[Enterococci] [mean ± SD]	GFD	AV4143	AV43	LA35	Gull4
Brittany	B1 Intensive livestock production	24	3.64 ± 0.92	1.97 ± 1.11	4.2%	0%	0%	0%	0%
	B2 Intensive livestock production	24	3.66 ± 0.78	1.81 ± 1.01	4.2%	0%	4.2%	0%	0%
New Aquitaine	Aqui-1 Station located in altitude near several fish farms with a high concentration of cormorans	9	2.57 ± 0.48	1.77 ± 0.75	0%	33.3%	0%	0%	0%
	Aqui-2 Bathing station, at proximity of the harbour	7	2.44 ± 0.85	2.06 ± 0.73	0%	0%	0%	0%	100%
	Aqui-3 Station located in farming area dominated by poultry (ducks)	9	3.37 ± 0.53	2.49 ± 1.18	0%	33.3%	22.2%	0%	0%
	Aqui-4 Station located in farming area dominated by poultry (ducks)	9	3.17 ± 0.71	2.37 ± 1.24	0%	0%	22.2%	0%	0%
	Aqui-5 Station in the landfill center; permanent presence of about a thousand Laridae	6	3.17 ± 0.5	3.43 ± 0.89	0%	0%	0%	0%	66.7%
	Aqui-6 Station in downstream of the landfill center, in a farming area	6	2.83 ± 0.44	2.86 ± 0.8	0%	0%	0%	0%	66.7%

The application of these MST markers on bird-impacted and non-impacted water samples showed a relatively high occurrence of Gull2, AV4143 and AV43 markers in bird-impacted waters (New Aquitaine).

The MST markers selected in this study constitute an efficient MST toolbox to evaluate avian pollution in France.

### References

Jarde et al., 2018;<sup>2</sup> Green et al., 2011;<sup>3</sup> Chad et al., 2016;<sup>4</sup> Weidhaas and Lipscomb, 2015;<sup>5</sup> Fyfe et al., 2012;<sup>6</sup> Lu et al., 2008

### Acknowledgments

The authors would like to acknowledge Agence de l'Eau Adour-Garonne, Communauté d'Agglomération Pays Basque and Syndicat Intercommunal du Bassin d'Arcachon for their financial support and Groupement d'intérêt Scientifique Pays Basque for coordination support, on Eac Trac Project (2016-2019).



20th INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON HEALTH RELATED WATER MICROBIOLOGY, 15-20 September 2019

