

Projet Seine-Aval 5

DYNAPAT

« Impact de la dynamique particulière sur le devenir
des bactéries pathogènes dans la zone du bouchon
vaseux de l'estuaire de Seine »

2018

Coordination : Fabienne Petit

Co-Auteurs : Thierry Berthe, Olivier Barraud, Christine Cagnon,
Christophe Dagot, Julien Deloffre, Robert Duran, Robert Lafite,
Christophe Petit, Marie Cécile Ploy



GIP Seine-Aval
GROUPEMENT D'INTÉRÊT PUBLIC

TABLE DES MATIERES

RESUME EXECUTIF	4
SCIENTIFIQUES AYANT PARTICIPE AU PROJET	6
PARTICIPANTS AU SUIVI DE PROJET	6
RESULTATS	7
Introduction	7
1 1 Stratégie d'échantillonnage	11
1.1 Choix des sites d'étude	11
1.2 Positionnement hydrologique et reproductibilité des campagnes DYNAPAT (Tancarville, pK 337)	13
1.3 Conclusions	19
2 Caractérisation des particules en fonction de leur vitesse de chute (Tâche 1)	20
2.1 Rappel des objectifs	20
2.2 Conception d'un prototype pour isoler les différentes classes de particules en fonction de leur vitesse de chute	21
2.3 Caractérisation physico- chimique des floccs en fonction de leur vitesse de chute	24
2.4 Caractérisation de la composante microbiologique associée aux différentes fractions	30
3 Impact des forçages mécaniques et des processus d'érosion sur la contamination microbiologique de la colonne d'eau (Tâche 2)	39
3.1 Contexte et rappel des objectifs	39
3.2 Distribution des bactéries indicatrices de contamination fécale (<i>E. coli</i> , <i>Enterococcus</i>) et des pathogènes (<i>Aeromonas et Vibrio</i>) dans l'embouchure	39
3.3 Impact des processus d'érosion : expérimentations FLOCSIM	42
4 Occurrence et analyse de la diversité des intégrons dans les sédiments (Tâche 3)	47
4.1 Contexte et objectifs	47
4.2 Occurrence des intégrons cliniques dans les sédiments à différentes échelles spatio-temporelle	47
4.3 Diversité des intégrons environnementaux et relation avec les facteurs environnementaux	51
4.4 Diversité des intégrons environnementaux dans les sédiments de la carotte Rhapsodis	52
Conclusion	53
BIBLIOGRAPHIE	55
ANNEXE 1 : REPARTITION DES COEFFICIENTS DE MAREE (2015)	58
ANNEXE 2 : CRITERES DE CHOIX DES VITESSES DE DECANTATION	59

ANNEXE 3 : PROFILS GRANULOMETRIQUES DES CAMPAGNES DYNAPAT	60
ANNEXE 4 : ANALYSE DE LA DIVERSITE DES COMMUNAUTES BACTERIENNES	62
ANNEXE 5 : OPTIMISATION ET VALIDATION DU PROTOCOLE D'EXTRACTION DES ADN	63
ANNEXE 6 : GRANULOMETRIE DE L'ECHANTILLON DE SEDIMENT POUR LES EXPERIMENTATIONS FLOCSIM64	
ANNEXE 7 : CARACTERISTIQUES DES SEDIMENTS PRELEVES LE LONG DU TRANSECT « RISLE-EMBOUCHURE »	65



RESUME EXECUTIF

Le projet DYNAPAT s'inscrit dans l'axe 1 de l'appel à projet SA5 : « Fonctionnement hydro-morpho-sédimentaire de l'estuaire », et s'intéresse plus particulièrement à la prise en compte de la dynamique particulaire au sein du bouchon vaseux, pour comprendre le devenir des bactéries. En terme de santé humaine et environnementale, ce projet se positionne également dans l'axe 3 « Anthropisation, contaminations – ou en est le milieu ? », avec un suivi de bactéries pathogènes et d'un contaminant xénogénétique (intégrons cliniques).

Le projet DYNAPAT visait à améliorer la compréhension de la relation entre la dynamique des MES (processus de floculation) et celle des communautés microbiennes dans la zone de l'embouchure de l'estuaire, en présence du bouchon vaseux. Dans ce contexte, un des objectifs du projet DYNAPAT, était d'étudier la composante microbiologique des floes, en s'intéressant d'une part à la communauté bactérienne autochtone des floes, et d'autre part à la composante allochtone, en se focalisant sur *Escherichia coli*, espèce bactérienne indicatrice de la contamination fécale, utilisée dans le modèle de la contamination fécale en Seine (Servais et al., 2007), aux espèces pathogènes (*Vibrio* et *Aeromonas*), étendue à la problématique de l'antibiorésistance (intégron). Le projet s'est alors intéressé à: (i) caractériser la structure des composants particuliers et microbiens (dont les bactéries pathogènes) des floes, (ii) étudier l'impact du forçage hydrodynamique permanent, sur les communautés microbiennes et les populations de bactéries pathogènes (floculation et érosion des sédiments de surface), (iii) évaluer l'occurrence de bactéries pathogènes dans la zone de l'embouchure, iv) évaluer l'occurrence des intégrons de résistance (intégrons cliniques et environnementaux) dans les sédiments. Trois problématiques de santé humaine étroitement liées à la dynamique sédimentaire de cette zone de l'estuaire (site de Tancarville) ont été étudiées: 1) l'occurrence d'espèces pathogènes de *Vibrio*, bactéries autochtones de l'estuaire ; 2) l'occurrence d'*Aeromonas* dont certaines espèces sont autochtones du milieu estuarien et d'autres impliquées dans des maladies nosocomiales; 3) l'antibiorésistance bactérienne en focalisant sur les intégrons cliniques, supports génétiques impliqués dans la multi-résistance aux antibiotiques (contaminants xénogénétiques aujourd'hui comme des bio indicateurs du risque de dissémination de l'antibiorésistance dans l'environnement en parallèle aux intégrons environnementaux (marqueurs globaux d'une adaptabilité génétique aux contaminants chimiques)).

Cette étude s'appuie sur des observations *in situ* (5 campagnes) sur les site de Tancarville et des expérimentation dans le réacteur FLOCSIM. La reproductibilité des prélèvements dans l'embouchure de l'estuaire a été validée sur la base des valeurs du débit et du coefficient de marée afin de s'assurer de la présence du bouchon vaseux, sur le site de Tancarville. Un décanteur, spécifiquement développé dans le cadre de ce projet a permis de travailler sur 4 fractions enrichies en particules dont la vitesse de chute est $\geq 1 \text{ mm.s}^{-1}$ (fraction décantable F1), de $10^{-1} \text{ mm.s}^{-1}$ (fraction décantable F2), de $10^{-2} \text{ mm.s}^{-1}$ (fraction décantable F3) et $\leq 10^{-2} \text{ mm.s}^{-1}$ (fraction non décantable F4 obtenue après 4h10).

Les résultats obtenus montrent que :

En surface et lorsque le bouchon vaseux est formé

- Dans toutes les fractions on observe des floes polymorphes organo-minéraux. La taille de ces floes est plus petite dans la fraction F4 (vitesse de chute $< 0,01 \text{ mm.s}^{-1}$), alors que des floes de taille supérieure à $50 \mu\text{m}$ sont spécifiquement retrouvés dans la fraction F1 (vitesse de chute $>1 \text{ mm.s}^{-1}$).

- La composition minéralogique des floccs est essentiellement constituée d'aluminosilicates, de quartz, de carbonates; ces derniers étant plus spécifiquement retrouvés dans la fraction F4 et dans l'eau de surface.
- La diversité des microorganismes, composante organique active de ces floccs, ne présente pas de différence entre la fraction F1 et F4, et ce quelle que soit la taille du flocc, sauf pour les communautés microbiennes présentes sur les floccs de taille supérieure à 50 μm dont la vitesse de chute est $>1 \text{ mm}\cdot\text{s}^{-1}$.
- Quantitativement *E. coli* est majoritairement présente dans la fraction F4, et associée, à raison de 74%, à des particules de taille comprise entre 2 μm et 50 μm , et 26% à des particules de taille comprise entre 0,45 μm et 2 μm .
- Il n'existe pas de différence de structure de population de *E. coli* entre le fond et la surface, ni entre les différentes fractions, ce qui suggère un brassage des matières en suspension important gouverné par l'hydrodynamisme de l'estuaire. En revanche, en période de crue (et hors bouchon vaseux), la structure de la population d'*E. coli* présente dans l'eau de surface, est différente de celle observée en présence du bouchon vaseux (à basse mer et en étiage). La période de crue se caractérise par un apport plus important de souches d'origine humaine (effluent de STation de traitement des Eaux Usées - STEU), alors qu'en période d'étiage la structure des populations évoque un apport majoritairement d'origine animale (affluents intra-estuariens).
- *Aeromonas*: dans l'embouchure cohabitent des espèces autochtones de l'estuaire, des espèces spécifiquement associées au biote (copépodes) et des espèces pathogènes pour l'Homme rejetées par les STEU (qui ne sont jamais retrouvées associées aux copépodes).
- Des espèces pathogènes de *Vibrio* sont présentes dans la colonne d'eau et dans les sédiments des vasières intertidales.

Rôle des vasières dans la contamination de la colonne d'eau et le maintien des intégrons cliniques

- L'érosion des vasières intertidales est responsable d'un apport en *E. coli* et en *Vibrio* pathogènes dans la colonne d'eau ; les vasières de l'estuaire sont donc une zone dynamique où les *E. coli* et les bactéries pathogènes se déposent à pleine mer et au jusant, et sont remises en suspension dans la colonne d'eau au flot.
- Les sédiments de Seine, sont des environnements où une grande diversité d'intégrons environnementaux est retrouvé au sein des génomes des communautés microbiennes, suggérant une réponse adaptative de ces communautés à une exposition chronique aux contaminants chimiques.
- Dans les zones impactées par des rejets de STEU, les intégrons cliniques se déposent à la surface mais ne s'y maintiennent pas en fonction du temps, notamment dans les zones avec des forçages dynamiques importants (embouchure, transect « Risle – Embouchure »). En revanche dans la carotte Rhapsodis, prélevée dans une zone non soumise à des phénomènes d'érosion naturelle, les intégrons peuvent se maintenir.

En terme de valorisation, au delà d'une valorisation scientifique des résultats dans des revues à comité de lecture (1 soumise, 5 en préparation), la valorisation opérationnelle des résultats sur la vitesse de chute des populations d'*E. coli* contribuera à enrichir les modèles sur la dynamique de la contamination fécale dans la zone du bouchon vaseux, développés à Ifremer. Un guide de stratégie d'échantillonnage pourrait être proposé à destination des scientifiques ou institutionnels concernés. Les résultats sur l'occurrence des intégrons cliniques pourront être présentés au CES eaux de l'Anses et intégrés dans la revue systématique des connaissances : « Quelles sont les solutions efficaces pour lutter contre la contamination des milieux naturels en antibiotiques, résidus et bactéries résistantes ? (Fondation pour la recherche sur la biodiversité, Ministère de l'environnement, de l'énergie et de la mer).

SCIENTIFIQUES AYANT PARTICIPE AU PROJET

- **Equipe 1** : UMR M2C, Université de Rouen

Coordination scientifique : Fabienne PETIT

Autres chercheurs (ou équivalents) : Thierry BERTHE, Julien DELOFFRE, Robert LAFITE, Gautier CHAIX, Cynthia OLIVEIRA, Frédéric ROGER, Florian VAN DOOREN

- **Equipe 2** : UMR IPREM, Université de Pau et des Pays de l'Adour

Coordination scientifique : Robert DURAN

Autres chercheurs (ou équivalents) : Christine CAGNON

- **Equipe 2** : UMR INSERM 1092, Université de Limoges

Coordination scientifique : Marie Cécile PLOY

Autres chercheurs (ou équivalents) : Olivier BARRAUD, Christophe DAGOT, Margaux GASCHET

PARTICIPANTS AU SUIVI DE PROJET

Personnes ayant contribué au suivi du projet ou ponctuellement à un atelier de travail.

Acteurs de l'estuaire : Barbara Leroy (AESN)

Scientifiques : Michèle Gourmelon (Ifremer), Edith Parlanti (Université de Bordeaux)

Introduction

Contexte scientifique et contribution à Seine-Aval 5

Zone d'interface entre le domaine marin et le domaine continental, les estuaires sont des environnements soumis à d'importants rejets anthropiques liés à l'industrialisation, l'agriculture, et la démographie de leurs bassins versants. Dans le contexte du changement global (changement climatique et augmentation de la démographie humaine et animale), un des enjeux majeurs des prochaines décennies sera d'évaluer la vulnérabilité mais aussi la capacité de résilience de ces environnements à la contamination par des bactéries pathogènes. Aujourd'hui, la problématique de prolifération de bactéries pathogènes autochtones des milieux estuariens (*Vibrio*; Baker-Austin et al., 2012), l'implication de bactéries de l'environnement dans des infections d'origine nosocomiales (*Aeromonas*, *Pseudomonas*, Decker, et al., 2013; Selezska et al., 2012), ainsi que la dissémination de l'antibiorésistance sont des enjeux majeurs qui relèvent à la fois d'une problématique environnementale et de santé publique (Carlet & Le Coz, 2016; Lupo et al., 2012).

L'estuaire de Seine, est l'exutoire d'un bassin versant où vivent près de 18 millions d'habitants, majoritairement en zone urbaine, et où se concentrent 40% de l'industrie nationale et 25% de l'agriculture française (données AESN). L'eau de l'estuaire présente une contamination élevée en bactéries d'origine fécale (Servais et al., 2007; Touron et al., 2007), dont des souches d'*E. coli* multi-résistantes aux antibiotiques (Laroche et al., 2009). La dynamique de la contamination par les bactéries fécales (*Escherichia coli*, *E. coli*) est dépendante de la dynamique des matières en suspension (MES). Classiquement en sédimentologie, notamment pour des fins de modélisation, ces MES sont caractérisées par leurs vitesses de chute qui varient selon leur association aux particules (Servais et al., 2007; FLASH-SA4; FLUMES - SA4).

Dans la zone de l'embouchure de l'estuaire, les abondances en *E. coli* varient de 2 ordres de grandeur (Tancarville : 36 à 6 520 UFC.100 ml⁻¹, moyenne : 154 UFC.100 ml⁻¹; Honfleur: 36 à 4 300 UFC.100 ml⁻¹, moyenne: 338 UFC.100ml⁻¹ 1). On observe une absence de relation entre l'occurrence de *Salmonella* (bactérie pathogène d'origine fécale) et la densité en *E. coli* (bactérie indicatrice d'une contamination d'origine fécale) qui est probablement due à la complexité de la dynamique particulaire spécifique de cette zone, et un apport en bactéries fécales par la Risle, affluent de la Seine qui débouche dans l'embouchure de l'estuaire (Touron et al., 2007). Dans les vasières, zones de décantation des particules fines et les contaminants chimiques associés, l'occurrence de bactéries d'origine fécale est contrôlée par des facteurs biotiques (perte de cultivabilité), et physiques (cycles de dépôt-érosion) (Berthe et al., 2008). Or, les vasières sont aujourd'hui considérées comme des niches écologiques (« hot spot »), où les communautés microbiennes autochtones sont exposées simultanément à des concentrations sub-inhibitrices en antibiotiques, à une multi-exposition chronique aux contaminants chimiques (métalliques, biocides), auxquelles s'ajoute un apport continu en

¹ SA3: 2000-2004; Service Navigation de la Seine; 24 campagnes; Touron et al., 2007.

bactéries antibiorésistantes d'origine humaine ou animale, et donc de gènes de résistance aux antibiotiques (intégrons cliniques) (Chen et al., 2014 ; Su et al., 2014; Koczura et al., 2016; Calero-Caceres et al., 2017). Il a été démontré que la présence de contaminants métalliques, sont des facteurs favorables à la dissémination de l'antibiorésistance (Seiler et al., 2012 ; Di Cesare et al., 2016). Tout comme les intégrons cliniques, qui permettent aux bactéries pathogènes de se développer en présence d'antibiotiques, les intégrons environnementaux peuvent expliquer l'adaptabilité génétique des communautés microbiennes exposées à des contaminants chimiques (Abella et al., 2015).

La compréhension du rôle de la dynamique particulière dans l'embouchure de l'estuaire de Seine, est indispensable pour comprendre la dynamique de la contamination par des bactéries pathogènes. Dans cette zone où s'accumulent les matières en suspension (MES) d'origine continentale et marine (Le Hir et al., 2001 ; Dubrulle et al., 2007), la dynamique particulière dépendra de l'hydrodynamisme de la marée et de la stratification verticale de salinité. Dans l'embouchure de l'estuaire, les MES s'accumulent dans une zone qualifiée dans la littérature de zone maximale de turbidité (ou « bouchon vaseux ») ; Le Hir et al., 2001). Cette zone est plus ou moins étendue en fonction de l'hydrologie du fleuve, avec des valeurs maximales de concentrations pondérales en MES qui varient dans l'espace et dans le temps: en période de crue ($> 1000 \text{ m}^3 \cdot \text{s}^{-1}$) le bouchon vaseux sera expulsé en baie de Seine ; au contraire en période de bas débit, le bouchon vaseux se positionne plus à l'amont avec des valeurs maximales de MES ($2 \text{ à } 3 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$; Le Hir et al., 2001 ; Mitchell et al., 2013).

On distingue alors trois entités sédimentaires: (i) les matières en suspension dans la colonne d'eau dont les concentrations varient de quelques dizaines de $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ à $2 - 3 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, (ii) la vase fluide ou crème de vase ($> 10 \text{ à } 100 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$), dépôt cohésif correspondant à un processus de concentration des sédiments à la base de la colonne d'eau, et (iii) la vase consolidée formée après tassement des vases fluides (Le Hir et al., 2001 ; Deloffre et al., 2006). Dans un estuaire macrotidal, les importantes variations de courants de marée auxquelles peut s'ajouter la houle (voire le batillage et/ou les dragages) génèrent une forte turbulence qui impactera la structure et la répartition des particules dans la colonne d'eau, notamment lié aux processus de floculation/défloculation (Verney et al., 2007 et 2009).

Dans cet environnement, appréhender la dynamique des bactéries pathogènes et/ou des bactéries d'origine fécale, au regard de la dynamique particulière, nécessite une démarche transdisciplinaire qui se heurte en tout premier lieu à un problème de vocabulaire qui varie selon les champs disciplinaires, et qui évolue dans le temps avec l'avancée des connaissances. Le concept de floculation introduit en hydrologie dès 1993 par Eisma & Li (1993) a été reconnu comme un des processus les plus importants, qui gouverne la dynamique des MES (i.e. matériel de taille $> 0,45 \mu\text{m}$) dans la colonne d'eau. Au-delà du terme de particule dont la composition chimique et la taille peuvent être définies, la notion de floc introduit une dimension d'instabilité temporelle, liée à son aptitude à s'agréger ou à se dissocier dans la colonne d'eau, phénomène particulièrement important dans l'embouchure des estuaires (Eisma & Li, 1993 ; Maerz et al., 2017 ; Verney et al., 2009). La floculation génère des floccs plus grands dont les propriétés de sédimentation (vitesse de chute) dans la colonne d'eau seront plus élevées que celles des microflocs primaires qui en sont à l'origine (Maggi, 2009, 2013). En revanche, en écologie microbienne si la relation entre les microorganismes et les particules organo-minérales a fait l'objet de nombreuses études, notamment pour appréhender la dynamique de transfert des bactéries fécales dans la colonne d'eau (pour exemple, D'Ambrosio et al., 2014 ; Crump, 1996, 1999 ; Fries et al., 2008,

Lapoussière et al., 2011), la notion d'instabilité temporelle liée aux processus de floculation a rarement été plus rarement prise en compte. Récemment, les floccs ont été définis comme des agrégats complexes formés de particules fines inorganiques (argiles, minéraux oxyhydroxides, carbonates), reliés entre eux par des substances polymériques extracellulaire sécrétées par des microorganismes, et/ou associés à des biofilms microbiens (EPS) (Droppo, 2007, Maggi, 2009 ; Plach et al., 2011). Ces microenvironnements microbiens, correspondent à la composante organique de la majeure partie des matières en suspension de la colonne d'eau. Ressources de nutriments pour le biote, ces surfaces réactives interagissent avec les contaminants chimiques de façon spécifique et différente de celles des sédiments de surface (Maggi, 2009 ; Plach et al., 2011).

Le projet DYNAPAT s'inscrit dans le concept d'une seule santé (One Health) où la santé de l'Homme, dépend de la santé des écosystèmes. Dans la zone de l'embouchure de Seine, trois problématiques de santé humaine étroitement liées à la dynamique sédimentaire de cette zone de l'estuaire seront étudiées : 1) l'occurrence de bactéries pathogènes autochtones de la zone oligohaline de l'estuaire (les espèces pathogènes de *Vibrio* ; Fries et al., 2008); 2) l'occurrence d'espèces bactériennes du genre *Aeromonas* dont certaines espèces sont autochtones du milieu estuarien et d'autres impliquées dans des maladies nosocomiales; 3) l'antibiorésistance bactérienne en se focalisant sur les intégrons cliniques, supports génétiques impliqués dans la multi-résistance aux antibiotiques (contaminants xénogénétiques aujourd'hui comme des bio-indicateurs du risque de dissémination de l'antibiorésistance dans l'environnement (Borruso et al., 2016 ; Gillings et al., 2008 ; 2015 ; Carlet & le Coz, 2016)) en parallèle aux intégrons environnementaux (marqueurs globaux d'une adaptabilité génétique aux contaminants chimiques). Cette étude s'intéressera à trois types de bactéries, les bactéries du genre *Vibrio* sp., autochtones aux milieux estuariens dont l'espèce *V. vulnificus* pathogène pour l'homme qui est isolée dans les moules, *Aeromonas* qui est isolée dans les eaux mais aussi en milieu hospitalier, et les bactéries d'origine fécale *Enterococcus* et *Escherichia coli* (*E. coli*).

Le projet DYNAPAT s'inscrit dans l'axe 1 de l'appel à projet SA5 : fonctionnement hydro-morpho-sédimentaire de l'estuaire, et s'intéresse plus particulièrement à la prise en compte de la dynamique particulière au sein du bouchon vaseux, pour comprendre le devenir des bactéries indicatrices de la contamination fécale.

En terme de santé humaine et environnementale si on repositionne cette étude dans le contexte actuel de l'antibiorésistance, et plus particulièrement du rôle de l'environnement dans la dissémination de l'antibiorésistance, consécutif à l'alerte de l'OMS 2015, 2016, et sa déclinaison actuelle en France (Rapport Carlet 2015, revue systématique, demande de saisine de la DGS à l'Anses en cours), ce projet se positionne également dans l'axe 3 «Anthropisation, contaminations – où en est le milieu ?), avec en plus du suivi de bactéries pathogène, un suivi d'un contaminant xénogénétique (intégrons cliniques).

Rappel des objectifs et modifications apportées en cours de projet

Le projet DYNAPAT visait à améliorer la compréhension de la relation entre la dynamique des MES (processus de floculation) et celle des communautés microbiennes dans la zone de l'embouchure de l'estuaire, en présence du bouchon vaseux. Dans ce contexte, un des objectifs

du projet DYNAPAT, était d'étudier la composante microbiologique des floccs, en s'intéressant d'une part à la communauté bactérienne autochtone des floccs, et d'autre part à la composante allochtone, en se focalisant sur *Escherichia coli*, espèce bactérienne indicatrice de la contamination fécale, utilisée dans le modèle de la contamination fécale en Seine (Servais et al., 2007), aux espèces pathogènes (*Vibrio* et *Aeromonas*), étendue à la problématique de l'antibiorésistance (intégron). Le projet s'est alors intéressé à : (i) caractériser la structure des composants particulaires et microbiens (dont les bactéries pathogènes) des floccs (ii) étudier l'impact du forçage hydrodynamique permanent, sur les communautés microbiennes et les populations de bactéries pathogènes (processus de floculation-défloculation et l'érosion des sédiments de surface), (iii) évaluer l'occurrence de bactéries pathogènes dans la zone de l'embouchure iv) évaluer l'occurrence des intégrons de résistance dans les sédiments (Figure 1).

Au vu des résultats obtenus au cours de la première année du projet les modifications suivantes ont été apportées après validation par le comité de suivi du GIPSA. Tâche 2 : l'érodimétrie *in situ* et le microcosme sédiments ont été abandonnés au profit d'une expérimentation d'érodimétrie avec le prototype FLOCSIM. Tâche 3 : 1) l'analyse de la diversité des populations de *Aeromonas sp.* a été effectuée à partir de souches isolées de l'eau, du sédiment et des copépodes sur la base du séquençage des deux gènes de ménage *radA* et *gyrB*; 2) l'analyse de la diversité des communautés microbiennes a été réalisée sur la base du séquençage haut débit de l'ADN codant l'ARNr 16S, au lieu d'une approche de T-RFLP. La recherche des intégrons environnementaux comme marqueur global d'une exposition des microorganismes à des contaminants chimiques s'est substituée à la détection moléculaire des gènes de résistance aux contaminants (approche plus restrictive). Le projet a bénéficié d'un financement complémentaire du CNRS (EC2CO CNRS projet DIVINT) et de la FR 3730 SCALE, de deux doctorants financés par la FR SCALE via les dotations CPER et de la collaboration avec l'UMR MONARIS (UPMC, Paris, pour la caractérisation physico-chimique des particules).

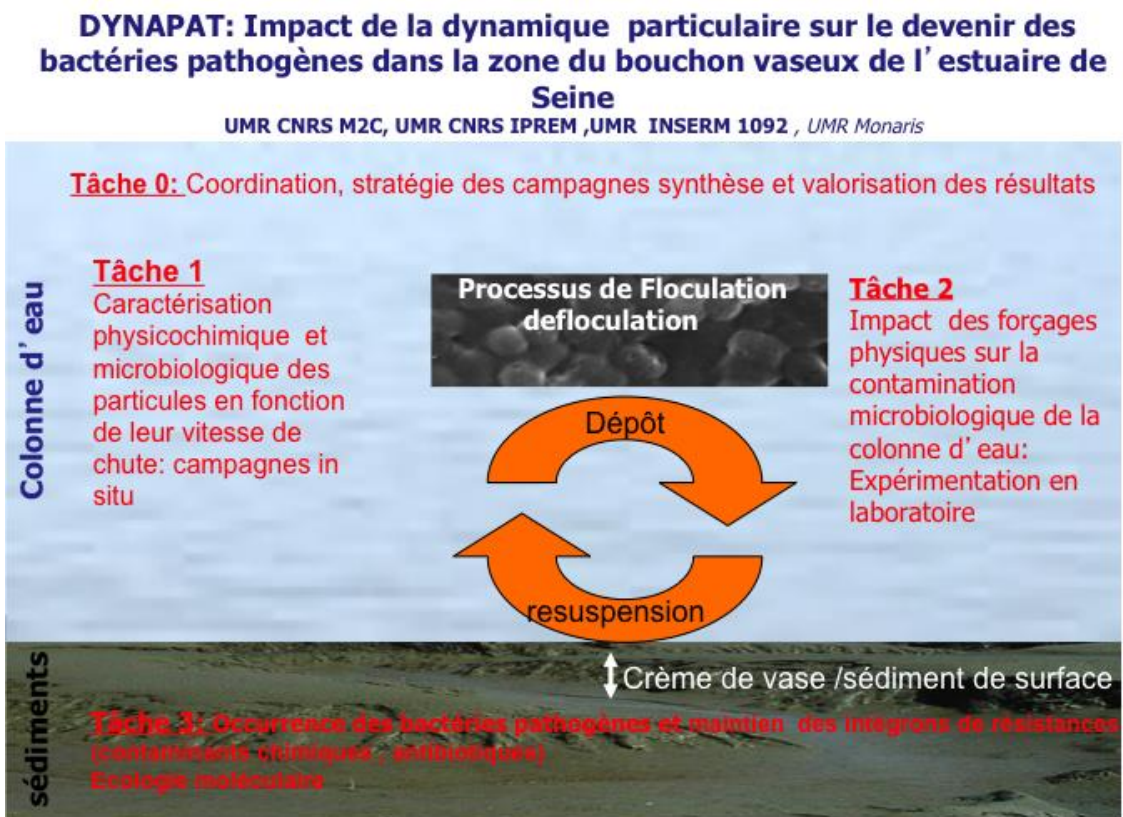


Figure 1: Structuration du projet DYNAPAT

1 1 Stratégie d'échantillonnage

1.1 Choix des sites d'étude

La relation entre la dynamique des MES et les bactéries dans la zone de l'embouchure, colonne d'eau et crème de vase a été étudiée sur le site de Tancarville (Pk : 337), où se localise le bouchon vaseux dans des conditions de débit $< 600 \text{ m}^3 \cdot \text{s}^{-1}$ (Figure 2). La rive Nord de ce site, bénéficie d'un suivi en continu des paramètres physico-chimiques de l'eau de surface et du fond : la turbidité et la conductivité (réseau SYNAPSES) et de la hauteur d'eau (GPMR). Les études menées dans le cadre des projets SUSPENSE ou HYMOSED sont mises à profit pour caractériser la dynamique des MES sur ce site.

La stratégie d'échantillonnage des sédiments pour quantifier les intégrons cliniques et environnementaux, a été choisie afin d'intégrer la dynamique particulière de la zone de l'embouchure (site de Tancarville), la dynamique spatiale (zone de dépôt le long du transect « Sébec – Risle - Embouchure », Projet FLASH), et leur persistance au cours du temps (enregistrement sédimentaire de plus de 50 ans dans une zone de dépôt non perturbée, la darse des docks à Rouen - carotte Rhapsodis ; Kaci et al.; 2014 et 2016 ; Vrel et al., 2013).

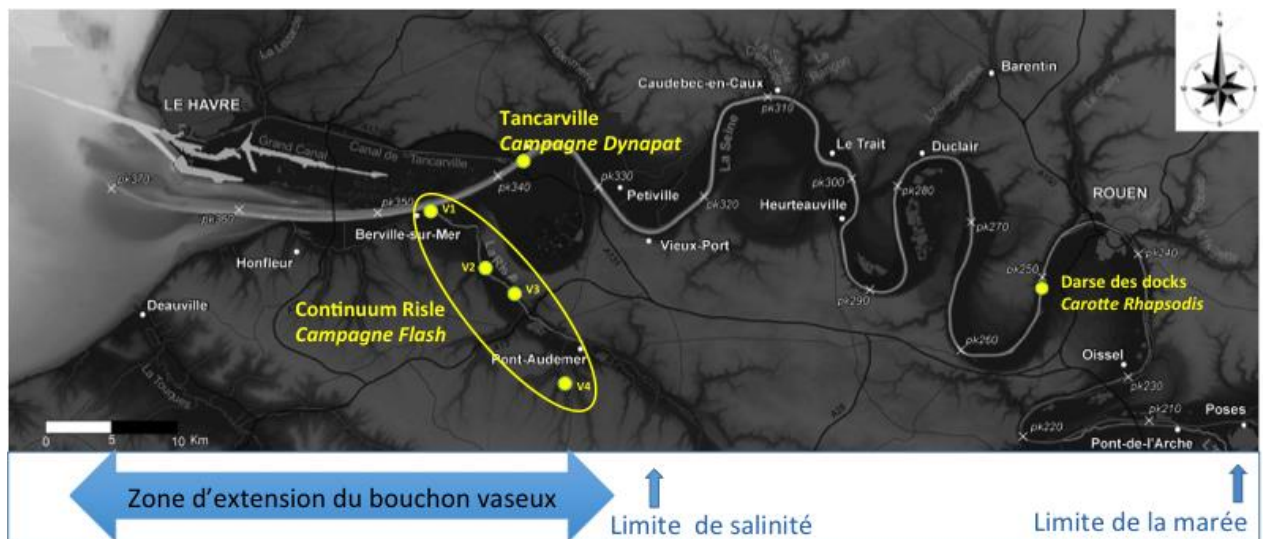


Figure 2: Sites d'étude du projet DYNAPAT

❖ **Bilan des campagnes réalisées :**

Influence de la dynamique particulière sur la contamination de la colonne d'eau dans la zone de l'embouchure.		
	Campagnes <i>in situ</i> (colonne d'eau sédiments de surface) sur le site de Tancarville	Expérimentation FLOCSIM
03/2014	Essai prototype décanteur (DYNAPAT 0-1)	
07/2014	Essai prototype décanteur (DYNAPAT 0-2)	
28/08/2014	DYNAPAT 1	
05/02/2015	DYNAPAT 2	
02/2015		AERO 1
09/2015		AERO 2
10/2015		AERO 3
16/06/2015	DYNAPAT 3	
12/07/2015	DYNAPART	
13/11/2015	DYNAPAT 4	
25/01/2017	DYNAPAT 5	FLOCSIM essai
26/01/2017		FLOCSIM
Occurrence des intégrons cliniques ou environnementaux dans les sédiments		
Echelle spatiale	Zone de l'embouchure DYNAPAT 3,4, 5	
		Zone de dépôt : transect "Risle - embouchure » Campagne projet FLASH
Echelle temporelle (50 ans)		Carotte de la darse des docks: Rhapsodis

Tableau 1: Calendrier des campagnes. Les campagnes étaient coordonnées par Gautier Chaix et Julien Deloffre. Elles ont mobilisé une dizaine de chercheurs et techniciens, un bateau et un laboratoire mobile sur site. En complément, 4 campagnes supplémentaires ont été spécifiquement dédiées à l'analyse du microbiote des copépodes *Eurytemora affinis* susceptible d'héberger des *Aeromonas* (AERO 1, 2 et 3), à l'analyse des effluents de la STEU de Tancarville qui impactent la qualité microbiologique des eaux de la zone d'étude; et à une expérience de décantation *in situ* couplée à une filtration séquentielle, pour l'étude de la diversité des communautés bactériennes associées aux particules (DYNAPART).

	DYNAPAT 1	DYNAPAT 2	DYNAPAT 3	DYNAPAT 4	DYNAPAT 5 FLOCSIM ^a	DYNAPART
Date	28/08/2014	05/02/2015	16/06/2015	13/11/2015	25(26)/01/2017	12/07/2015
Coefficient marée	85	86	84	85	58 (68)	63
Débit (m ³ .s ⁻¹) ^b	366	1144	226	199	241 (249)	180
Pluviométrie (mm) ^c	37	20,7	16.9	6.6	0	0
Température de l'eau (°C)	19.5	5,4	19.8	12	12,3 ^e	19
Salinité	0,6	0	8,3	5,2	2,8	
Conductivité (µS.cm ⁻¹)	1400	477	13086	4012	9152	
M.E.S (mg.L ⁻¹)	68	88	76	185	127	

Tableau 2: Conditions hydrologiques et paramètres physico-chimiques des campagnes DYNAPAT.

a Prélèvements sur le site de Tancarville (pK 337; N 49° 28' 30.26" E 0° 27' 48.65"); DYNAPAT 5 et Flocsims 1 (25/01/2017) et Flocsims 2A et 2B (26/01/2017); b débits mesurés à Vernon (Banque Hydro) ; c pluie cumulée 7 jours précédents la campagne (données météo France); d données du réseau SYNAPSES ; e surface de la vase intertidale gelée lors du prélèvement du 26/01/2017 (température de l'air -4°C). DYNAPART, campagne spécifiquement dédiée à la biologie moléculaire (étude de la diversité des communautés microbiennes présentes dans les différentes fractions).

1.2 Positionnement hydrologique et reproductibilité des campagnes DYNAPAT (Tancarville, pK 337)

❖ *La dynamique particulière dans la zone de l'embouchure*

La zone de l'embouchure de l'estuaire est caractérisée par une stratification verticale des masses d'eaux: la masse d'eau douce d'origine fluviale en surface, circule au dessus de la masse d'eau d'origine marine plus dense, dont l'avancée dans l'estuaire dépendra du marnage (cycle morte-eau / vive eau) et du débit du fleuve (notion de biseau salé et/ou front de salinité). Cette discontinuité, génère un gradient physico-chimique vertical, notamment en terme salinité, qui avec la turbulence influe sur la dynamique particulière (Figure 2). Dans cette zone, les matières en suspension (MES) majoritairement d'origine fluviale (Seine), forme une zone maximale de turbidité (« bouchon vaseux »), avec des concentrations en MES pouvant atteindre plusieurs g.L^{-1} (Le Hir et al., 2001). La masse totale en MES du bouchon vaseux pouvant atteindre de 100 000 à 300 000 tonnes (donnée GIPSA).

❖ *Choix du site de Tancarville*

Le site de Tancarville (pk 337), est un site de l'embouchure de l'estuaire, qui se situe à l'amont du gradient de salinité, avec la présence du bouchon vaseux dans la zone de l'embouchure pour des débits $< 600 \text{ m}^3.\text{s}^{-1}$. Ce site est positionné dans la zone oligohaline de l'estuaire, avec des valeurs minimales de salinité ($< 0,5$) atteintes à basse mer et des valeurs maximales de salinité (≈ 17) à pleine mer en période de vive eau et d'étiage (réseau SYNAPSES, données GIPSA). La hauteur de la colonne d'eau dans le chenal varie de 8 m à 9 m à basse mer et de 15 m à 16 m à pleine mer. En période de crue, et dès un débit à Poses $> 600 \text{ m}^3.\text{s}^{-1}$, le bouchon vaseux migrera vers la partie aval (Figures 2 et 3), et le site de Tancarville sera constamment en eau douce. Le marnage sur ce site est de 6 à 7 m en vives-eaux.

Dans le cadre du projet DYNAPAT, 5 campagnes ont été spécifiquement dédiées à la problématique de l'impact de la dynamique particulière sur la dynamique de contamination par les bactéries (Tableaux 2 et 3).

❖ *Reproductibilité des campagnes*

La complexité de la dynamique particulière imposait une rigueur dans la stratégie d'échantillonnage qui dépasse la notion de simple répétabilité, qui se limite à 3 campagnes de prélèvements au même endroit pour s'assurer de la reproductibilité des campagnes.

• *Choix des coefficients de marée*

Afin de prélever dans le bouchon vaseux, le positionnement des campagnes dans le cycle de marée semi-lunaire (morte-eau/vive eau), a été réalisé pour des coefficients de marée de petite vive-eau, (DYNAPAT 1: 85; DYNAPAT 2: 86; DYNAPAT 3: 84; DYNAPAT 4: 85). Les conditions de petites vives-eaux correspondent à 22% des conditions de marées en 2015 (Annexe 1). Pour DYNAPAT 5, dont l'objectif était de collecter de la vase fluide et de l'eau du site pour l'expérimentation FLOCSIM, un coefficient plus faible a été retenu (coefficient 58).

• *Positionnement du prélèvement au cours du cycle semi diurne de marée:*

L'objectif de notre projet était d'étudier les bactéries dans le bouchon vaseux (colonne d'eau: surface fond; vase fluide et sédiment de surface des vasières intertidales). La période privilégiée pour le prélèvement était donc celle où il y a présence du bouchon vaseux (par

remise en suspension et advection), et où ii) la distribution verticale des concentrations pondérales en MES était la plus contrastée dans la colonne d'eau entre la surface et le fond, soit à la fin de la période de flot/début de l'étale de pleine mer (Figure 3).

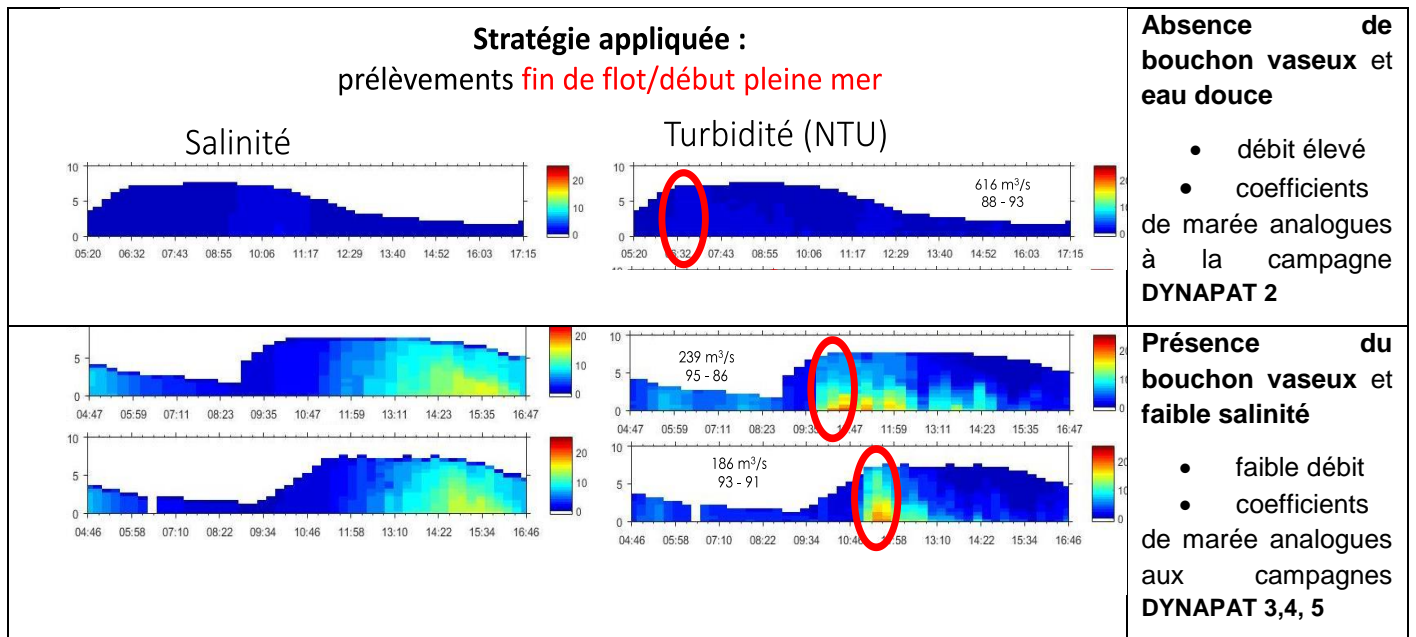


Figure 3: Effet du débit sur la salinité et la turbidité sur le site de Tancarville. Effet du débit sur la salinité et la turbidité, sur le site de Tancarville en conditions de petite vive eau (coefficients de marée entre 84 et 86), justifiant le choix des conditions hydrologiques pour les campagnes DYNAPAT : fin du flot/début de l'étale de pleine mer, avec un gradient marqué en concentration en MES le long de la colonne d'eau ; les cercles rouges indiquent les conditions des prélèvements. Les données de turbidité et de salinité au cours d'un cycle semi diurne de marée ont été acquises dans le cadre du projet SA5 SUSPENSE avec une sonde multiparamétrique (CTD couplée à un turbidimètre) ; les hauteurs d'eau ont été fournies par le GPMR.

Les campagnes DYNAPAT 1, 3, 4 et 5 ont été réalisées pour des conditions de bas débits (Tableau 2), correspondant à la présence du bouchon vaseux sur le site de Tancarville, alors que la campagne DYNAPAT 2 a été réalisée pour des conditions de haut débit (Figure 4).

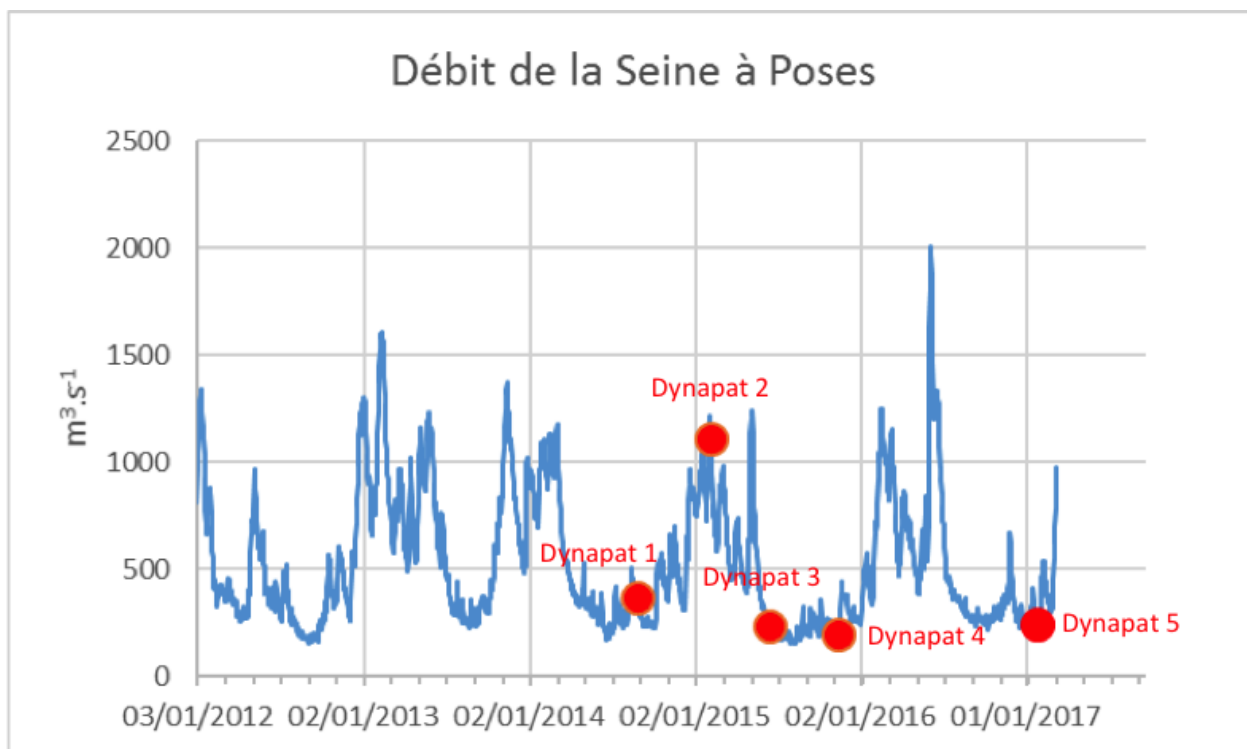


Figure 4: Chronique des valeurs de débit fluvial de la Seine (mesures réalisées à Poses, réseau SYNAPSES) et positionnement des campagnes DYNAPAT (●).

❖ *La vasière de Tancarville*

Les prélèvements de sédiments ont été réalisés sur la vasière intertidale de Tancarville. Cette vasière est soumise à des phases d'érosion et de dépôt en lien avec la présence du bouchon vaseux qui alimente en particules cette vasière. La position du bouchon vaseux, dépendante des débits du fleuve, est un élément essentiel de la compréhension de la dynamique sédimentaire de la zone d'embouche de l'estuaire (Cuvilliez et al., 2015; Deloffre et al., 2006 ; Rapport SA6-HYMOSED).

Dans le cadre du projet DYNAPAT, les prélèvements sédimentaires ont été réalisés aux mêmes dates que les campagnes DYNAPAT, mais lors du découvrément des vasières à basse mer. En période de bas débit (DYNAPAT 1, 3, 4, 5 et FLOCSIM), le bouchon vaseux est présent sur la zone de Tancarville, et alimente les vasières par décantation des MES générant un dépôt de vase fluide (teneur en eau du sédiment de surface entre 100 et 270%). En période de crue (DYNAPAT 2), le bouchon vaseux est localisé plus à l'aval et les vasières latérales en érosion font apparaître des vases plus compactes avec une teneur en eau (% d'humidité) plus faible, proche de 50% (Figures 5 et 6 et tableau 3). La figure 5 montre la présence de vase fluide en surface du sédiment (Figure 5A) alors que des figures érosives (plaques d'érosion) sont visibles pour des débits $> 600\text{m}^3.\text{s}^{-1}$ (Figure 5B).

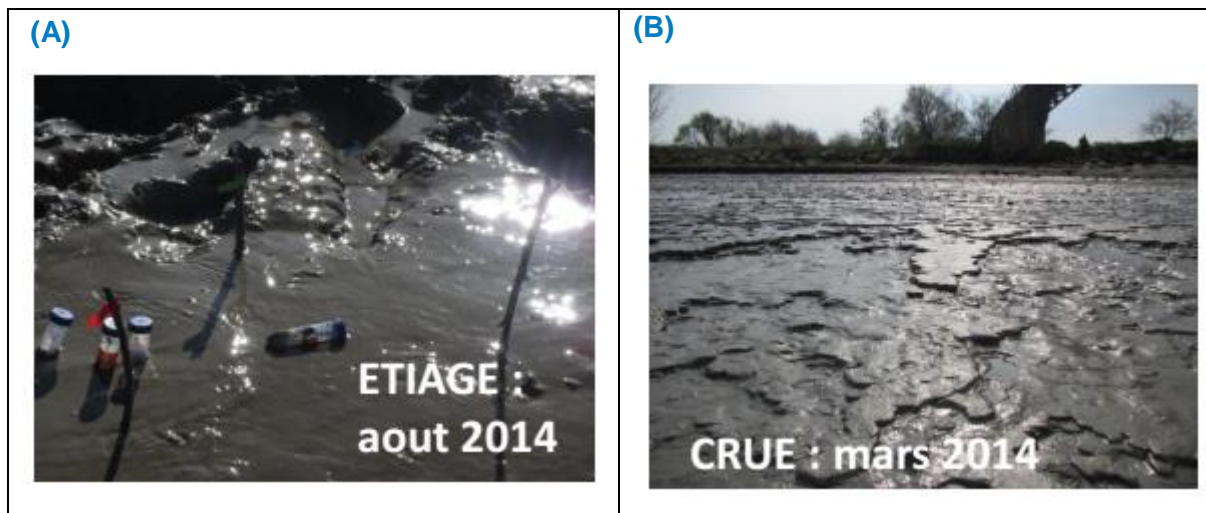


Figure 5: Photographies de la vasière intertidale de Tancarville. (A) Présence de vase fluide en surface en période d'étiage et (B) de figures d'érosion en surface en période de crue. A l'échelle annuelle, en période d'étiage, le bouchon vaseux présent sur la zone, est susceptible d'alimenter la vasière en particules ; ce qui a été le cas en 2014/2015 (rapport HYMOSED) avec un dépôt maximum de vase fluide enregistré de juillet à mi-août en 2014 et de juillet à fin août en 2015. En période de crue, le bouchon vaseux est localisé plus en aval, et l'alimentation en sédiment de la vasière n'est plus assurée, ce qui génère une tendance à l'érosion avec la présence d'un sédiment plus compacté sur cette zone de l'estuaire.

En période intermédiaire entre ces deux phases extrêmes de dépôt et d'érosion, on observe un tassement des vases, déposées sur cette zone, et les sédiments en surface, sur les 5 à 10 premiers centimètres, subissent des remaniements réguliers en fonction des cycles de marée vive eau/morte eau et semi-diurne. La teneur en eau des sédiments est alors un proxy permettant de mettre en évidence ces phases de remaniement et de dépôts de sédiment: une forte teneur en eau (100 à 250% d'humidité) correspondant à un dépôt frais, une faible teneur proche de 50% à un sédiment compacté, plus ancien. La figure 6 montre la relation existante entre les teneurs en eau du sédiment de surface et les débits. Les sédiments prélevés durant les campagnes DYNAPAT 1, 3, 4 et 5 correspondent à des valeurs élevées en teneur en eau, et donc correspondant à des périodes de dépôt de sédiment superficiels ; inversement la très faible teneur en eau de la campagne DYNAPAT 2 indique la présence d'un sédiment ancien érodé.

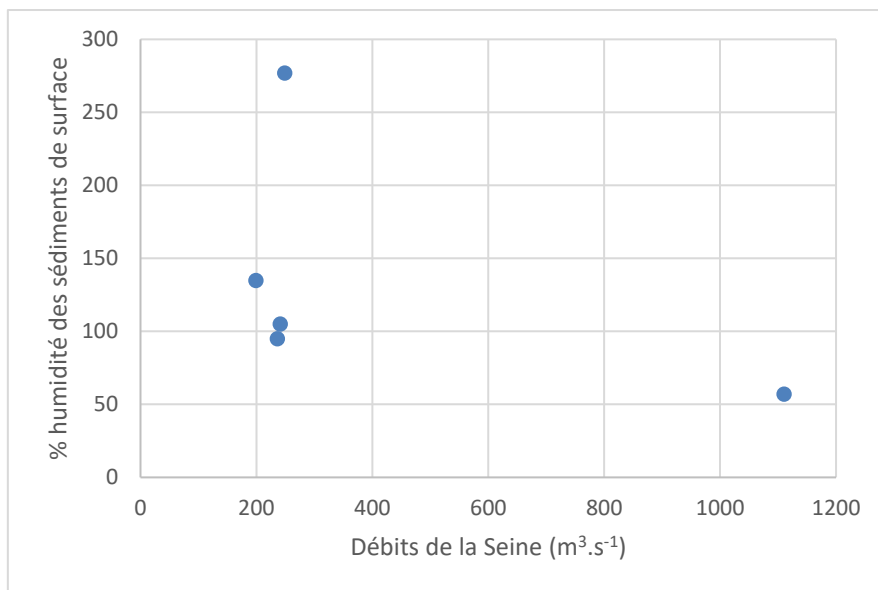


Figure 6: Evolution de la teneur en eau (% d'humidité) du sédiment de la vasière de Tancarville en fonction des débits de la Seine.

Date	Campagnes	Débits (m³.s⁻¹)	Humidité %	Masse sèche
28/08/2014	DYNAPAT 1	366	NA	NA
05/02/2015	DYNAPAT 2	1144	57	64
15/06/2015	DYNAPAT 3	226	95	51
13/11/2015	DYNAPAT 4	199	135	43
25/01/2017	DYNAPAT 5	241	105	49
26/01/2017	FLOCSIM	241	277	27

Tableau 3: Prélèvements de la vasière intertidale de Tancarville, positionnement des campagnes de en fonction du cycle de dépôt – remise en suspension (données altimétriques).

❖ **Validation de la stratégie d'échantillonnage: positionnement du bouchon vaseux sur le site de Tancarville**

Une validation de la stratégie d'échantillonnage, plus précisément la validation du choix des coefficients de marée et du débit, a été réalisée pour s'assurer que le bouchon vaseux était bien positionné sur le site de Tancarville lors de nos campagnes. La figure 7 positionne les campagnes DYNAPAT, sur les chroniques des données de turbidité et de conductivité de l'eau de surface acquises par le réseau SYNAPSES (2012-2017) sur le site de Tancarville.

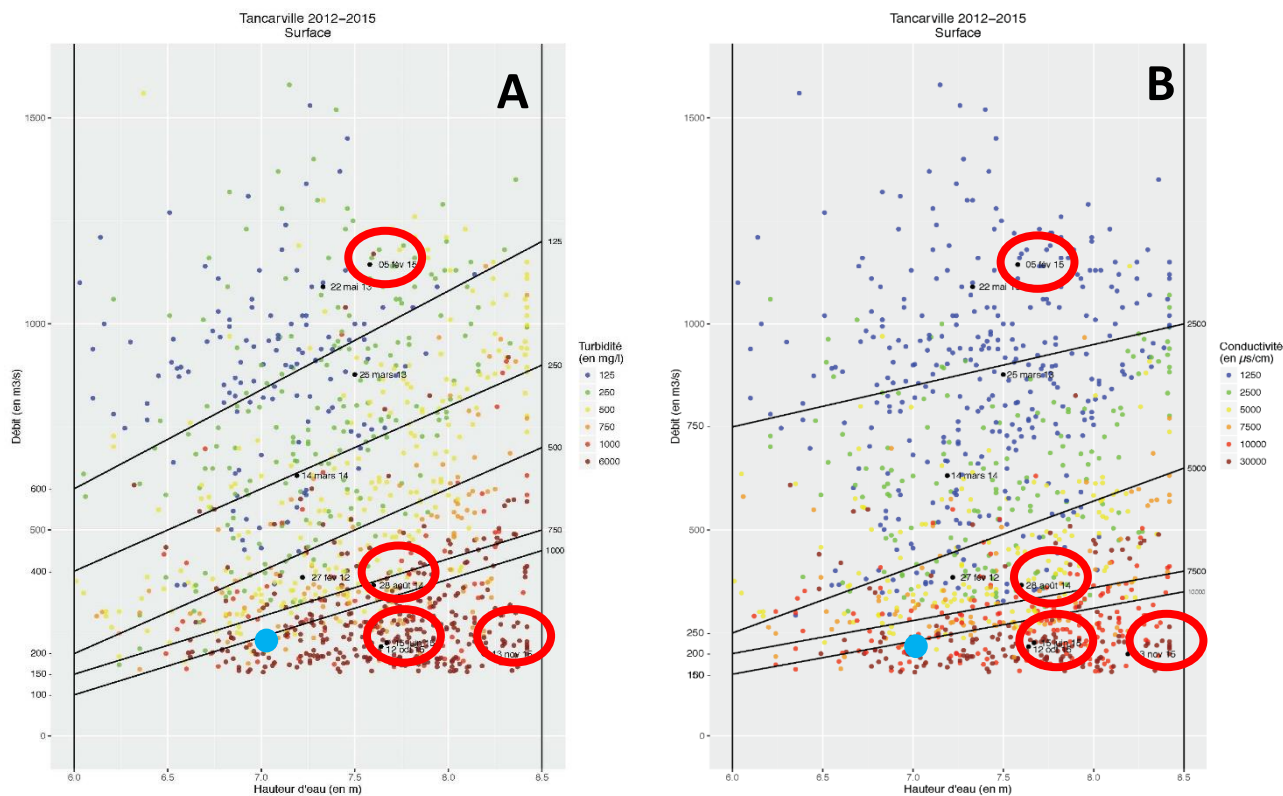


Figure 7: Positionnement des campagnes DYNAPAT en fonction des conditions hydrodynamiques (données SYNAPSES et SHOM), hauteur d'eau maximale quotidienne au Havre en fonction du débit journalier. (A) turbidité maximale quotidienne en surface ; (B) conductivité maximale en surface quotidienne pour la période 2012-2014 ; Cercle rouge: campagnes DYNAPAT, point Bleu: campagne DYNAPART (diversité des communautés microbiennes).

Chaque journée (2 cycles de marée) est représentée par 1 point, le graphique de la figure 7A représente la turbidité maximale journalière, qui caractérisera la présence du bouchon vaseux sur le site de Tancarville par une valeur maximale en surface, alors que le graphique de la figure 7B représente la salinité maximale journalière, qui caractérise la pénétration de la salinité dans l'estuaire. Chaque point est positionné sur les 2 graphiques avec en abscisse la hauteur d'eau (Le Havre – données SHOM, qui caractérisera l'amplitude de marée), et en ordonnée le débit de la Seine (Vernon, Banque Hydro). Chaque point est doté d'une couleur qui indique l'intensité de la turbidité, soit de la conductivité, d'une couleur bleue pour les faibles valeurs à une couleur rouge pour les fortes valeurs. L'analyse de ces graphiques montre qu'il existe une relation complexe entre d'une part, la pénétration du biseau salé et la présence du bouchon vaseux, et d'autre part le débit fluvial et l'amplitude de la marée. Les plus fortes turbidités et les plus fortes salinités étant observées en étiage par fort coefficient.

Les valeurs de turbidité observées pour les 3 campagnes de prélèvement DYNAPAT en conditions d'étiage confirment la présence du bouchon vaseux avec des valeurs maximales pour DYNAPAT 3, 4 et 5, et une valeur un peu plus faible pour DYNAPAT 1, en raison d'un débit légèrement plus élevé. En revanche, la campagne DYNAPAT 2 est située dans un régime tout à fait différent, avec l'absence du bouchon vaseux sur ce site, plus décalé vers l'aval compte-tenu du débit de crue, et la présence d'eau douce pendant tout le cycle de marée.

1.3 Conclusions

➤ **Reproductibilité des prélèvements dans l'embouchure de l'estuaire (site de Tancarville):**

Au vu du fonctionnement hydrologique complexe de l'estuaire, notamment dans la zone de l'embouchure, la reproductibilité des prélèvements ne peut pas être assurée par une simple répétabilité (3 prélèvements sur le même site), sur la base d'un seul paramètre hydrodynamique (débit ou coefficient de marée).

➤ Dans le cadre du projet DYNAPAT, la reproductibilité des prélèvements dans l'embouchure de l'estuaire a été validée sur la base du choix des valeurs de débit et du coefficient de marée, et du positionnement sur une chronique de turbidité et de salinité, pour s'assurer de la présence du bouchon vaseux, pour chaque campagne de prélèvement (site de Tancarville).

➤ Cette démarche méthodologique est un préalable indispensable pour comparer des données sur les niveaux de contamination chimique, microbiologique, voire les teneurs en nutriments. **Un guide de stratégie d'échantillonnage** pourrait être proposé à destination des scientifiques ou institutionnels concernés, en s'appuyant sur ces observations, voire les modèles hydrosédimentaires (MARS).

➤ **Conditions de prélèvements des campagnes DYNAPAT:**

Le bouchon vaseux est présent sur le site de Tancarville pour les campagnes DYNAPAT 1, 3, 4, (conditions de petite vive eau (coefficient de marée entre 84 et 86) pour de faibles débits (compris entre $126 \text{ m}^3 \cdot \text{s}^{-1}$ et $366 \text{ m}^3 \cdot \text{s}^{-1}$) sur le site de Tancarville, ainsi que pour la campagne DYNAPAT 5 dont l'objectif était de collecter de la vase fluide (coefficient de marée 56). A l'échelle annuelle, la situation de petite vive eau est représentative de 22% des conditions de marée (données 2015).

La campagne DYNAPAT 2 (petite vive eau, coefficient de marée de 86; débit $1\,144 \text{ m}^3 \cdot \text{s}^{-1}$), est en situation de haut débit avec une prédominance d'eau douce d'origine fluviale, et un déplacement du bouchon vaseux vers l'aval.



2 Caractérisation des particules en fonction de leur vitesse de chute (Tâche 1)

2.1 Rappel des objectifs

Dans les estuaires, différents types de particules, d'origine continentale (érosion des sols, altération des roches, contaminants chimiques), marine ou spécifiquement intra-estuarienne coexistent dans la colonne d'eau. Sur la base de leur taille, de leur composition et de leur réactivité dans les processus de floculation (i.e. aptitude à former des agrégats), on peut distinguer: les nanoparticules et les colloïdes d'origine minérale (silice, carbonates, métaux) qui joueront le rôle de facteur de nucléation, les composés d'origine organique à fort pouvoir cohésif (exopolysaccharides algaux et bactériens, biofilms microbiens, contaminant organiques, et matière organique détritique) et/ou les particules minérales lithoclastiques (i.e. quartz, argiles, carbonates), ou bioclastiques (coquilles carbonatées). Parmi ces particules, celles dont la taille est $> 0.45 \mu\text{m}$, représentent les MES dans la colonne d'eau, alors que les particules de taille $< 0,45 \mu\text{m}$ correspondent à la fraction dissoute, ce qui n'exclut pas leur rôle dans les processus de floculation (à l'exemple des bactéries, EPS, Droppo et al, 2007 ; Maggi, 2009, Plach et al, 2011).

Ces différents types de particules se retrouvent associés sous forme de microflocs ($< 100 \mu\text{m}$), structure stable difficilement fragmentée par la turbulence. Dans l'embouchure de l'estuaire, les modifications importantes des conditions physico-chimiques, favoriseront la formation de macroflocs (de $100 \mu\text{m}$ à 1 mm parfois appelés dans la littérature agrégats), réseaux sans liaison physique stable qui, à l'échelle d'un cycle semi diurne de marée, se dissocieront à nouveau en fonction de la turbulence du milieu. Ce phénomène qualifié de « floculation/défloculation » introduit par Eisma en 1993, fait depuis l'objet d'études approfondies en sédimentologie des estuaires (Droppo et al., 2007, Eisma, 1993 ; Maggi, 2009,2013 ; Mikes et al., 2004 ; Verney et al., 2009 ; Wang et al., 2013; et revues Manning et al., 2010; Shi, 2010).

Les processus de floculation sont dépendants de la concentration des M.E.S qui accroît statistiquement la probabilité de rencontre des particules. En estuaire de Seine, les floccs présentent des tailles maximales pour des concentrations pondérales $> 0,1 \text{ g.L}^{-1}$, alors qu'aucune floculation n'est observée pour des concentrations pondérales en MES $< 4 \cdot 10^{-3} \text{ g.L}^{-1}$ (Verney et al., 2009). Ces phénomènes de floculation sont également dépendants de la composition en matière organique des MES, et donc fortement influencés par les microorganismes et les polymères à fort pouvoir cohésif qu'ils sécrètent (Droppo et al, 2007 ; Drudge et Warren, 2014, Maggi, 2007), à l'exemple des efflorescences algales productrices d'exopolymères (Verney et al., 2009). Les résultats obtenus lors d'expérimentations en laboratoire ou d'observations *in situ*, alimentent différents modèles dont le modèle « Floccmod » (Verney et al., 2011) pour lequel les paramètres taille et vitesse de chute sont utilisés pour qualifier les floccs.

Dans ce contexte, un des objectifs du projet DYNAPAT, était d'étudier la composante microbiologique des floccs dans la zone du bouchon vaseux, en s'intéressant d'une part à la communauté bactérienne autochtone des floccs, et d'autre part à la composante allochtone, en

se focalisant sur *Escherichia coli*, espèce bactérienne indicatrice de la contamination fécale, utilisée dans le modèle de la contamination fécale en Seine (Servais et al., 2007).

Ces travaux qui visent à étudier la composition physico chimique et microbiologique des particules présentes dans la colonne d'eau en fonction de leur vitesse de chute ont nécessité le développement d'un décanteur *in situ* et une procédure de validation de la représentativité des échantillons d'eau analysés dans le décanteur.

2.2 Conception d'un prototype pour isoler les différentes classes de particules en fonction de leur vitesse de chute

❖ Conception d'un prototype et choix des vitesses de chute

Un décanteur composé de 6 ampoules de 1,2 L, a été développé afin d'isoler dans chaque échantillon d'eau, quatre fractions enrichies en particules pour lesquelles la vitesse de chute est respectivement $\geq 1\text{mm.s}^{-1}$ pour la fraction décantable F1, de 10^{-1}mm.s^{-1} pour la fraction décantable F2, de 10^{-2}mm.s^{-1} pour la fraction décantable F3 et $\leq 10^{-2}\text{mm.s}^{-1}$ pour la fraction F4 non décantable après 4h10 (Figure 8).

Le choix des temps de décantation, et donc des vitesses de chute, correspond à la gamme de vitesses décrites dans la bibliographie pour ce type d'estuaire (Pejrup & Mikkelsen, 2010) et mesurées en estuaire de Seine (Annexe 2). Une validation de la pertinence de ce choix et de la faisabilité d'une décantation *in situ* a été réalisée lors de deux campagnes exploratoires de mars et juillet 2014.

Pour chacune de ces fractions, il a été réalisé (i) une caractérisation physico-chimique par analyse en microscopie électronique à balayage (MEB) couplée à une sonde EDX et (ii) un dénombrement des bactéries viables par cytométrie en phase solide (ChemScan RDI).

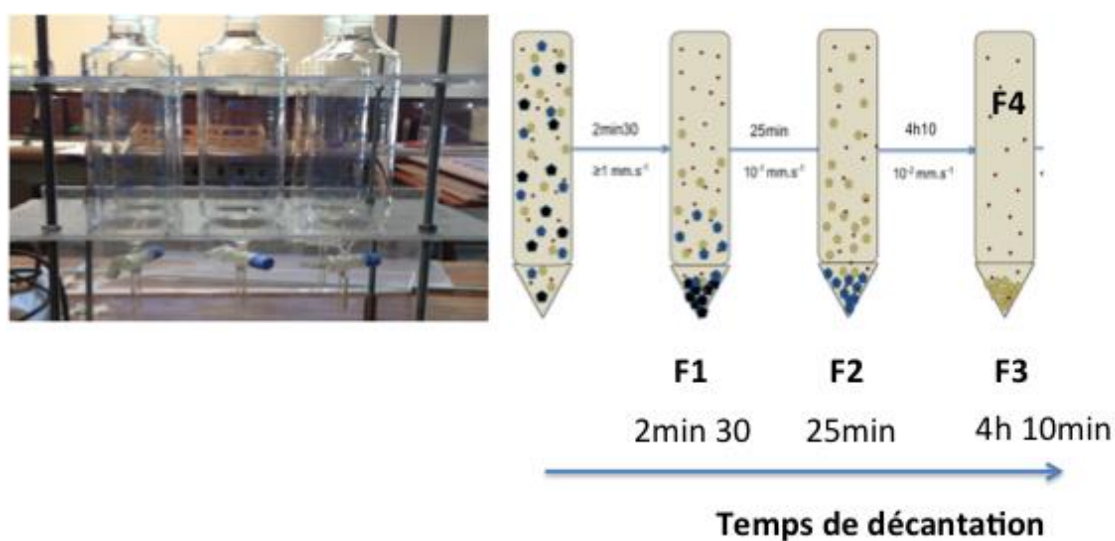


Figure 8: Conception d'un décanteur immergeable *in situ* et choix des vitesses de chute permettant la décantation simultanée dans 6 ampoules de 1,2L spécialement conçues. Les temps ont été choisis afin d'obtenir 4 classes de particules distinctes selon leur vitesse de chute (campagnes DYNAPAT 0-1/0-2).

❖ **Validation de la représentativité des échantillons d'eau analysés dans le décanteur**



Figure 9: Décantation in situ sur le site de Tancarville. Prélèvement in situ (A), décantations sur la berge (B) et filtrations, analyses granulométriques et stabilisation des prélèvements pour analyses en laboratoire (biologie moléculaire, microbiologie, MEB) sur la berge (laboratoire mobile, C et D).

Un des défis de cette approche méthodologique était de s'assurer que les prélèvements soient non destructifs et représentatifs de la colonne d'eau: la distribution granulométrique de l'eau utilisée pour la décantation doit être représentative de celle de l'eau prélevée. Le transport au laboratoire (1 heure) a donc été exclu, il fallait alors s'assurer que le transport en bateau entre le lieu de prélèvement (centre du chenal et la berge) n'occasionnerait pas des perturbations dans la distribution granulométrique des échantillons.

C'est pourquoi, d'une part, le décanteur *in situ* a été conçu (Figure 9) pour être rempli directement après immersion à une profondeur de 50 cm sous la surface, en éliminant ainsi l'étape préalable de prélèvement à la bouteille NISKIN®, classiquement réalisée (Projet FLUMES). D'autre part, les décantations ont été réalisées sur la berge pour les campagnes DYNAPAT 1 à 4. Une homogénéisation douce des échantillons est réalisée par deux retournements lents de 360° du décanteur sur lui même (et donc des 6 ampoules simultanément).

Afin de perturber le moins possible les échantillons avant les décantations, il a été choisi de travailler sur des prélèvements de surface (- 50 cm) au moment où la distribution des concentrations pondérales en MES de la colonne d'eau est la plus stratifiée (fin du flot début de l'étalement de pleine mer, Figure 3).

Pour chacune de ces campagnes, une comparaison des profils micro-granulométriques (LISST) *in situ* et des prélèvements d'eau du décanteur à l'arrivée sur la berge (après 5 minutes de transport en zodiac), a permis de vérifier la similitude des profils et donc de limiter la perturbation dans la granulométrie des échantillons (Figures 8, 9, 10). Les profils micro-granulométriques de toutes les campagnes DYNAPAT sont présentés en Annexe 3.

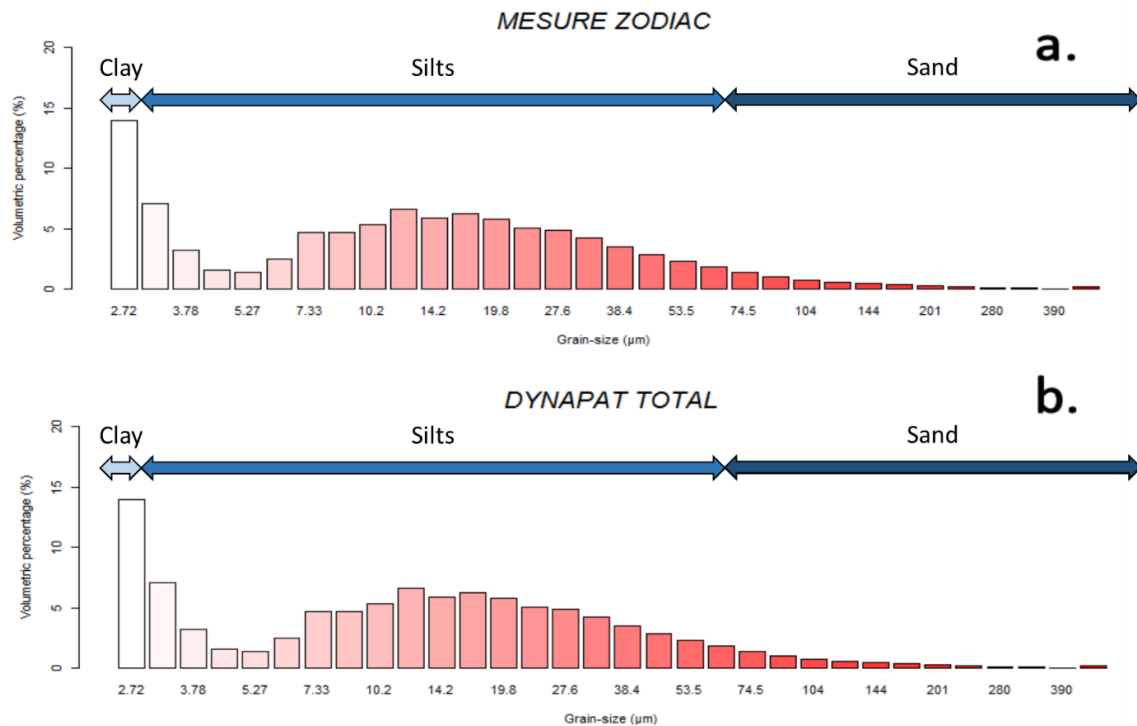


Figure 10: Comparaison des profils micro-granulométriques obtenus *in situ* et sur la berge (campagne DYNAPAT 3). (a) *in situ* ; (b) sur la berge. Le LISST (100X Sequoia Scientific) (Light In Situ Scattering and Transmissometry) permet de mesurer la taille des particules d'un échantillon, comprise entre 2 et 500 μm .

Les profils micro-granulométriques obtenus *in situ* (LISST en configuration terrain avec mesure directe dans la colonne d'eau, Figure 10a) et avant expérimentation à proximité du site (LISST en configuration laboratoire, Figure 10b) sont relativement proches quelle que soit la campagne considérée (DYNAPAT 1 à 4, voir Annexe 3).

❖ Conclusions

Le décanteur *in-situ* spécifiquement développé dans le cadre du projet DYNAPAT, permet de réaliser des décantations sur site :

- L'étude s'est intéressée à 4 fractions enrichies en particules dont la vitesse de chute est $\geq 1\text{mm}\cdot\text{s}^{-1}$ (fraction décantable F1), de $10^{-1}\text{mm}\cdot\text{s}^{-1}$ (fraction décantable F2), de $10^{-2}\text{mm}\cdot\text{s}^{-1}$ (fraction décantable F3) et $\leq 10^{-2}\text{mm}\cdot\text{s}^{-1}$ (fraction non décantable F4, après 4h10).
- La représentativité des échantillons analysés dans les décanteurs, par rapport à l'eau du chenal, a été validée sur la base d'une comparaison des profils micro-granulométriques (LISST) avant le début de chaque décantation.
- La décantation dans 6 ampoules est réalisée sur la berge. Une analyse de micro-granulométrie (LISST) est réalisée pour chaque fraction, en parallèle à une stabilisation des prélèvements pour les analyses en microscopie électronique, biologie moléculaire et mesure des concentrations en MES. Les analyses microbiologiques sont réalisées dans les 2 heures qui suivent le prélèvement. Pour assurer la répétabilité de chaque analyse: une fiche de procédure relative à la décantation *in situ* et des fiches de protocoles ont été rédigées dans le cadre de la démarche qualité de la plateforme PRESEN (FR 3730 CNRS SCALE) (thèse de Gautier Chaix).

2.3 Caractérisation physico- chimique des floccs en fonction de leur vitesse de chute

❖ Démarche méthodologique

Deux paramètres ont été choisis pour caractériser les floccs présents dans les différentes fractions de décantation :

- La taille, à partir d'une analyse micro-granulométrique, qui donne une distribution en taille de la totalité de l'échantillon, et une confirmation par une analyse directe de la taille des floccs à partir d'une collection représentative de micrographies, sur la base de deux caractéristiques de taille d'un flocc décrit dans la littérature (Mikes et al., 2004). La deuxième approche offre l'avantage d'observer la nature des floccs (Figure 11),
- La composition minéralogique, à partir d'une analyse semi quantitative qui repose sur une analyse au microscope environnemental après couplage avec une sonde EDX, qui s'est enrichie d'une analyse plus approfondie basée sur les cartographies élémentaires, pour confirmer la présence des différents composés minéraux.

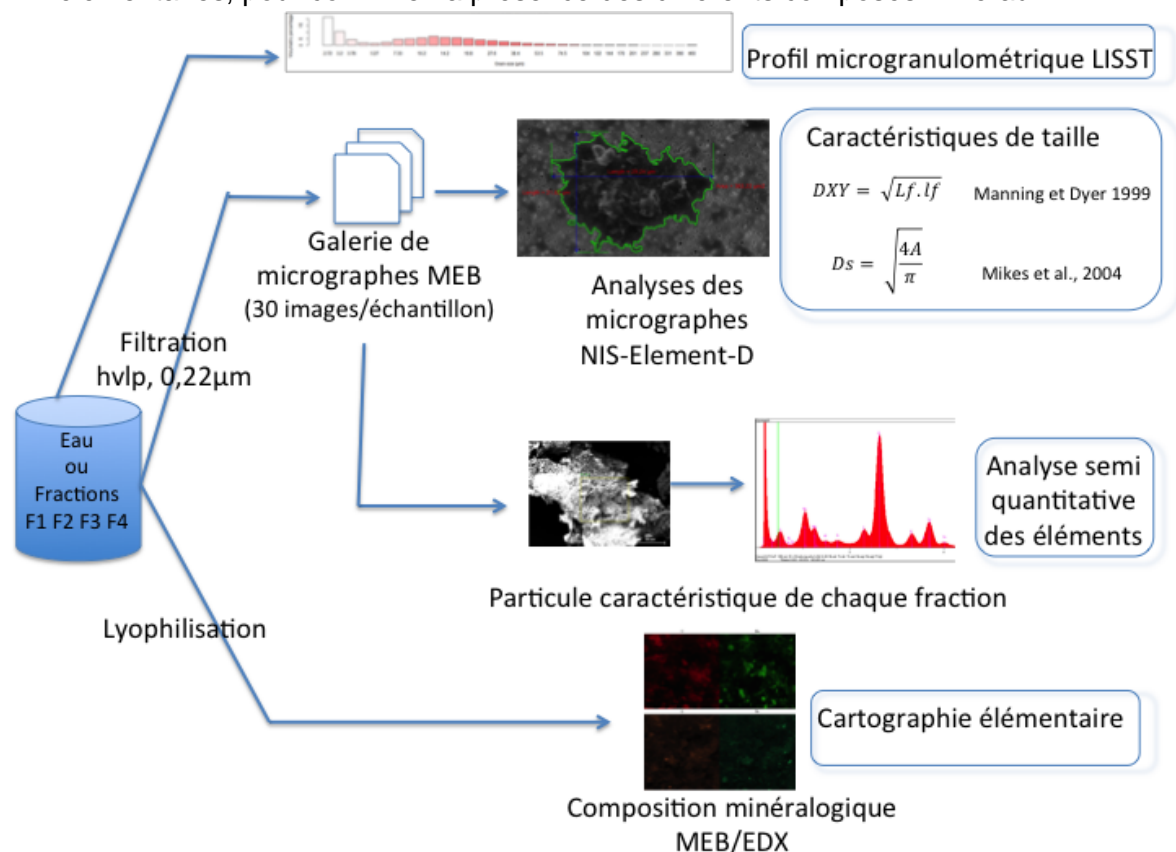


Figure 11: Démarche méthodologique développée pour la caractérisation physico-chimique des floccs, pour l'eau de surface, l'eau du fond, et les différentes fractions de décantations. Elle repose (i) sur une évaluation de la taille à partir d'une analyse des profils micro-granulométriques (LISST), ou sur la base d'une analyse d'une galerie de micrographies en microscopie environnementale (MEB), (ii) la caractérisation minéralogique sur la base d'une observation d'une galerie de micrographies MEB avec couplage à une sonde EDX) ou (iii) couplée à des cartographies élémentaires. Une courbe de raréfaction a permis de déterminer le nombre minimal de clichés (30) à analyser pour avoir une représentativité de chaque échantillon. L'analyse semi quantitative de la composition minéralogique des échantillons a été réalisée sur les campagnes DYNAPAT 1, 2.

❖ Caractérisation de la taille des floccs dans les fractions

Si on considère les trois classes de taille de particules classiquement utilisées en sédimentologie, les argiles ($\leq 2 \mu\text{m}$), les silts ($2 \mu\text{m}$ à $63 \mu\text{m}$)², les sables ($> 63 \mu\text{m}$)², les profils micro-granulométriques (LISST) montrent que après décantation, la proportion de silts est majoritaire et constante (76%) dans les fractions F1, F2 et F3 (Figure 12). En revanche, la composition en particules de la fraction non décantée F4 est significativement différente des fractions décantées avec 47% de silts, 50% d'argiles et 3% de sables. La comparaison des courbes cumulatives de la fréquence des particules en fonction de leur taille, pour chaque fraction, montre un affinement progressif de la taille des particules entre les fractions F1 et F4 et ce, pour toutes les campagnes DYNAPAT (Figure 13).

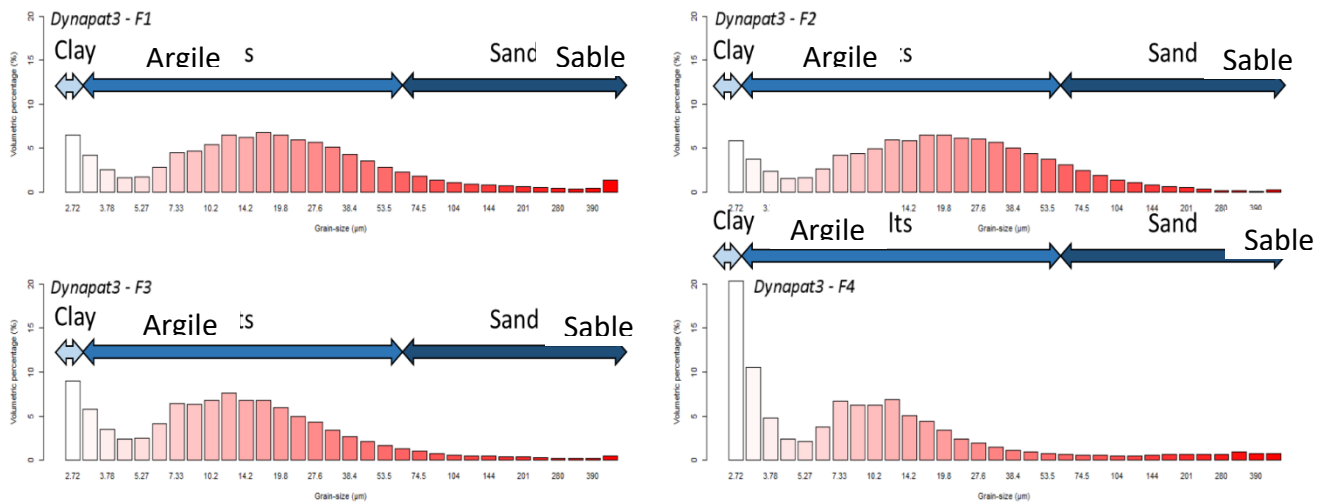


Figure 12: Profils micro-granulométriques des fractions de décantation en % volumique au LISST ; $\geq 1 \text{ mm.s}^{-1}$ (fraction F1), de $10-1 \text{ mm.s}^{-1}$ (fraction F2), de $10-2 \text{ mm.s}^{-1}$ (fraction F3) et $\leq 10-2 \text{ mm.s}^{-1}$ (fraction F4). Il est à noter que le terme « argile » utilisé en granulométrie qualifie la taille et non pas la composition minéralogique (campagne DYNAPAT 3).

² Le terme « argile » utilisé en granulométrie qualifie la taille et non pas la composition minéralogique.

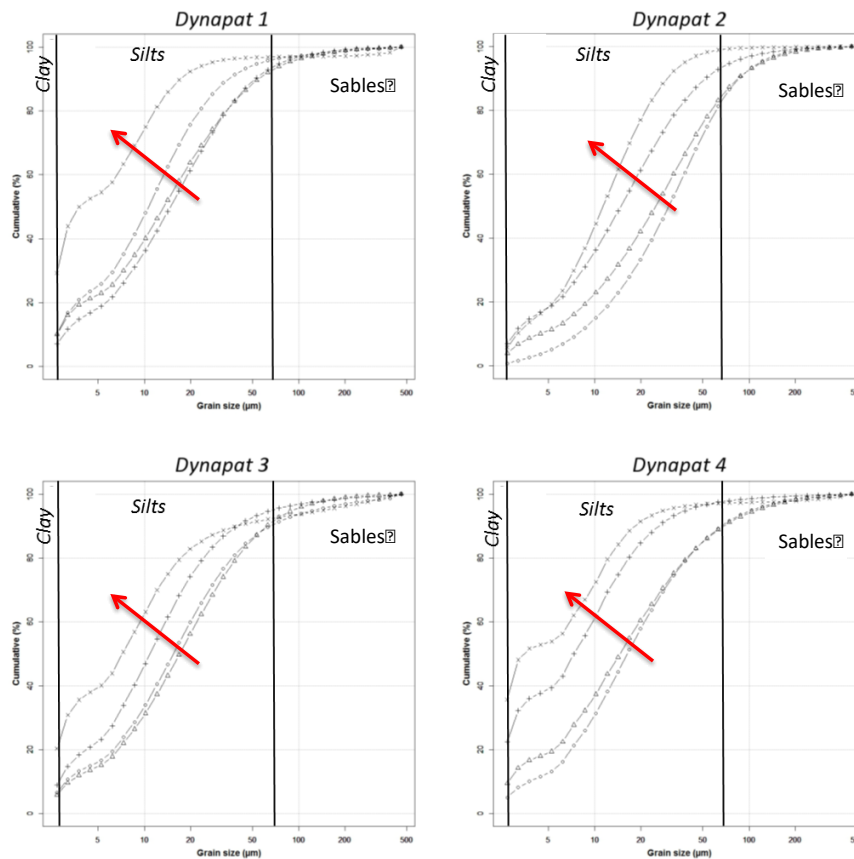


Figure 13: Courbes cumulatives de la fréquence des particules en fonction de leur taille pour chaque fraction. Fraction F1 (○), fraction F2 (△), fractions F3(+) et fraction F4 (×). Le terme « argile » utilisé en granulométrie qualifie la taille et non pas la composition minéralogique (Campagne DYNAPAT 3).

L'évaluation de la taille des floes après analyse des micrographes obtenues en microscopie électronique à balayage (MEB) (3 x 30 images par fraction) par le diamètre équivalent de Férêt et le diamètre équivalent surfacique montre que la taille des floes présents dans la fraction non décantable (F4), est significativement inférieure à celle des floes des fractions décantées (F1, F2 et F3) (Figure 14, p -value<0,001 test de Student).

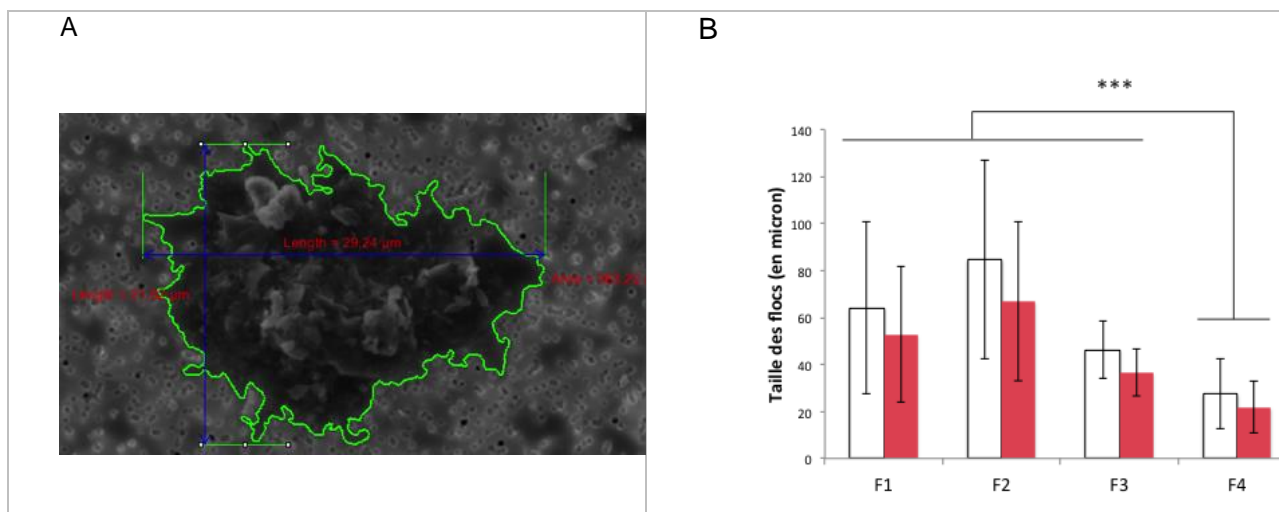


Figure 14: Estimation de la taille des floccs polymorphes présents dans les fractions de décantation F1, F2, F3 et F4 à partir de l'analyse de micrographies en microscopie électronique environnementale. (A) exemple de la mesure du diamètre équivalent de Férêt et du diamètre équivalent surfacique à l'aide du logiciel NIS-Element-D (Nikon) (Agrandissement: 940 X, distance de travail : 12,5 mm, 10,00 kV) ; (B), comparaison de la taille des floccs dans les fractions après décantation (campagnes DYNAPAT 1,2,3). Test de Student, *** p-value<0,001.

❖ **Caractéristique et composition minéralogique des floccs**

L'observation au microscope environnementale montre des structures de floccs typiquement polymorphes, de nature composite correspondant à des agrégats, correspondant à une matrice poreuse organo-minéral, dont la composante organique correspond à des microorganismes et ou de la matière organique détritique (Figure 15).

Dans le cadre du projet DYNAPAT, la Microscopie Electronique à Balayage (MEB) couplée à la microanalyse par Energie Dispersive de rayons X (EDX) a été mise à profit pour réaliser une analyse semi quantitative de la composition minéralogique des particules, en termes de distribution relative des éléments (Figure 15). Une analyse approfondie des fractions des campagnes DYNAPAT 1 et 2, a été réalisée sur la base d'une cartographie élémentaire réalisée à l'UMR MONARIS (Figure 16). Elle permet, en superposant les cartes obtenues pour chaque élément, de confirmer la composition minéralogique d'un flocc. Ainsi la figure 16 montre une superposition des éléments Al, Si, Mg, Ca, P, et O, compatible avec la présence de silice (feuilletés d'aluminosilicate), de cristaux de quartz (SiO_2), ou de feldspath ($(\text{Ba,Ca,Na,K,NH}_4)(\text{Al,B,Si})_4\text{O}_8$). La superposition des cartes du Na et du Cl correspond à la présence de NaCl. La localisation du Fe est plus diffuse, et le comportement du Ti est isolé et compatible avec la présence de TiO_2 . Les photos obtenues montrent que ces éléments sont associés au sein de floccs où il aussi possible de visualiser des microorganismes (Figure 16).

L'analyse en composante principale menée sur les échantillons de la campagne DYNAPAT 1 et 2, sur la base des données acquises après analyse MEB couplée à la microanalyse EDX montre que 83, 26% des résultats s'expliquent par la composition en minéraux (Figure 17). On observe un regroupement des éléments Si, Al, Fe et K, avec les fractions F2 et F3 ; ce qui suggère une plus forte proportion d'argiles, de quartz et de feldspath dans ces fractions. Les éléments Ca, Mg, Na, Cl, qui entrent dans la composition de carbonates, sont regroupés avec la fraction F4 et l'échantillon d'eau de surface. La composition minéralogique de la fraction F1 et de l'eau du fond ne présente pas de typologie particulière.

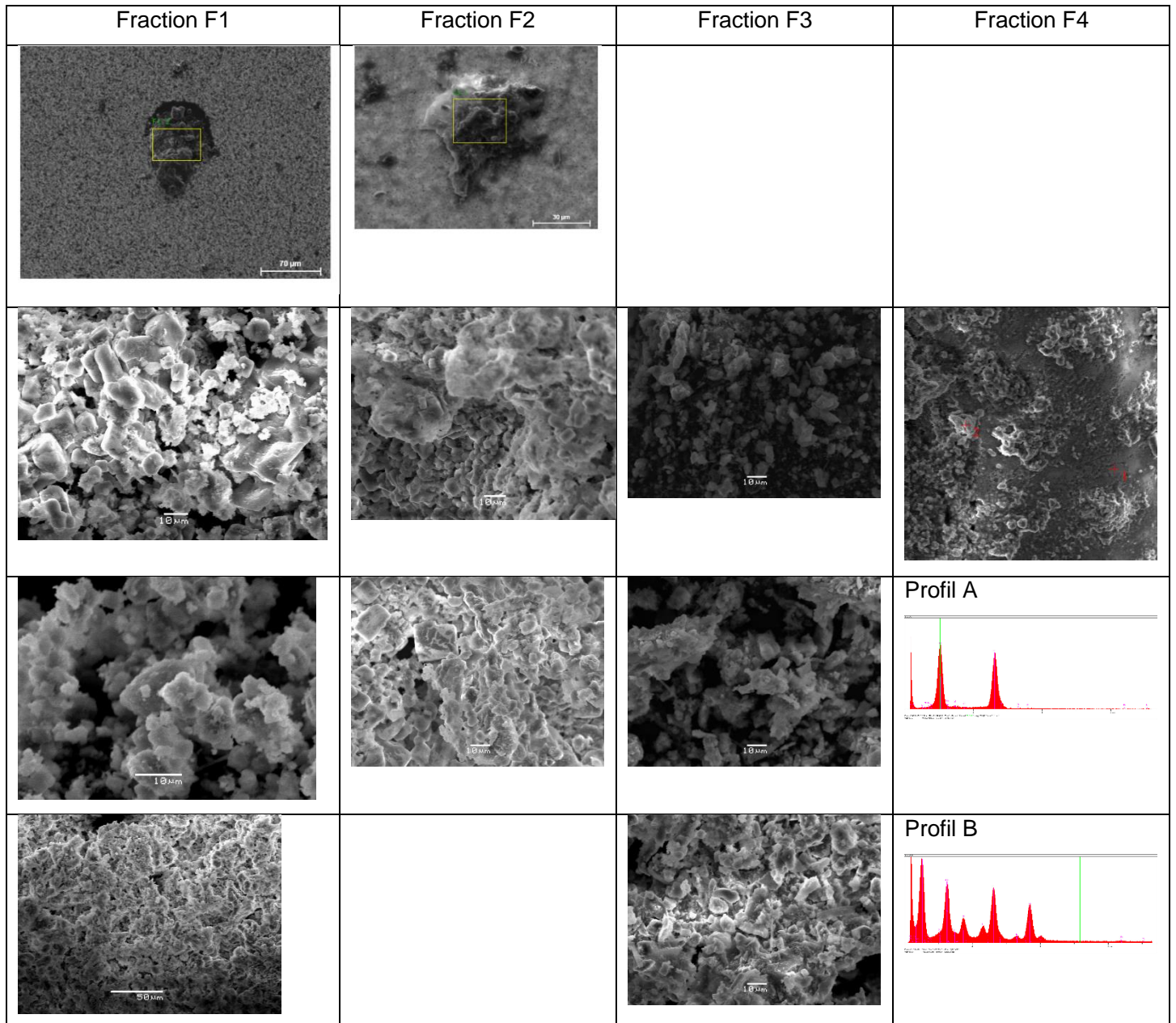


Figure 15: Micrographie de floc organo-minéral caractéristique de chaque fraction. Micrographies en microscopie environnementale (campagnes DYNAPAT 1 et 2, UMR CNRS MONARIS, UPMC - UMR M2C Rouen); Exemple d'une analyse semi quantitative (MEB couplée à la sonde EDX) pour la fraction 4, image d'un Floc (X1000) et analyse minéralogique semi quantitative correspondante au niveau des sites notés 1 (profil A) et 2 (profil B) sur l'image (campagne DYNAPAT 1, UMR CNRS MONARIS, UPMC).

Cartographie élémentaire : exemple de la fraction F2/ DYNAPAT 2

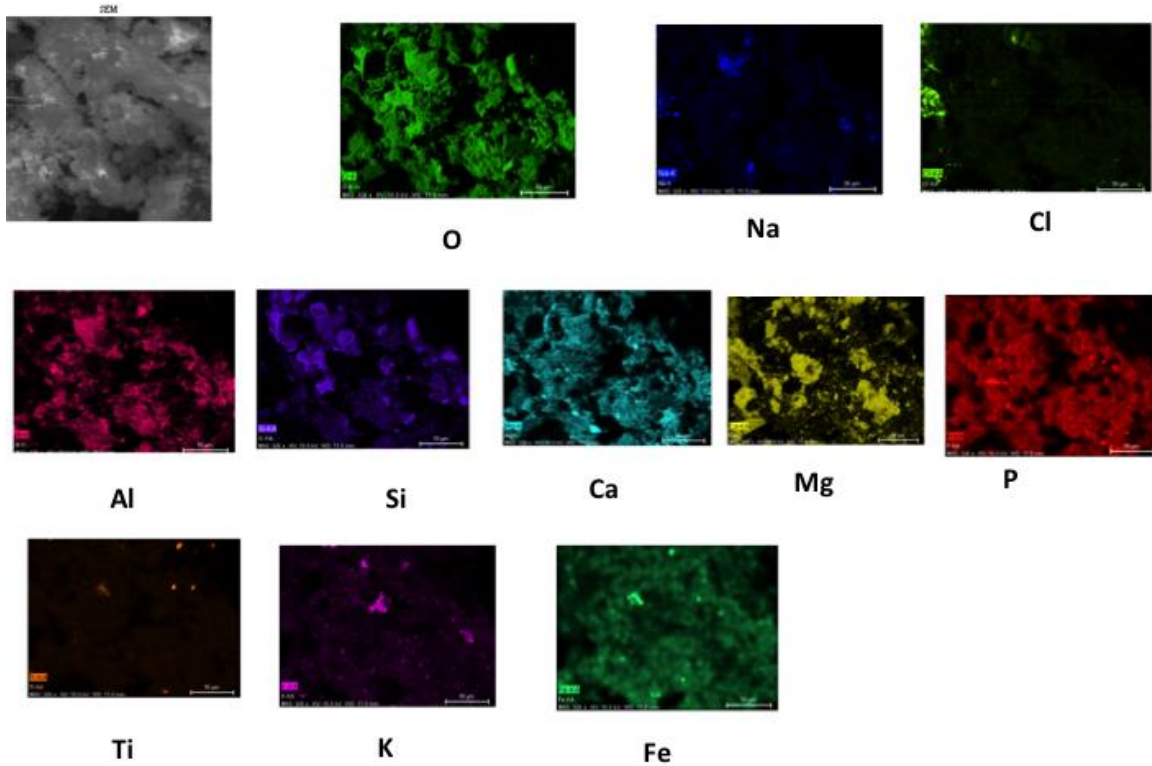


Figure 16: Exemple d'une cartographie élémentaire (analyse MEB couplée à la sonde EDX). La superposition des cartographies pour la silice et l'aluminium correspond à la présence d'argile (les minéraux argileux, sont des feuillets d'aluminosilicate chargés négativement).

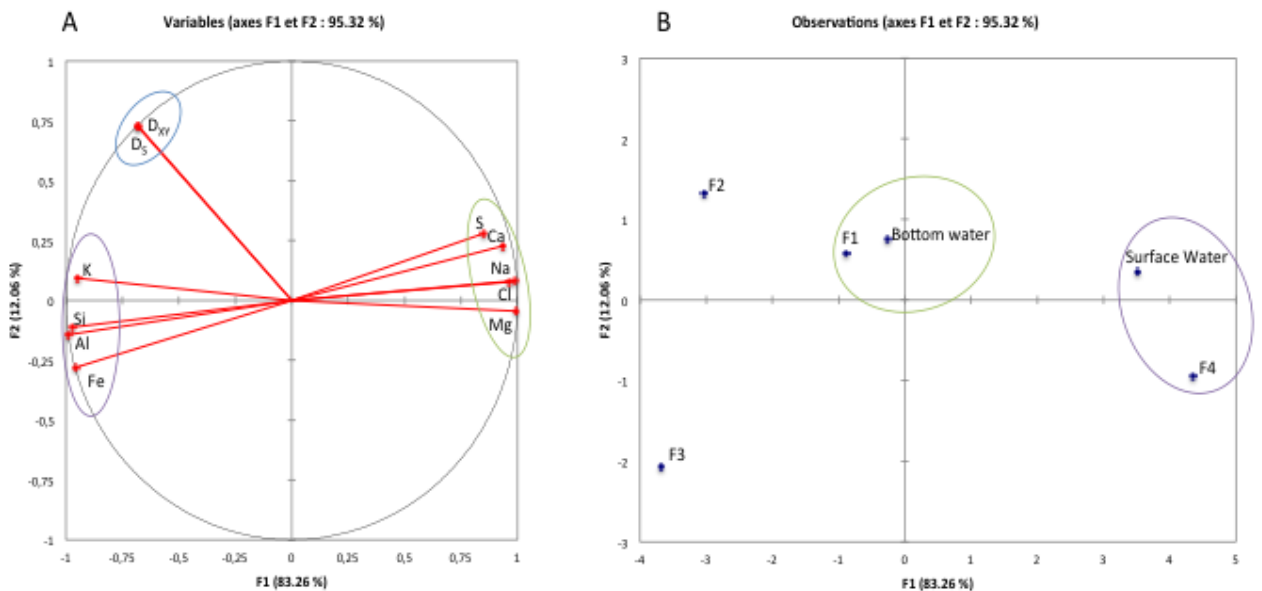


Figure 17: Analyse en composante principale de la composition minéralogique des fractions, de l'eau de surface et de l'eau du fond (MEB couplée à la sonde EDX) pour les campagnes DYNAPAT 1 et 2.

❖ **Conclusions:**

- En terme de taille, la proportion de silts (entre 2 µm et 63 µm) est majoritaire et constante (76%) dans les fractions F1, F2 et F3, alors que dans la fraction non décantée F4, la taille des particules est significativement plus petite avec 47% de silts, 50% d'argile ($\leq 2 \mu\text{m}$) et 3% de sable ($> 63 \mu\text{m}$).
- Les cartographies élémentaires et les observations au MEB couplées à une analyse semi quantitative de la composition minéralogique avec une sonde EDX, montrent la présence majoritaire d'argiles, des quartz et éventuellement des feldspaths potassiques dans les fractions F2 et F3, alors que les carbonates seraient majoritairement présents dans la fraction non décantable F4, et l'eau de surface

2.4 Caractérisation de la composante microbiologique associée aux différentes fractions

❖ **Etude de la diversité des communautés microbiennes en fonction de la taille des particules**

Considérant d'une part, que les fractions correspondent à des floccs concentrés par décantation en fonction de leur vitesse de chute, et d'autre part que ces floccs présents dans les fractions ont des tailles différentes voire des compositions minéralogiques différentes (résultats des profils micro-granulométriques et des observations au MEB), l'analyse de la diversité des communautés bactériennes a été réalisée en fonction de la taille pour chaque fraction (après une filtration séquentielle sur des tamis de porosité 50 µm, 2 µm et 0,45 µm (voir méthodologie en Annexe 4). Les ADN ont été extraits en triplicata selon la méthodologie présentée en Annexe 5. Cette analyse de la diversité en fonction de la fraction de décantation, qualifiée par une vitesse de chute, et par la taille, voire de la composition minéralogique, permettra une harmonisation des données acquises tant dans le domaine de la sédimentologie que dans celui de l'écologie microbienne. La campagne de prélèvement pour une décantation *in situ* a été réalisée pour des conditions de débit et d'amplitude de marées équivalentes à celles des campagnes DYNAPAT (Tableaux 2 et Figure 4). Les courbes cumulatives de la fréquence des particules en fonction de leur taille, assurent que les données de biologie moléculaire obtenues pourront être comparées aux autres données, préalablement acquises sur la taille et la composition des floccs (Figure 18).

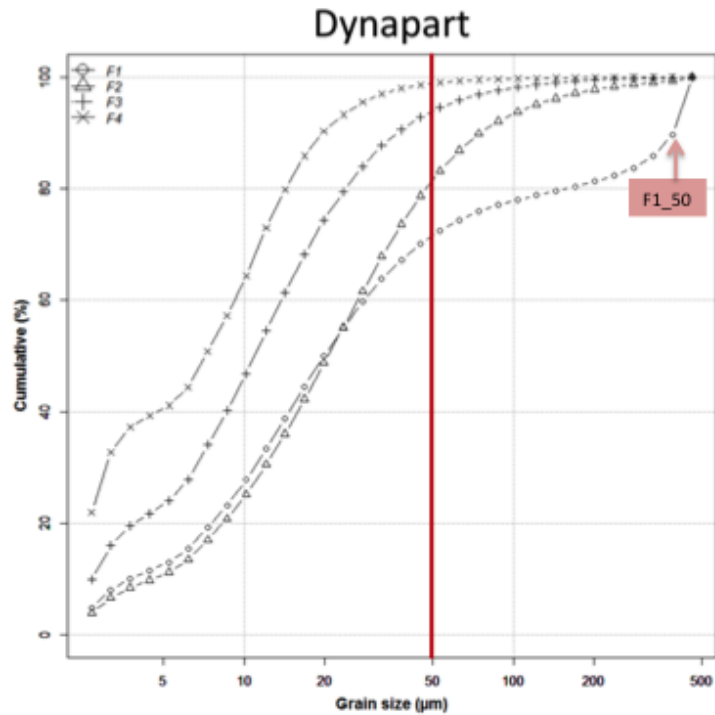


Figure 18: Courbes cumulatives de la fréquence des particules en fonction de la taille des fractions analysée en biologie moléculaire. Campagne DYNAPART spécifiquement dédiée à l'analyse de la diversité des communautés microbiennes (12/07/2015) ; F1 (O), F2 (Δ), F3 (+) et F4 (\times). Les conditions de débit et d'amplitude de marée étaient équivalentes à celles des campagnes DYNAPAT 1, 3, 4 (Figure 4).

Le tableau 4 permet de qualifier la diversité des communautés microbienne associées aux particules et valide la qualité du séquençage. L'indice de Shannon élevé pour toutes les fractions, est révélateur d'une forte proportion de taxons pour chaque classe de taille de particules dans les fractions F1 et F4. L'indice de diversité de Simpson (proche de 1), indique que la probabilité d'observer deux séquences appartenant à deux taxons différents est grande, démontrant que les taxons rares sont très présents dans les métagénomes (ADN totaux) analysés. L'estimateur de richesse Chao1 confirme la richesse taxonomique des échantillons analysés.

	F1_50	F1_2	F1_2	F1_0,45	F4_50	F4_2	F4_2	F4_0,45	EB_1	EB_2
Nombre de Séquences	152945	152943	145231	324455	133212	217851	134346	147943	117055	138246
OTUs	3699	7049	6298	4004	5030	5658	7026	4838	7812	5718
Estimateur Chao1*	4265	9127	7859	4923	6324	7668	8950	6263	9977	7375
Shannon [H]*	7,98	9,23	9,15	7,75	8,23	8,29	8,86	7,79	9,13	8,57
Simpson (1-D)*	0,950	0,986	0,986	0,973	0,979	0,977	0,982	0,972	0,983	0,982

* après normalisation/raréfaction

Tableau 4: Indices et estimateurs de diversité (diversité alpha) calculés pour chaque échantillon au seuil de 97% de similarité de séquences. Le séquençage haut débit (Miseq Illumina), a été réalisé sur le mélange des 3 amplicons (plateforme Get du Genotoul de Toulouse). Le traitement des données a été réalisé avec le logiciel Qiime, en utilisant la base de données Silva (version 213) pour l'assignation taxonomique. L'analyse de la diversité a été effectuée sur 117 055 séquences après ré-échantillonnage des données par raréfaction. Le nombre d'OTUs identifiés varie de 3699 à 7049 pour les fractions et de 5718 à 7812 pour l'eau brute. La nomenclature utilisée pour décrire les échantillons reprend le nom de la fraction et la porosité du tamis utilisé pour la filtration: la fraction F1_50, F1_2 et F1_0,45 ; F4_50, F4_2 et F4_0,45 ; Les fractions F1-2 et F4_2 sont des duplicata réalisés pour évaluer la répétabilité de l'approche méthodologique.

L'analyse de la diversité est présentée pour deux niveaux de résolution : sur la base des phyla (Figure 19) et plus finement sur la base des genres bactériens (Figure 20).

A l'échelle des Phyla

A l'exception de F1_50 µm, les trois phyla majoritairement observés dans les fractions F1 et F4 quelles que soient leurs tailles sont les *Proteobacteria* (41,13% - 73,32%), les *Bacteroidetes* (13,41% - 20,23%) et les *Actinobacteria* (3,54% - 32,77%) (Figure 19). Ces trois phyla ont été décrits dans des fleuves anthropisés (Mississippi, Henson et al., 2016 ; Tamise, Read et al., 2015 ; Danube Savio et al., 2015, Columbia, Crump et al., 1999). Il n'existe pas de différence notable dans la proportion de ces différents phyla, en fonction de la fraction (F1 ou F4) ou de la taille des particules (50 µm vs 2 µm vs 0,45 µm). Dans l'échantillon F1_50 µm, on observe une diminution de la proportion de *Bacteroidetes* en parallèle à une augmentation des *Proteobacteria* (Figure 19).

A l'échelle de la famille ou genre (Figure 20), à l'exception des particules de taille >50 µm présentes dans la fraction F1, on distingue 4 groupes prédominants dans toutes les autres fractions quelle que soit leur taille, qui par ordre d'importance sont :

- **Le clade hgcl (*Actinobacteria*, famille des *Sporichthyaceae*)** est le plus abondant dans tous les échantillons (variant de 17,38% à 25,38% des communautés bactériennes). Ce clade hgcl autotrophe ou hétérotrophe, qui tolère des variations importantes en matière organique dissoute et en oxygène est fréquemment isolé dans les eaux douces ou estuariennes (Lac Michigan, US ; Newton et al., 2015, Pearl Estuary, Chine, Liu et al., 2015, Mississippi (Henson et al., 2016 ; Ghylin et al., 2014).
- ***Pseudorhodofera* (β -*Proteobacteria*)** ; entre 4.19% et 20.2% de la communauté totale) comprend deux espèces présentes dans les sols ou les effluents traités de station d'épuration (Chen et al., 2013).

- **Le groupe NS11-12 (marin)** appartenant à la famille des *Sphingobacteriales* (*Bacteroidetes* ; entre 2,90% - 8,61% de la communauté totale). Des expérimentations en microcosme d'eau de mer ont démontré qu'une augmentation en matière organique dissoute induisait une augmentation de l'abondance de ce groupe, tout comme le clade hgcl et des *Actinobacteria* du groupe CL500-29 (Lindh et al., 2015).
- **Le groupe CL500-29** (marine group) ; *Actinobacteria* dont la plus proche espèce est *Microthrix parvicella*) constitue entre 3,07% et 6,07% de la communauté totale. Il a été montré que ces *Actinobacteria* se dissociaient des sédiments (ou des particules de sol) lors des crues d'hiver (Stepanauskas et al., 2003). Elles appartiennent également aux taxons dominants au sein de la mer baltique (sur un suivi annuel de 46 échantillons ; Lindh et al., 2015).

Au contraire, dans l'échantillon correspondant aux particules de taille > 50 µm présent dans la fraction F1, la communauté microbienne est dominée par deux groupes :

- un clone non cultivé de *Rickettsiaceae* (α -*Proteobacteria*, 20,2% de la communauté microbienne). Des bactéries appartenant à la famille des *Rickettsiaceae* ont été identifiées dans le microbiote de copépodes en mer du Nord (Gerds et al., 2013).
- Le genre *Undibacterium* (β -*Proteobacteria* : 13,02% de la communauté microbienne). Ce genre comprend 8 espèces isolées dans l'eau (potable, purifiée), le permafrost ou l'eau de culture de crevettes (Du et al., 2015) mais aussi les matières fécales, ou sur la peau d'un poisson d'eau douce du bassin amazonien (Sylvain et al., 2016). Dans ces environnements, l'abondance du genre *Undibacterium* augmenterait en présence de contaminant (Sylvain et al., 2016).

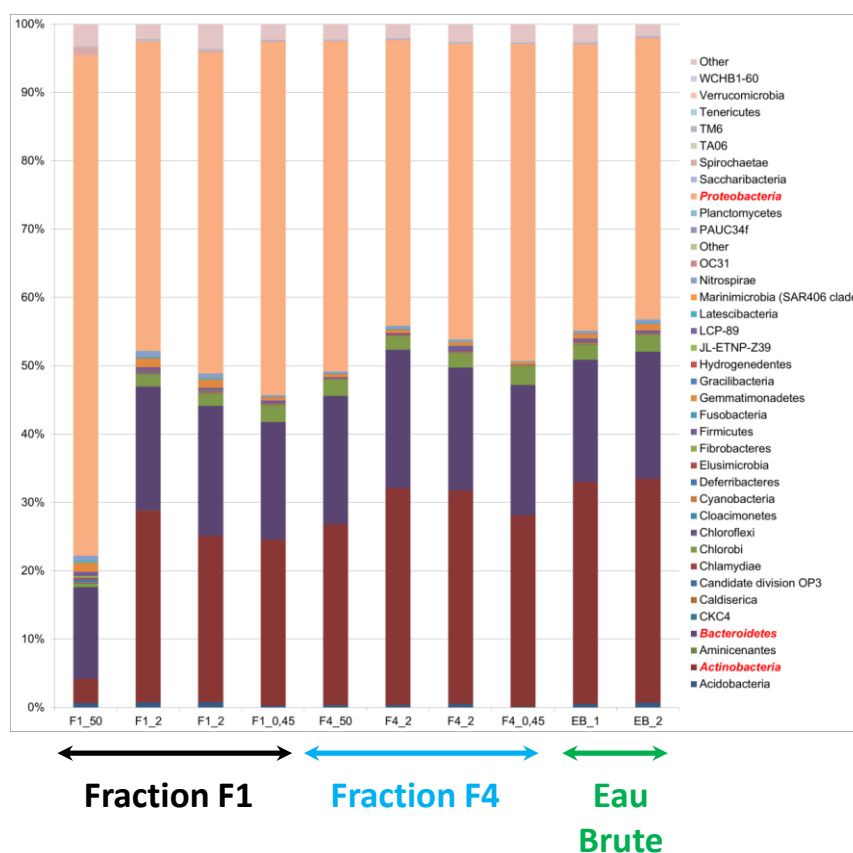


Figure 19: Abondance relative des principaux phyla bactérien associés aux fractions F1 et F4, en fonction de la taille des floes. Le traitement des données a été réalisé avec le logiciel Qiime, en utilisant la base de données Silva (version 213) pour l'assignation taxonomique.

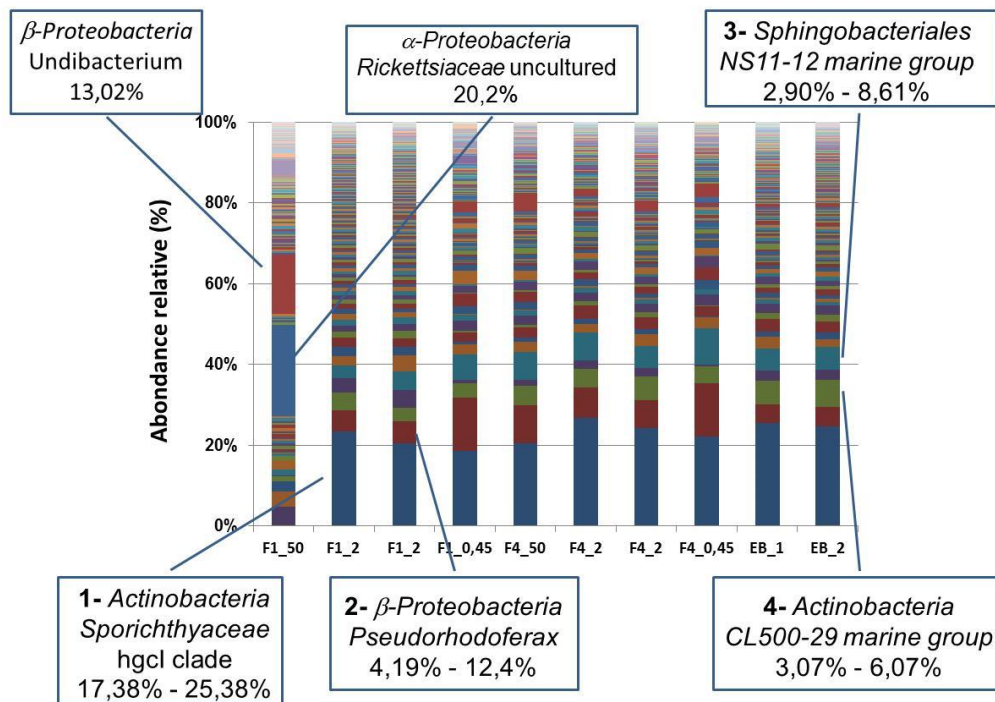


Figure 20: Abondance relatives des principaux genres bactériens associés aux fractions F1 et F4 en fonction de la taille des floccs. Le traitement des données a été réalisé avec le logiciel Qiime, en utilisant la base de données Silva (version 213) pour l'assignation taxonomique.

Les résultats montrent que la diversité de la communauté bactérienne présente dans la fraction F1_50 est différente de celle observée dans les autres échantillons. Ces différences de diversité s'observent non seulement avec la communauté bactérienne de la fraction F4, quelle que soit la taille des particules, mais également avec les communautés associées aux particules de taille inférieure à 50 μ m, retenues sur le filtre 2 μ m (F1_2) et sur le filtre 0,45 μ m (F1_0,45). Ces résultats s'expliquent par les profils micro-granulométriques des fractions qui montrent que les microflocs de 50 μ m sont uniquement retrouvés dans la fraction F1 et absents dans la fraction F4. Au contraire les microflocs de taille inférieure à 50 μ m sont présents dans la fraction F1 et F4 (Figure 18).

L'indicateur bactérien de contamination fécale, bactéries du genre *Enterococcus* a été identifié uniquement dans la fraction F4_2 (0.1% de la communauté totale), ce qui est cohérent avec les résultats précédents montrant que *E. coli* (le second marqueur bactérien de contamination fécale), était majoritairement présent dans la fraction F4. L'absence d'*E. coli*, alors que cette bactérie a été isolée par des méthodes culturales, a déjà été décrite lors d'analyses équivalentes de la diversité des communautés microbiennes environnementales (Cui et al., 2016). En effet, la proportion relative de cette espèce bactérienne (*E. coli*) allochtone au milieu est très faible au regard de la communauté bactérienne totale de ces environnements, lorsque l'on utilise des approches de séquençage haut débit ciblant l'ADNr 16S.

❖ **Conclusions**

A l'embouchure, dans l'eau de surface en présence du bouchon vaseux :

➤ Il n'existe pas de différence de diversité des communautés bactériennes associées aux floes des fractions F1 et F4, et ce quelles que soient leurs tailles. Les phyla majoritaires sont les *Proteobacteria* (41,13% - 73,32%), les *Bacteroidetes* (13,41% - 20,23%) et les *Actinobacteria* (3,54% - 32,77%),

➤ A l'exception de l'échantillon F1_50 µm qui correspond aux communautés microbiennes associées aux floes de taille supérieure à 50 µm, et dont la vitesse de chute est $> 1\text{mm.s}^{-1}$, où on observe une diminution de la proportion de *Bacteroidetes* en parallèle à une augmentation des *Proteobacteria*,

➤ L'indicateur bactérien de contamination fécale, *Enterococcus* n'est présent que dans la fraction F4_2 soit dans des floes de taille comprise entre 2 µm et 50 µm, et dont la vitesse de chute est $< 10^{-2}\text{mm.s}^{-1}$.

❖ **Occurrence des bactéries totales viables et des indicateurs de contamination fécale (*E. coli*) dans les différentes fractions**

Le dénombrement des bactéries viables par cytométrie en phase solide Chemsan RDI, a été réalisé sur chacune des fractions. La figure 21 montre la distribution relative des bactéries viables ou *E. coli* (exprimée en %) dans chaque fraction et pour chaque campagne. Pour se faire, la densité en *E. coli* (UFC.100mL^{-1}) ou en bactéries viables (nombre de bactéries. 100mL^{-1}) a été multipliée par le volume de chaque fraction, la somme du volume de chaque fraction correspondant au volume du décanteur. Il est ainsi possible de comparer le rôle de chaque fraction dans le transfert des bactéries dans la colonne d'eau. Ainsi exprimés, les résultats montrent que les *E. coli*, et dans une moindre mesure les bactéries autochtones sont majoritairement associées à la fraction F4, non décantable.



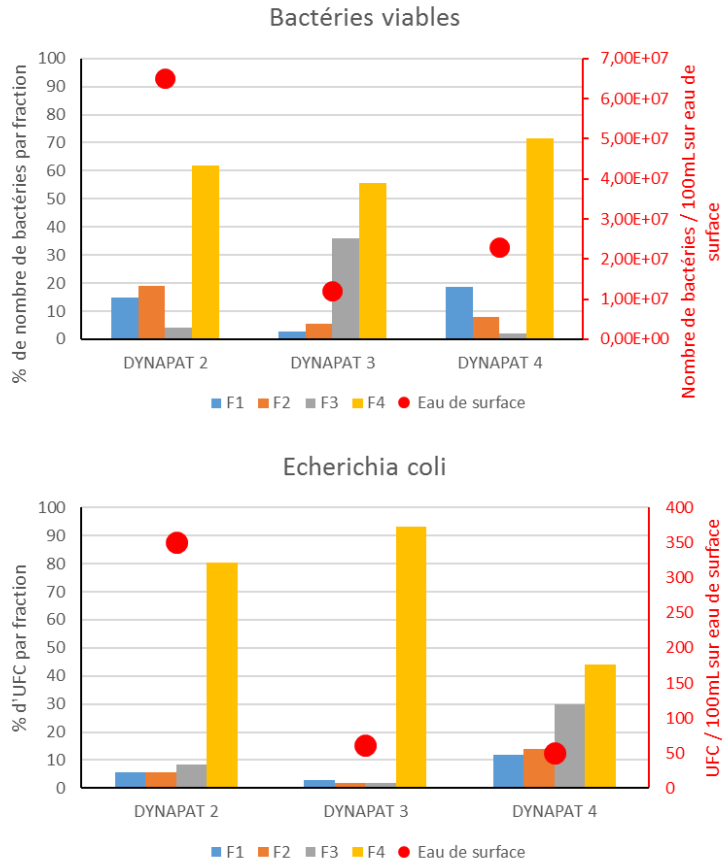


Figure 21 : Proportion relative des communautés microbiennes dans chaque fraction, et pour chaque campagne DYNAPAT. (A) communauté totale bactérienne viable quantifiée par cytométrie en phase solide (Chemscan RDI) après marquage enzymatique de la viabilité cellulaire; (B) *E. coli* (UFC.100 ml⁻¹) dénombrées sur gélose Rapid E.coli2 conformément, et selon le protocole développée au laboratoire M2C pour dissocier les bactéries des particules (Berthe et al., 2008; Petit et al., 2017).

❖ **Diversité des populations d'*Escherichia coli* dans les différentes fractions**

Dans cette étude, la diversité des populations d'*E. coli* a été réalisée sur la base de la distribution des phylogroupes selon la méthode Clermont et al. (2013). Cette diversité est utilisée dans cette étude comme proxy pour comparer les populations présentes dans les différentes fractions et dans la vase fluide correspondant à des dépôts récents (Berthe et al., 2013 ; Petit et al., 2017). L'objectif est ainsi de comparer la diversité des populations d'*E. coli*, dont la vitesse de chute diffère.

La figure 22 montre la diversité des populations d'*E. coli* dans les différentes fractions obtenues après décantation de l'eau de surface, et dans les sédiments de surface (crème de vase ou vase fluide) quand le bouchon vaseux est présent sur le site. A titre de comparaison, la figure 23 montre la diversité des populations dans la fraction F1 et F4 de l'eau de surface sur le même site, mais en période de crue.

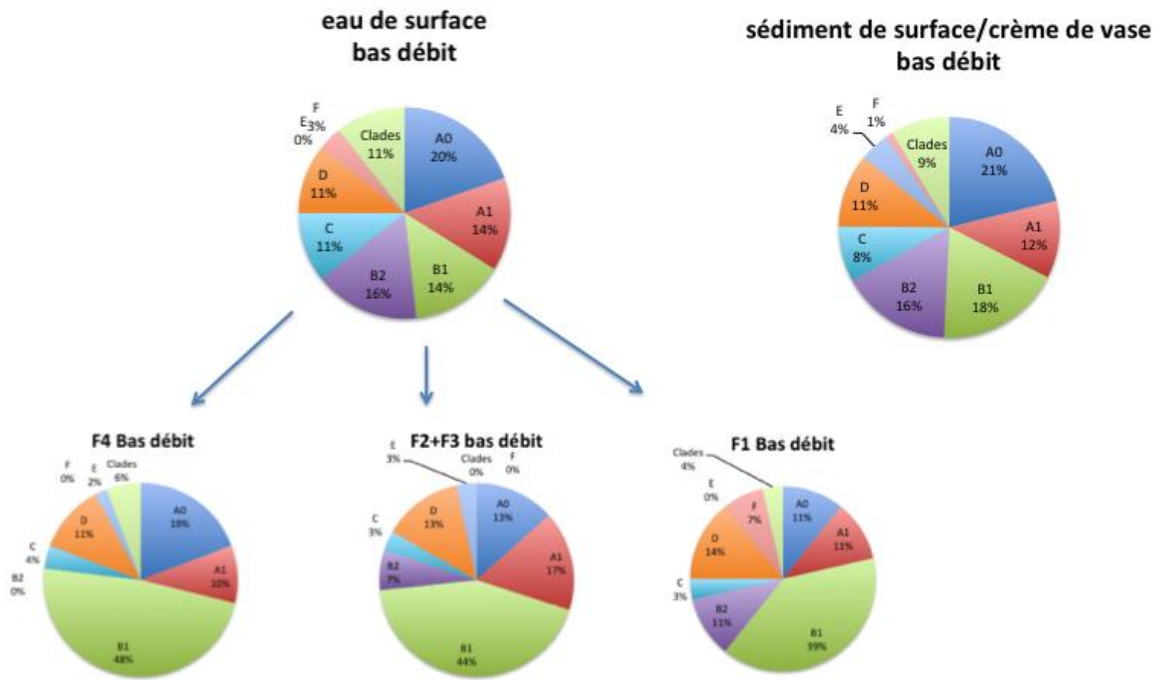


Figure 22: Diversité des populations d'*E. coli* en présence du bouchon vaseux dans l'eau de surface (N= 184), les différentes fractions de l'eau de surface F1 (N=27), F2+F3 (N= 30) et F4 (N= 53) et dans les sédiments de surface (crème de vase, N=101, moyenne sur 3 campagnes), en période de bas débit et présence du bouchon vaseux (moyennes sur deux campagnes). La collection de souches a été élaborée selon la méthode décrite dans (Berthe et al., 2013 ; Petit et al., 2017) et la diversité des populations d' *E. coli* a été réalisée sur la base de la distribution des phylogroupes selon la méthode de Clermont et al. (2013).

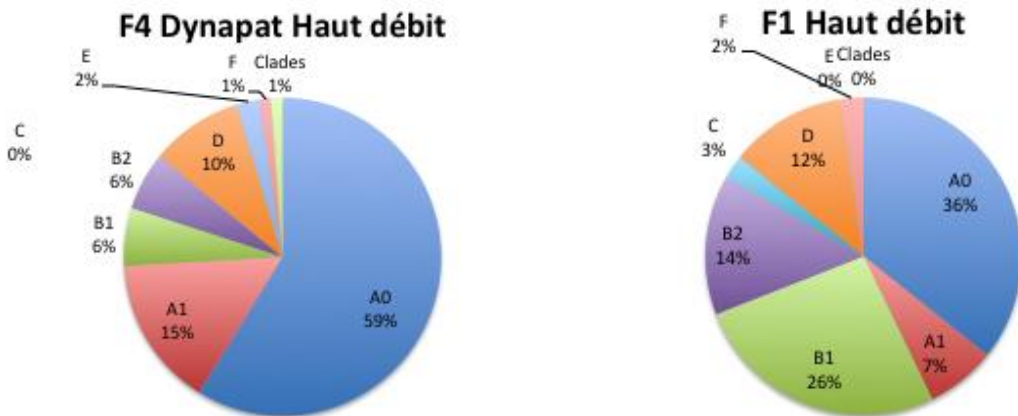


Figure 23: Diversité des populations de *E. coli* dans l'eau de surface en période de crue et en absence du bouchon vaseux (DYNAPAT 2), fractions F1 (N=49) et F4 (N= 80) crue. La collection de souches a été élaborée selon la méthode décrite dans Berthe et al. (2013) et la diversité des populations d' *E. coli* a été réalisée sur la base de la distribution des phylogroupes selon la méthode de Clermont et al. (2013).

Dans le bouchon vaseux, en période de bas débit (campagnes DYNAPAT 3,4), il n'existe pas de différence significative dans la structure des populations d'*E. coli* associées aux floes présents au fond où à la surface. De même, aucune différence n'est observée lorsque l'on compare la diversité des populations de *E. coli* dans les différentes fractions de décantation F1, F2+F3, et F4, ou entre les fractions et l'eau de surface. En revanche, en période de crue (DYNAPAT 2), on observe une différence entre la structure des populations

d'*E. coli* présentes dans les fractions F1 et F4. Dans la fraction F4, la proportion relative des souches du phylogroupe A0 est significativement plus importante, en parallèle la proportion relative de souches appartenant phylogroupe B1 est plus faible.

De façon plus globale, dans la colonne d'eau, il apparaît des différences importantes dans la structure des populations d'*E. coli* dans les fractions F1 et F4 de l'eau de surface, selon la présence du bouchon vaseux (absent en période de crue, DYNAPAT2; Figure 23). Dans cette zone géographique, la prédominance des souches d'*E. coli* appartenant au phylogroupe A0, dans l'eau suggère un apport d'*E. coli* d'origine humaine, alors qu'une prédominance de souches appartenant au phylogroupe B1, suggère plutôt un apport d'origine bovine, probablement lié aux apports des affluents drainant des régions agricoles (Massot et al., 2016; Petit et al., 2017; Ratajczak et al., 2010). Ces résultats sont aussi cohérents avec les travaux menés dans le cadre de Seine Aval 2, qui montraient qu'en période de bas débit, il y avait un apport prépondérant des affluents alors qu'en période de crue, la contamination en bactéries fécales était principalement due aux apports de l'amont (Garcia Armisen et al., 2005).

❖ **Conclusions :**

A l'embouchure (site de Tancarville), en période de bas débit et en présence du bouchon vaseux (campagnes DYNAPAT 3 et 4):

- Il n'existe pas de différence significative dans la structure des populations de *E. coli* associées aux floccs présents au fond où à la surface.
- Il n'existe pas de différence dans la diversité des populations de *E. coli* en fonction de leur vitesse de chute dans l'eau de surface, ni le long de la colonne d'eau (surface/fond/vase fluide).

En période de crue (DYNAPAT 2)

- On observe une différence entre la structure des populations d'*E. coli* présentes dans les fractions F1 et F4. Dans la fraction non décantable, dont la vitesse de chute est $\leq 10^{-2} \text{ mm.s}^{-1}$, la proportion relative des souches appartenant au phylogroupe A0 (majoritairement d'origine humaine) est significativement plus importante ; en parallèle on observe une plus faible proportion des souches du phylogroupe B1.



3 Impact des forçages mécaniques et des processus d'érosion sur la contamination microbiologique de la colonne d'eau (Tâche 2)

3.1 Contexte et rappel des objectifs

Dans la zone de l'embouchure de l'estuaire, sur le site de Tancarville, il existe une variabilité importante du niveau de contamination en *E. coli* (de 36 à 6 520 UFC.100 ml⁻¹ et une valeur moyenne de 154 UFC.100 ml⁻¹). La complexité de la dynamique particulaire spécifique de cette zone, et un apport en bactéries fécales par la Risle (Touron et al., 2007) explique probablement l'absence de corrélation attendue entre l'occurrence de *Salmonella* (bactérie pathogène d'origine fécale) et la densité en *E. coli* (Touron et al., 2007). A ce niveau de l'estuaire, le devenir des *E. coli*, dont une proportion de près de 10% sont des souches antibiorésistantes qui hébergent des intégrons cliniques, est fortement influencé par la dynamique particulaire (Laroche et al., 2009). Les *E. coli* se déposent sur les vasières adjacentes où elles perdent majoritairement leur cultivabilité (Ramond et al., 2009, Berthe et al., 2008).

Trois problématiques de santé humaine étroitement liées à la dynamique sédimentaire de cette zone de l'estuaire seront étudiées : 1) l'occurrence de pathogènes autochtones de la zone oligohaline de l'estuaire (les espèces pathogènes de *Vibrio*); 2) le devenir d'espèces bactériennes du genre *Aeromonas* dont certaines espèces sont autochtones du milieu estuarien et d'autres impliquées dans des maladies humaines; 3) l'antibiorésistance bactérienne en focalisant sur les intégrons cliniques, support génétique impliqués dans la multi-résistance aux antibiotiques. Dans cette étude, un suivi des intégrons a été réalisé au sein du génome des communautés microbiennes autochtones des sédiments. Deux types d'intégrons ont été recherchés : i) les intégrons cliniques (contaminants xénogénétiques; Gillings et al., 2008) qui sont proposés aujourd'hui comme des bio-indicateurs du risque de dissémination de l'antibiorésistance dans l'environnement (Borruso et al., 2016 ; Gillings et al., 2015), et ii) les intégrons environnementaux en tant que marqueurs globaux de résistances aux contaminants chimiques.

3.2 Distribution des bactéries indicatrices de contamination fécale (*E. coli*, *Enterococcus*) et des pathogènes (*Aeromonas* et *Vibrio*) dans l'embouchure

Pour l'ensemble des campagnes, la qualité microbiologique de l'eau (abondances d'*E. coli* et *Enterococcus*), à ce niveau de l'estuaire et à l'étale de pleine mer, est conforme à la directive européenne des eaux de baignades, à l'exception de février 2015 qui correspond à une période de crue (DYNAPAT 2). De même, les abondances en *E. coli* sont plus importantes au fond lors d'une campagne où le bouchon vaseux est positionné sur le site de Tancarville (Tableau 5) DYNAPAT 4 (valeur maximale en concentration pondérale de MES : 185 mg.L⁻¹).

Campagnes		DYNAPAT 1		DYNAPAT 2		DYNAPAT 3		DYNAPAT 4		DYNAPAT 5	
Date		28/08/2014		05/02/2015		16/06/2015		13/11/2015		25/01/2017	
		Eau ^{a/} _b	Sédiment _c	Eau ^{a/} _b	Sédiment _c	Eau ^{a/} _b	Sédiment _c	Eau ^{a/} _b	Sédiment _c	Eau ^{a/} _b	Sédiment _c
<i>E. coli</i> ^f	Surface	1,1 ± 0,2 10 ²	2,1 ± 1,2 10 ¹	3,5 ± 1,4 10 ²	3,5 ± 0,9 10 ²	6,2 ± 0,1 10 ¹	<5,0 10 ¹	5 ± 1 10 ¹	6,6 ± 2 10 ⁰	9 ± 0,1 10 ¹	2,1 ± 0,3 10 ¹
	Fond			5,5 ± 3,5 10 ¹		8,4 ± 0,6 10 ¹		1,5 ± 0,5 10 ²			
<i>Enterococcus</i> ^d		2,5 ± 0,7 10 ¹	5,0 ± 5,0 10 ⁰	2,6 ± 0,4 10 ²	5,2 ± 0,9 10 ²	< 5 10 ¹	2,6 ± 0,5 10 ¹	< 5 10 ^{1e}	8,0 ± 3 10 ¹	4,6 ± 0,2 10 ¹	2,7 ± 0,8 10 ¹
<i>Aeromonas</i>		1,3 ± 0,5 10 ²	9 ± 0,3 10 ²	3 ± 0,8 10 ²	5,2 ± 0,9 10 ²	4,6 ± 0,3 10 ²	9,1 ± 0,3 10 ²	1,3 ± 0,6 10 ²	2,6 ± 0,3 10 ²		
<i>Vibrio vulnificus/cholera</i> ^e		1,2 ± 0,1 10 ¹	8 ± 2 10 ¹	5 ± 0,5 10 ¹	5,2 ± 2 10 ²	9,3 ± 1,5 10 ²	7 ± 2 10 ²			2 ± 1 10 ¹	9 ± 2 10 ¹
<i>Vibrio parahaemolyticus</i> ^d		4,8 ± 1,1 10 ¹	1,5 ± 1,5 10 ¹	3,5 ± 0,3 10 ²	9,2 ± 2,5 10 ²	<5 10 ¹	4,3 ± 2,5 10 ¹			6 ± 2 10 ¹	1,5 ± 3 10 ²

Tableau 5 : Qualité microbiologique de l'eau et des sédiments sur le Site de Tancarville évaluée par un dénombrement des indicateurs microbiens (*E. coli*, *Enterococcus*) selon la méthode décrite par Petit et al., (2017), le dénombrement des *Aeromonas* selon la méthode décrite par Chaix et al (soumis), et le dénombrement des espèces pathogènes de *Vibrio* sur milieu chromagar. a eau de surface UFC.100 mL⁻¹, (prélèvement bouteille NISKIN, - 50 cm sous la surface), b eau du fond (prélèvement bouteille NISKIN, + 50 cm au-dessus de fond), c sédiment (masse humide) UFC g⁻¹; d UFC.100 ml⁻¹ou UFC.g⁻¹.

❖ **Occurrence et diversité des populations d'*Aeromonas* dans la zone de l'embouchure**

Sur la base des données bibliographiques, des résultats obtenus dans le cadre du projet COBAC, et des discussions avec les cliniciens de l'UMR Hydrosciences (Montpellier), il est apparu nécessaire d'analyser les copépodes, dont l'espèce *Eurytemora affinis* est majoritairement présente dans cette zone de l'estuaire (uniquement pour campagnes réalisées pendant la période de reproduction d'*E. affinis*). Une analyse des effluents traités de la STEU de Tancarville qui se rejettent dans cette zone a été réalisée comme témoin.

Lors des campagnes réalisées dans l'embouchure de l'estuaire (campagnes Dynapat et Cobac), les bactéries appartenant au genre *Aeromonas* ont toujours été isolées dans l'eau (de 1,1 10² à 1,2 ± 0,3 10³ UFC.100 mL⁻¹), les sédiments de surface (de 2,6 ± 2,6 10² à 9.8 ± 0.9 10 UFC.g⁻¹) ou les copépodes (de 1.9±0.7 10² à > 1.1 10⁴ UFC.g⁻¹). Il n'existe pas de corrélation entre l'occurrence d'*Aeromonas* et l'abondance des indicateurs bactériens de contamination fécale (*E. coli* et *Enterococcus*). Afin d'identifier les souches potentiellement pathogènes pour l'Homme ou pour les animaux aquatiques, une analyse de la diversité des populations d'*Aeromonas* sp. a été effectuée à partir d'isolats de l'eau, du sédiment et des copépodes. L'amplification et le séquençage des deux gènes de ménage *radA* (Roger et al., 2012) et *gyrB* (Yanez et al., 2003) a permis d'identifier 210 souches appartenant au genre *Aeromonas* (Figure 24).

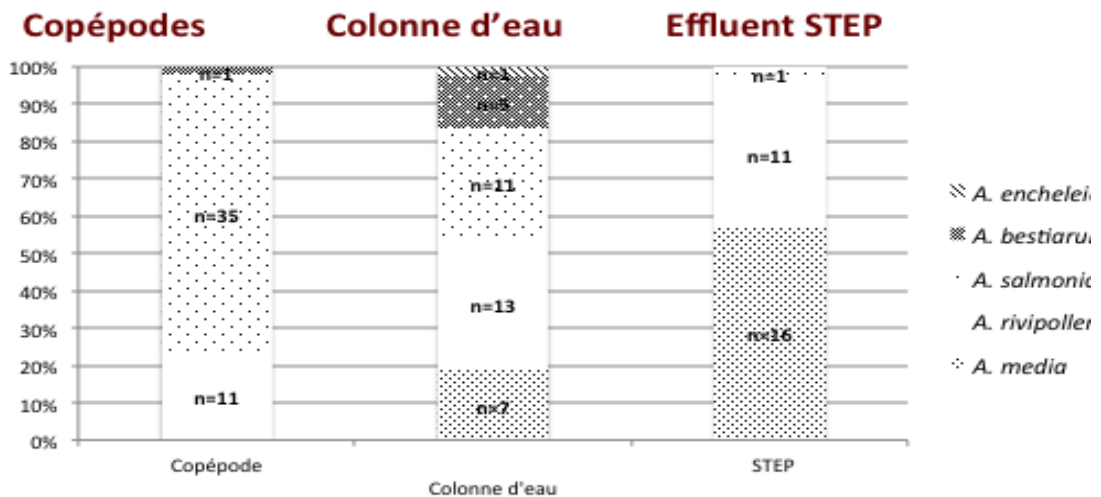


Figure 24 : Diversité des populations d'*Aeromonas* de l'eau, associées aux copépodes, ou présentes dans les effluents de STEU (Tancarville) dans l'embouchure de l'estuaire (site de Tancarville).

L'analyse des séquences montre que la population d'*Aeromonas* en estuaire est structurée en cinq clusters: *A. bestiarum* (n=6; 5,36%), *A. encheleia* (n=1; 0,89%), *A. media* (n=23; 20,54%) et *A. salmonica* (n=47; 41,96%) (Chaix et al., soumis). Parmi ces espèces, *A. salmonica* possède une distribution inégale au sein de la colonne d'eau: 74% des *Aeromonas* associées aux copépodes appartiennent à l'espèce *A. salmonica*; ce qui suggère que le copépode *E. affinis* serait une niche préférentielle pour cette espèce d'*Aeromonas*. En revanche, dans la colonne d'eau, il y a coexistence d'espèces autochtones (*A. salmonica*, *A. bestiarum*, *A. encheleia*) avec des espèces d'origine humaine ou animale rejetées par les effluents de STEU (*A. media*, *A. rivipollensis*). L'espèce *A. media*, potentiellement pathogène pour l'Homme est détectée dans la colonne d'eau, et est très abondante dans les effluents traités de la STEU.

❖ Occurrence et diversité des populations de *Vibrio* sp.

Les espèces pathogènes de *Vibrio* (*V. vulnificus/cholerae/parahaemolyticus*) sont présentes en permanence dans la colonne d'eau, avec des abondances qui ne varient pas significativement en fonction des campagnes (de $<5 \cdot 10^1$ à $9.2 \cdot 10^2$ UFC.100ml⁻¹ dans l'eau ; et de $1,5 \cdot 10^1$ à $9 \cdot 10^2$ UFC.g⁻¹ masse humide dans le sédiment). Il n'apparaît pas de relation simple entre l'abondance de ces espèces et le débit. Les sédiments semblent un réservoir permanent de ces souches, qui sont autochtones au milieu estuarien. Un soucier de plus de 150 souches a été élaboré ; un projet d'identification plus approfondie de ces espèces en partenariat avec l'Ifremer est envisagé, notamment pour confirmer la présence de *V. cholerae* (moins de 10 souches suspectes).

3.3 Impact des processus d'érosion : expérimentations FLOCSIM

❖ Contexte et objectif

Dans un estuaire, les bactéries associées aux particules dont la vitesse de chute est élevée, décantent plus rapidement et sont susceptibles de former un dépôt au fond du chenal (hauteur d'eau maximale de 9 m sur le site de Tancarville). En revanche, sur les vasières intertidales positionnées sur les rives, la hauteur d'eau étant variable en fonction de l'amplitude et du cycle de marée, des particules auxquelles les bactéries seront associées pourront s'y déposer, quelles que soient leurs vitesses de chute. Ainsi en période de basse mer et lorsque le bouchon vaseux est présent sur le site de Tancarville, il est possible de prélever de la vase fluide à la surface des vasières intertidales qui se découvrent. Cette vase fluide correspond aux MES du bouchon vaseux qui ont décanté sur les vasières et se caractérise par un pourcentage élevé d'humidité.

Les vasières de l'estuaire sont donc à la fois des zones de dépôts et/ou de piégeage de bactéries fécales, dont des bactéries antibiorésistantes, qui y perdent majoritairement leur cultivabilité (Berthe et al., 2013 ; Bergholz et al., 2011), mais aussi des réservoirs de pathogènes autochtones de ces milieux, notamment les espèces de *Vibrio* qui se développent en milieu estuarien. En effet, dans les estuaires, notamment en estuaire de Seine, les événements d'érosion, consécutifs aux courants de marée et/ou au batillage lié au trafic portuaire intense dans cette zone, ou encore à la Houle, seront responsables de la remise en suspension dans la colonne d'eau des sédiments et des bactéries associées (Deloffre et al., 2007 ; Lesourd et al., 2003). Si la remise en suspension des sédiments est aujourd'hui considérée comme une source secondaire de contamination de la colonne d'eau (Droppo et al., 2009), peu d'études ont quantifié les flux correspondant dans la colonne d'eau.

L'objectif de cette étude était donc i) de quantifier expérimentalement les flux en bactéries fécales (*E. coli* et *Enterococcus*) et en *Vibrio* pathogènes autochtones de l'estuaire dans la colonne d'eau, consécutifs à une remise en suspension des sédiments et ii) de rechercher à quelle fraction en terme de vitesse de chute étaient associées ces bactéries.

❖ Démarche expérimentale

L'expérimentation de remise en suspension des sédiments en réacteur FLOCSIM (FLUMES-SA5) a été menée (en triplicata) au laboratoire pendant une durée de 30 minutes avec une vitesse de rotation de la grille correspondant à un taux de cisaillement de 80 s^{-1} . Un couplage avec une expérience de décantation dans les conditions définies en a été réalisée en duplicata afin de caractériser à quelle classe de floccs les bactéries étaient associées (FLOCSIM 2A et 2B).

- Stratégie des prélèvements

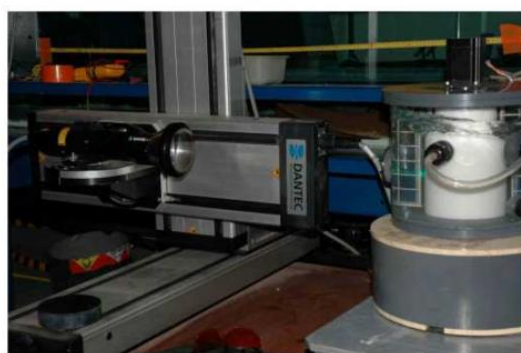
En cohérence avec les travaux précédents, les sédiments ont été prélevés en période de basse mer sur le site de Tancarville, lors du découverture des vasières, durant une période où le bouchon vaseux est présent. Dans ces conditions, les MES du bouchon vaseux décantent sur les vasières sous forme de vase fluide, qui se caractérise par un pourcentage élevé d'humidité. Deux campagnes de prélèvements de sédiments ont ainsi été réalisées sur le site de Tancarville le 25/01/2017 (coefficient de marée 58 - débit de $241 \text{ m}^3 \cdot \text{s}^{-1}$) pour l'expérimentation notée Floccsim 1, et le 26/01/2017 (coefficient 68 - débit de $249 \text{ m}^3 \cdot \text{s}^{-1}$) pour

Flocsim 2A et 2B couplées à une décantation. Les données altimétriques, le % d'humidité et la granulométrie, en parallèle à une analyse microbiologique permettront de caractériser le sédiment utilisé dans cette expérimentation (Tableaux 3 et 6, Annexe 6).

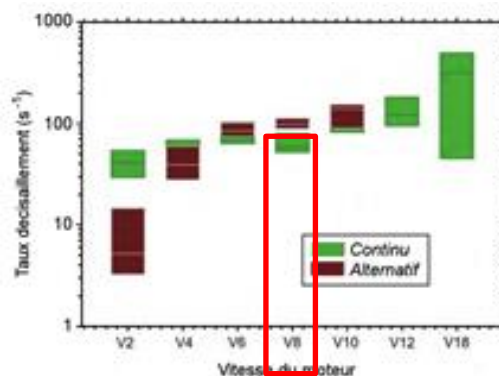
- *Choix des paramètres expérimentaux* : taux de cisaillement et durée de l'expérimentation

En estuaire de Seine le taux de cisaillement est compris entre 0 (valeur théorique à l'étape de pleine mer) et 100 s^{-1} , (Manning et al., 2010; Verney et al., 2007). La vitesse choisie pour la remise en suspension des sédiments, par rotation de la grille du réacteur FLOCSIM correspond un taux de cisaillement de 80 s^{-1} , valeur observée sur le site de Tancarville au pic du flot. Dans le réacteur FLOCSIM, le taux de cisaillement est assuré par une turbulence de grille, la correspondance entre la vitesse de rotation de la grille et le taux de cisaillement a été établie par une calibration par LDV (Laser Doppler Velocimeter a permis d'établir (Figure 25, FLUMES-SA5).

Le temps de l'expérimentation a été fixé à 30 minutes, soit la durée où les vitesses de courant sont maximales pendant le flot.



Calibration de la turbulence par LDV



(A)

(B)

Figure 25: Calibration du taux de cisaillement dans le réacteur FLOCSIM par mesure LDV (Laser Doppler Velocimeter). (A) Photographie de l'expérience et (B) relations entre les vitesses de rotation de la grille et le taux de cisaillement (Projet FLUMES, SA4).

- *Déroulement de l'expérimentation* :

Les sédiments ont été déposés à la base du réacteur, puis 6 litres d'eau de Seine filtrée (sur membrane de porosité $1,2 \mu\text{m}$) ont été délicatement ajoutés afin de limiter les perturbations (prélèvement de surface le 25/01/2017 à Tancarville au centre du chenal). L'absence de MES dans l'eau filtrée introduite dans le réacteur a été contrôlée par une analyse de micro-granulométrie (LISST). La qualité microbiologique des sédiments, et de l'eau du réacteur à l'issue des 30 min d'expérimentation, a été évaluée par un dénombrement des *E. coli* et *Enterococcus* en parallèle au dénombrement des souches pathogènes de *Vibrio* sur milieu Chromagar (Tableau 6). Les *E. coli* et les concentrations pondérales en MES ont été estimées dans chaque fraction de décantation.

❖ **Impact de l'érosion des sédiments sur la contamination de la colonne d'eau en réacteur FLOCSIM**

La granulométrie de l'échantillon de sédiment prélevé à Tancarville pour les expérimentations FLOCSIM montre des modes à 10 et 80 µm retrouvés classiquement en estuaire de la Seine avec un D50 de 36.2µm (Annexe 6). Le pourcentage d'humidité élevé des sédiments (Tableau 3) confirment que les sédiments utilisés pour les expérimentations FLOCSIM correspondent à un dépôt récent, avec toutefois une différence dans les taux d'humidité qui suggère un dépôt plus récent correspondant à de la vase fluide (de 277% v/v) pour l'expérimentation Floccsim 2, comparé à celui prélevé pour l'expérimentation Floccsim 1 (105%). La différence entre les expérimentations Floccsim 1 et Floccsim 2 reposait sur l'épaisseur du sédiment érodé, et donc la concentration en MES dans le réacteur à la fin de l'expérimentation soit 127 mg.L⁻¹ (Floccsim 1), 181 mg.L⁻¹ (Floccsim 2A) et 292 mg.L⁻¹ (Floccsim 2B). Les résultats de l'analyse microbiologique montrent que la contamination par des *E. coli* est du même ordre dans les deux types de sédiments alors que l'on note une abondance plus importante en espèces pathogènes de *Vibrio* dans le sédiment prélevé le 25/01/2017 (Floccsim 1). Ces résultats peuvent s'expliquer par un dépôt récent de particules/ floccs auxquelles ces espèces bactériennes ne sont pas ou peu associées.

Les résultats obtenus au cours de deux expériences Floccsim montrent, après 30 minutes d'agitation à une vitesse de cisaillement de 80 s⁻¹, une contamination en *E. coli*, *Enterococcus* et en espèces *Vibrio* pathogènes dans la colonne d'eau. L'absence de croissance bactérienne dans l'eau filtrée qui a servi à l'expérimentation (incubée 24h à température ambiante et à 37°C), exclut l'hypothèse d'une croissance bactérienne dans l'eau pendant le temps de l'expérimentation et permet de conclure que cette abondance bactérienne résulte de la remise en suspension des sédiments dans l'eau. Pour un même sédiment, l'augmentation de l'abondance des *E. coli* et *Enterococcus* observée entre les expérimentations Floccsim 2A et Floccsim 2B peut s'expliquer par la quantité plus importante de sédiments remise en suspension. La comparaison avec l'expérimentation Floccsim 1, montre des abondances plus élevées en *E. coli* qui peuvent s'expliquer par un niveau de contamination plus important du sédiment d'origine. En revanche, il n'est pas observé une augmentation significative des abondances en espèces pathogènes de *Vibrio*. Il est possible d'estimer un flux de bactéries remises en suspension, exprimé en UFC par m² de sédiments érodés, qui varie de 6,9 10³ à 5,3 10⁴ UFC.m⁻² pour *E. coli* ; de l'ordre de 10⁵ UFC.m⁻² pour *Enterococcus*, de l'ordre de 8,6 10⁴ UFC.m⁻² pour *Vibrio vulnificus/cholerae* et 1,5 10⁴ UFC.m⁻² pour *Vibrio parahaemolyticus* en fonction de la qualité microbiologique du sédiment d'origine et de l'épaisseur de sédiment érodé.



	Flores bactériennes	Sédiments (UFC.g ⁻¹) ^a	Eau dans le réacteur UFC.100 mL ⁻¹		Flux dans le réacteur UFC.m ⁻²
			T=0	T=30 min	
Flocsim 1	<i>E. coli</i>	2 ± 0,2 10 ¹	0	19	5,3 10 ²
	<i>Enterococcus</i>	4 ± 1 10 ¹	0	NA	
	<i>Vibrio vulnificus/cholerae</i>	1,8 ± 0,2 10 ²	0		
	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	3,4 ± 0,6 10 ²	0	50	1,4 10 ²
Flocsim 2 A*	<i>E. coli</i>	4 ± 0,3 10 ¹	0	2,5	6,9 10 ¹
	<i>Enterococcus</i>	1 ± 0,1 10 ²	0	36	10 ³
	<i>Vibrio vulnificus/cholerae</i>	5,6 ± 1 10 ¹	0	32	8,9 10 ²
	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	5,6 ± 2 10 ¹	0	6	1,7 10 ²
Flocsim 2B ^b	<i>E. coli</i>	4 ± 0,3 10 ¹	0	12	3,3 10 ²
	<i>Enterococcus</i>	1 ± 0,1 10 ²	0	76	2,1 10 ³
	<i>Vibrio vulnificus/cholerae</i>	5,6 ± 1 10 ¹	0	28	7,8 10 ²
	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	5,6 ± 2 10 ¹	0	6	1,7 10 ²

Tableau 6: Impact de l'érosion du sédiment sur la qualité microbiologique de l'eau (expérimentation FLOCSIM). Les sédiments sont prélevés le jour même de l'expérimentation. Les analyses microbiologiques des sédiments avant leur dépôt dans le réacteur, et de l'eau (6L) après les 30 minutes de remise en suspension, ont été réalisées selon le protocole décrit dans (Petit et al., 2017), et complétées par un dénombrement des espèces de *Vibrio* pathogènes sur milieu Chromagar. ^a masse sèche, ^b expérimentation réalisée avec le même sédiment mais avec une quantité différente dans le réacteur pour Flocsim 2B comparée à Flocsim 2A. Le flux de bactéries (UFC/100cm² de sédiment érodés) remises en suspension dans le réacteur, pour une surface totale de sédiment érodé de 216 cm² dans un volume total de 6L d'eau, a été estimé de la façon suivante : ((UFC.100mL⁻¹ x 60)/ surface (soit 216 cm²)) x 10⁴).

Une étude plus approfondie (Flocsim 2A et 2B) a été menée en couplant une expérience de décantation à l'expérimentation en réacteur, selon le protocole défini dans le cadre du projet DYNAPAT (Figure 26).

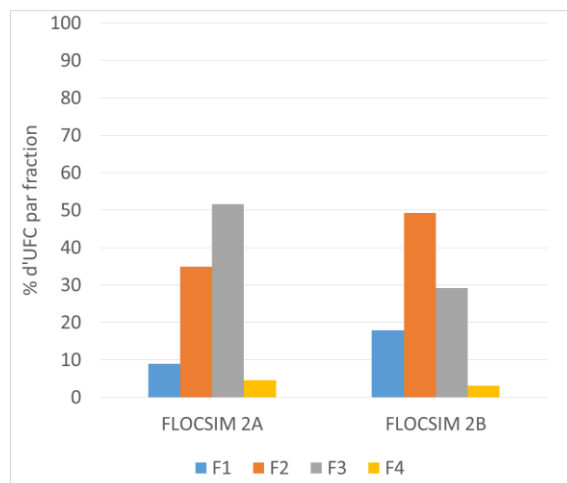


Figure 26 : Distribution relative d'*E. coli* par fraction à l'issue de l'expérimentation FLOCSIM. A l'issue des 30 minutes d'érosion des sédiments dans le réacteur FLOCSIM, une expérimentation de décantation a été menée pour déterminer à quelle fraction particulaire étaient associées les bactéries *E. coli* ; les résultats sont exprimés en proportion de *E. coli* (% UFC) par fraction, et ramenés au volume total du décanteur (expérimentations FLOCSIM 2A et 2B).

La figure 26 montre que les populations d'*E. coli* présentes dans la colonne d'eau après la remise en suspension des sédiments sont majoritairement associées aux fractions F2 et F3, alors que les décantations *in situ* ont montré que les *E. coli* présents dans la colonne d'eau sont majoritairement associés aux particules de la fraction F4 (non décantable, DYNAPAT 2, 3 et 4).

❖ Conclusions

En conclusion, l'expérience menée en réacteur FLOCSIM démontre que :

- Dans la colonne d'eau, la remise en suspension des sédiments de vase est une source de contamination de la colonne d'eau
- A l'échelle de la vase de Tancarville (superficie totale = 22 500 m²), le flux correspondant de bactéries pour un événement de flot est de 1,55 10⁸ à 1,2 10⁹ UFC.m⁻² pour *E. coli* ; de l'ordre de 2,25 10⁹ UFC.m⁻² pour *Enterococcus*, de 1,9 10⁹ UFC.m⁻² pour *Vibrio vulnificus / cholerae* et de 3,3 10⁸ UFC.m⁻² pour *Vibrio parahaemolyticus*. Ces bactéries sont susceptibles de se redéposer à nouveau sur la vase en période d'étalement de pleine mer,
- Les populations d'*E. coli* remises en suspension lors de l'érosion des sédiments, sont majoritairement associées aux fractions F2 et F3, alors que celles présentes dans l'eau de surface sont majoritairement associées à la fraction non décantable F4.
- Le sédiment joue ici le rôle de réservoir secondaire de contamination de la colonne d'eau en *E. coli* mais aussi en espèces pathogènes de *Vibrio*.

4 Occurrence et analyse de la diversité des intégrons dans les sédiments (Tâche 3)

4.1 Contexte et objectifs

Les sédiments sont des niches écologiques (« hot spot »), où les communautés microbiennes autochtones sont exposées simultanément à des concentrations sub-inhibitrices en antibiotiques, à une multi-exposition chronique aux contaminants chimiques (métalliques, biocides), auxquels s'ajoute un apport continu en bactéries antibiorésistantes d'origine humaine ou animale, et donc de gènes de résistance aux antibiotiques (intégrons cliniques) (Calero-Caceres et al., 2017; Chen et al., 2014; Koczura et al., 2016; Su et al., 2014). Il a été démontré que la présence de contaminants métalliques, sont des facteurs favorables à la dissémination de l'antibiorésistance (Seiler et al., 2012 ; Di Cesare et al., 2016).

De nombreux intégrons ont été décrits chez des bactéries environnementales avec de nombreuses cassettes de gènes (> 100) codant des fonctions variées (Cambray et al., 2010). Dans le milieu estuarien anthropisé, où la contamination chimique exerce une pression de sélection sur les microorganismes, au delà des intégrons cliniques (qui confèrent une multi-résistance aux antibiotiques), les intégrons environnementaux sont des facteurs essentiels dans l'adaptabilité génétique des communautés microbiennes. Dans cette étude, les intégrons constituent un marqueur global d'acquisition de multi-résistance aux antibiotiques et /ou aux contaminants chimiques (Stalder et al., 2012).

Dans ce contexte, dans le projet DYNAPAT, l'occurrence des intégrons cliniques au sein des communautés microbiennes associées au sédiment a été étudiée à différentes échelles a) de temps allant de l'actuel (sédiments de surface de l'embouchure) à plusieurs années (40 ans, sédiments de la carotte Rhapsodis) et b) spatiale au niveau d'un continuum présentant un gradient croissant de pression anthropique (transect « Sébec - Risle - embouchure de l'estuaire »). Ces travaux ont donné lieu à une optimisation du protocole d'extraction (voir annexe), et d'analyses inter-laboratoires notamment pour la quantification des intégrons et du gène codant l'ARNr 16S.

4.2 Occurrence des intégrons cliniques dans les sédiments à différentes échelles spatio-temporelle

Les intégrons dits « cliniques » ou « de résistance » appartiennent aux classes 1, 2 et 3. Ils sont définis selon la séquence en acides aminés de l'intégrase *IntI*. Plusieurs travaux ont montré que la présence d'intégrons cliniques au sein de bactéries était corrélée à une multi-résistance aux antibiotiques (Barraud et al., 2014; Leverstein-van Hall et al., 2003). De plus, des travaux récents ont montré que les intégrons, notamment de classe 1, constituaient un bio-indicateur pertinent de pollution anthropique (Amos et al., 2015 ; Gillings et al., 2015), leurs concentrations étant notamment bien plus importante dans les effluents hospitaliers que dans d'autres types d'effluents (ville, abattoirs, rivières... ; Stalder et al., 2014).

Dans le cadre du projet DYNAPAT, notre travail s'est attelé à quantifier les intégrons cliniques (Barraud et al., 2010) de façon relative, c'est-à-dire en normalisant leurs concentrations par le nombre total de bactéries (via la quantification du gène de l'ARNr 16S), tel que nous l'avons préalablement fait dans un travail antérieur (Stalder et al., 2014).

Ce travail de quantification des intégrons, exprimé sous forme d'abondance relative, a été mené à partir des échantillons de vasières du site de la Risle, de la carotte Rhapsodis, ainsi que des sédiments et crèmes de vase du site de Tancarville. Quelle que soit la matrice analysée, les résultats ont montré que seuls les intégrons de classe 1 pouvaient être quantifiés, les intégrons de classe 3 étant inconstamment détectés à des concentrations en deçà du seuil de quantification de la technique de qPCR et les intégrons de classe 2 n'étant jamais détectés.

❖ **Les sédiments de la vasière de Tancarville**

Dans les sédiments et la crème de vase prélevés au cours des campagnes DYNAPAT 1, 2, 3 et 4, les concentrations bactériennes étaient constantes, de l'ordre de 10^7 bactéries par gramme d'échantillon, et ce, quel que soit l'échantillon. Il en était de même pour les concentrations en intégrons de classe 1, avec 10^5 copies par gramme d'échantillon, soit une abondance relative de 0,01 copies d'intégrons par bactérie. Aucune différence significative n'a été observée entre les différentes campagnes. Les intégrons de classe 2 n'ont été détectés dans aucun échantillon. Les intégrons de classe 3 ont pu être détectés dans tous les échantillons mais sans qu'ils soient quantifiables; leurs abondances relatives seraient de l'ordre de 0,005 copies par bactérie.

Les résultats montrent qu'il y a bien une contamination des vasières par des intégrons cliniques mais que le niveau reste faible au regard des données disponibles dans la bibliographie, ce qui suggère une disparition qui peut s'expliquer par les remaniements permanents dans cette zone, dus aux cycles de dépôt et remise en suspension des sédiments en fonction des cycles de marée.

❖ **Transect: Sébec- Risle - Embouchure de l'estuaire**

Dans les vasières de la Risle (Figure 27, Annexe 7), les concentrations bactériennes étaient relativement constantes, de l'ordre de 10^9 bactéries par gramme de vase. Les concentrations en intégrons de classe 1 étaient très faibles, à la limite du seuil de quantification, et ce quel que soit l'échantillon. Elles ont néanmoins montré une différence entre la vasière V1, localisée en zone rurale, et les vasières V2 - V3 - V4, situées à l'aval des rejets des stations de traitement des eaux usées (STEU) de Pont Audemer (W1) et de Toutainville (W2, confluence entre la Tourville et la Risle). L'abondance relative des intégrons de classe 1 est inférieure dans les sédiments de surface de la vasière V1 (abondance relative de 0,001) comparativement aux vasières V2 à V4 (abondances relatives comprise entre 0,0023 – 0,0047). Aucune différence significative n'a été observée en fonction de la profondeur, excepté pour l'échantillon le plus profond (9 - 12 cm) de la vasière V4 avec une abondance relative de 0,01. Ces résultats suggèrent que des bactéries portant des intégrons cliniques sont apportées par les rejets traités de station d'épuration des eaux usées et que ni les bactéries ni leur ADN ne semblent se maintenir dans les sédiments des vasières localisées à l'aval de ces rejets.

Aucun intégron de classe 2 n'a été détecté. Les intégrons de classe 3 ont été détectés dans certains échantillons mais à des quantités inférieures au seuil de quantification de la technique, empêchant la détermination de leurs abondances relatives qui se situent à des valeurs inférieures à 0,001 copies par bactérie.

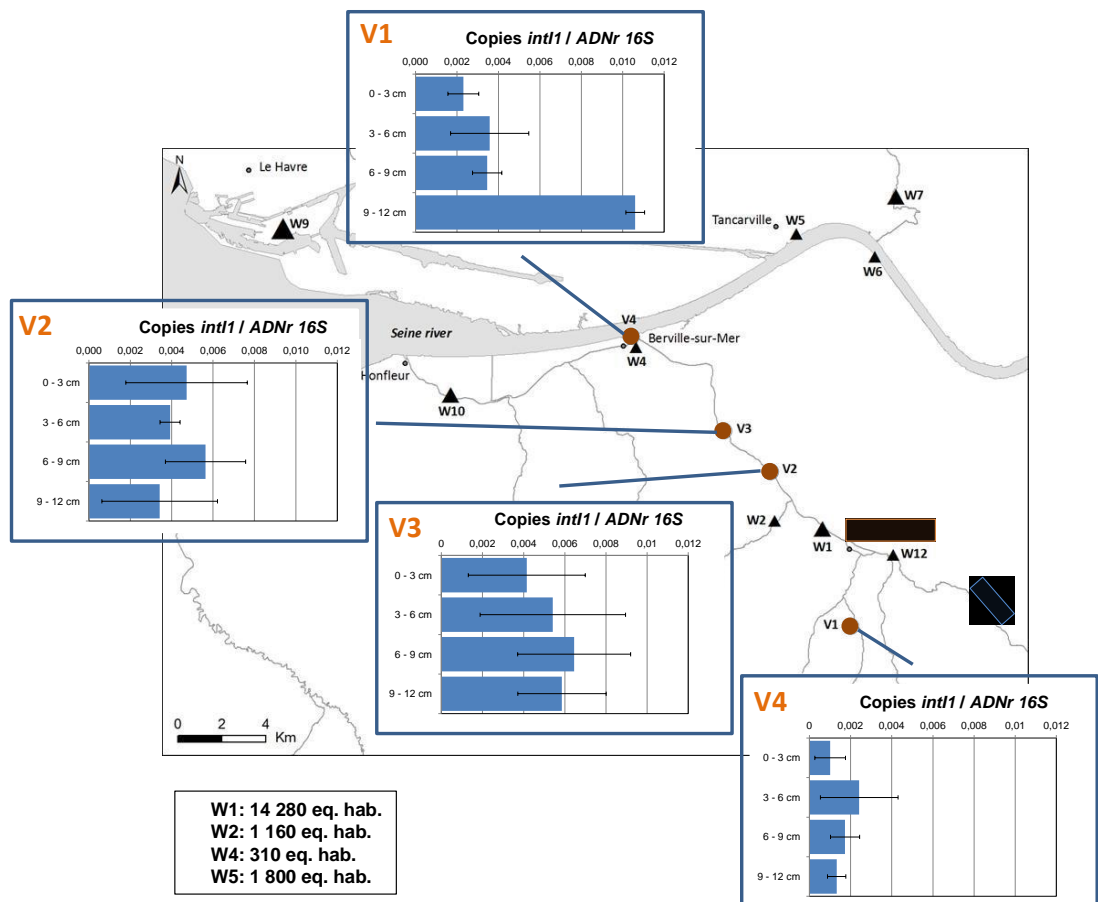


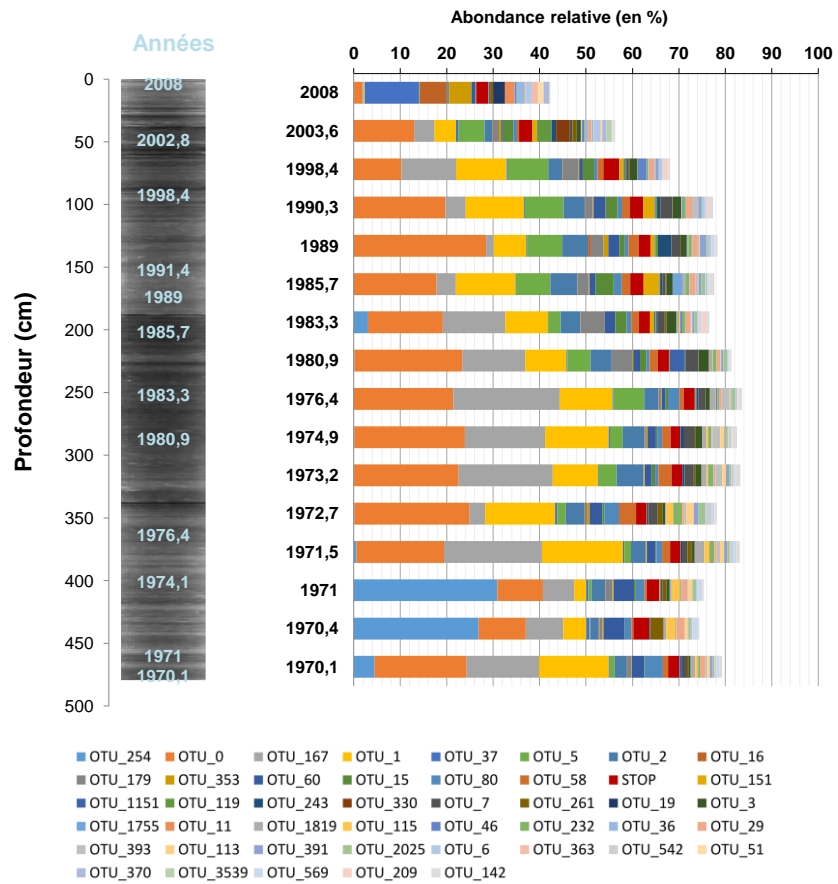
Figure 27: Abondance relative des intégrons cliniques dans les sédiments le long du transect « Sébec-Risle - Embouchure de l'estuaire ». Evolution de l'abondance relative des intégrons de classe 1 (copies *int1* / ADNr 16S) dans des sédiments de vase (V1 à V4) le long d'un transect «Sebec - Risle - Embouchure ». La capacité de traitement des stations de traitement des eaux usées est donnée en équivalents habitants (eq. hab.).

❖ **Enregistrement sédimentaire 40ans (carotte Rhapsodis)**

La carotte Rhapsodis, de 5 mètres de longueur, a été découpée en 18 horizons correspondant aux années allant de 2008 (2,5 cm de profondeur, horizon M1) à 1970 (477,5 cm de profondeur, horizon C28). La quantification des bactéries était relativement constante, quel que soit l'horizon, avec des concentrations de l'ordre de 10^8 - 10^9 bactéries par gramme de sédiment (qPCR 16S). Une nette différence a été observée lors de la quantification des intégrons clinique de classe 1 : celle-ci était importante dans l'horizon le moins profond correspondant au sédiments les plus récents (environ 10^8 copies / gramme de sédiment), soit une abondance relative de l'ordre de 0,07 copies par bactérie (Figure 28B) alors que dès le second horizon M9 (43,3 cm, année 2005), seuls 10^5 à 10^6 copies d'intégrons étaient présentes, soit des abondances relatives inférieures de plus d'1 log et qui étaient stables sur toute la longueur de la carotte. Ces résultats sont en accord avec les données issues de la diversité des intégrons environnementaux obtenus par l'IPREM à Pau. Les intégrons de classe

2 n'ont été détectés dans aucun fragment de la carotte. Les intégrons de classe 3 n'ont pu être détectés que dans l'horizon M1 avec une abondance relative de 0,005 copies par bactérie.

(A)



(B)

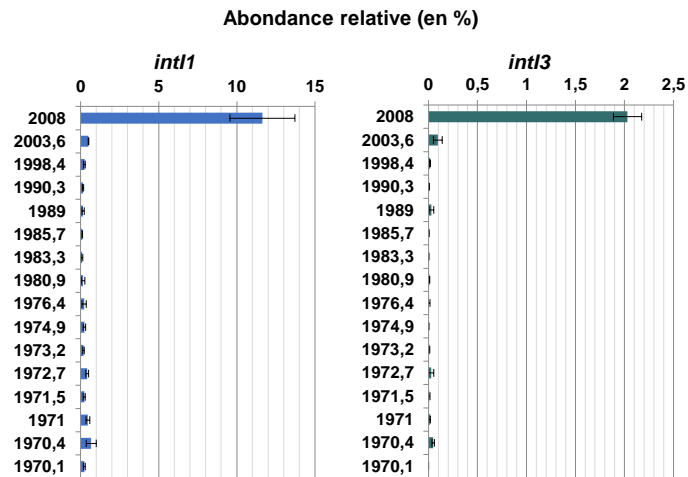


Figure 28: Abondances des intégrons environnementaux et des intégrons cliniques dans des archives sédimentaires (carotte Rhapsodis) de 40 ans. Abondances relatives des classes d'intégrons environnementaux (A) et des intégrons cliniques de classe 1 et 3 (B) exprimées en pourcentage.

4.3 Diversité des intégrons environnementaux et relation avec les facteurs environnementaux

❖ *Objectif et contexte*

Les intégrons sont des supports génétiques de capture et d'expression de gènes sous forme de cassettes. Ils sont répandus dans le monde bactérien et jouent un rôle majeur dans la dissémination des gènes de résistance aux antibiotiques, principalement chez les bactéries à Gram négatif. A côté des intégrons de résistance aux antibiotiques, de nombreux intégrons ont été décrits chez des bactéries environnementales avec de nombreuses cassettes de gènes (2000 à 3000 gènes différents par échantillon environnemental) codant des fonctions variées, et notamment pouvant répondre à la contamination chimique du milieu. Dans le milieu estuarien anthropisé, où la contamination chimique exerce une pression de sélection sur les microorganismes, les intégrons seront un facteur essentiel dans l'adaptabilité génétique des communautés microbiennes et constituent donc un marqueur global d'acquisition de multi-résistance aux antibiotiques et /ou aux contaminants chimiques. Ainsi, afin d'évaluer le potentiel d'intégrons de résistance au sein des environnements étudiés, outre la détection des intégrons cliniques, nous avons cherché à évaluer la diversité des intégrons dans l'environnement et l'influence des pressions chimiques sur cette diversité.

La diversité des intégrons dans l'environnement étant beaucoup plus importante que celle des intégrons des bactéries d'origine clinique, nous avons cherché à explorer cette diversité en profondeur. La technique que nous utilisons jusqu'ici était la PCR, suivie d'un clonage puis d'un séquençage Sanger individuel des clones des banques de clones plasmidiques. Cette méthodologie n'est pas satisfaisante en terme de recouvrement de la diversité totale pour envisager une analyse statistique face aux données environnementales. Nous avons donc choisi de développer une nouvelle approche par séquençage haut débit en utilisant la technologie Illumina. Ceci nous a permis d'obtenir une meilleure profondeur dans les analyses et une plus grande exhaustivité de la diversité des intégrons, en même temps que l'analyse d'un plus grand nombre d'échantillons par rapport à la technique de clonage-séquençage Sanger.

Cette étape du projet représentait malgré tout un challenge technologique. En effet, le fragment amplifié jusqu'à présent pour cette analyse de diversité était de 800 pb, ce qui n'est pas compatible avec les dernières technologies de séquençage haut débit. Par ailleurs l'analyse bioinformatique des données (milliers de séquences par échantillon) n'ayant jamais été réalisé pour ce type de séquences (séquences nucléiques codant une intégrase d'intégron) nous avons dû développer le pipeline.

Ainsi nous avons testé, dans un premier temps, l'utilisation de nouvelles amorces d'amplification afin d'obtenir des fragments plus petits par PCR, compatibles avec le séquençage Miseq Illumina en 2 x 300 pb (kit V3). Ces tests ont été réalisés sur un échantillon déjà étudié avec la technique développée jusque-là à l'EEM en réalisant de nouvelles banques de clones et en comparant la diversité mise en évidence dans les différents cas. Ces tests nous ont permis de définir des amorces pour le séquençage Miseq Illumina d'un fragment de 460 pb. Un premier run de séquençage a été réalisé en septembre 2015 sur 123 échantillons puis le développement du pipeline bioinformatique nous a pris plus d'une année.



4.4 Diversité des intégrons environnementaux dans les sédiments de la carotte Rhapsodis

Les séquences d'intégrons obtenues sur les 54 échantillons issus de la carotte Rhapsodis montrent une diversité très importante au sein des sédiments estuariens, mais différente selon chaque strate de la carotte (Figure 28B). On remarque une abondance des intégrons de classe 1 importante dans l'échantillon de surface, reflétant sans doute l'apport de ces intégrons par les rejets contenant des bactéries porteuses de résistances aux antibiotiques. Néanmoins, cette catégorie d'intégrons est extrêmement minoritaire dans les autres couches de la carotte. Il semble donc que ces intégrons de résistance ne se maintiennent pas au cours du temps dans l'environnement. D'autres intégrons en revanche présentent des abondances importantes mais variables au sein des différentes strates de la carotte et pourraient donc être des marqueurs du potentiel d'acquisition de résistances.

Afin de corréler nos données de diversité des intégrons avec les données environnementales nous avons choisi de réaliser des analyses statistiques solides afin de travailler sur l'ensemble des données en remplacement des analyses de PCR quantitatives proposées initialement. Une analyse statistique des index de diversité face aux données environnementales des différents échantillons montre une part d'influence des contaminants chimiques sur la diversité totale du pool d'intégrons (Figure 29). Par ailleurs, pris individuellement, les intégrons détectés comme majoritaires présentent des abondances relatives expliquées majoritairement par les données chimiques, avec des profils différents selon chaque intégron. Ces résultats indiquent que certains intégrons environnementaux sont susceptibles de participer à l'adaptation des communautés bactériennes face aux contaminations chimiques environnementales.

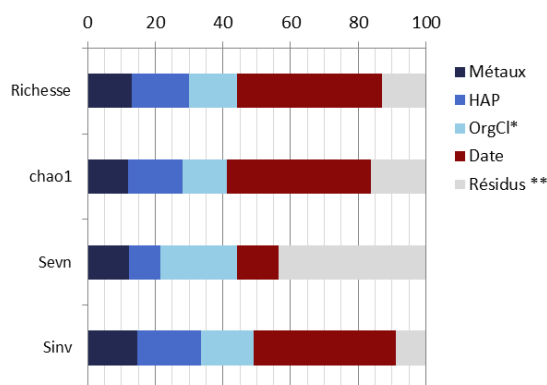


Figure 29: Relation entre la contamination chimique et la diversité des intégrons environnementaux dans des archives sédimentaires (carotte Rhapsodis).

❖ Conclusions :

Les sédiments de Seine, sont des environnements où les communautés microbiennes ont une forte proportion d'intégrons, suggérant une réponse des microorganismes, en terme génétique, à une exposition chronique aux contaminants chimiques.

Quel est le rôle du sédiment dans la dissémination des intégrons cliniques dans l'environnement estuarien ?:

➤ Sur une échelle de 40 ans, dans une zone fortement urbanisée (agglomération rouennaise) et impactée par les rejets d'une STEU, les intégrons sont présents dans la zone d'accumulation des sédiments, mais leur abondance relative diminue de 2 log en 4 années.

➤ Le long d'un transect « Sébec- Risle – Embouchure », dont l'usage du bassin versant est à dominante agricole, l'évolution spatiale de l'occurrence des intégrons montre un faible niveau d'intégrons dans les zones de dépôts de sédiments ; ces intégrons apportés par les STEU diminuent très rapidement à l'aval.

➤ Dans les vasières intertidales de l'embouchure, la faible présence des intégrons cliniques suggère une disparition qui peut s'expliquer par les remaniements permanents dans cette zone, dus aux cycles de dépôt/remise en suspension des sédiments en fonction des cycles de marée.

Conclusion

A l'échelle de l'embouchure dans la colonne d'eau lorsque le bouchon vaseux est formé :

- Dans toutes les fractions on observe des floccs polymorphes organo-minéraux. La taille de ces floccs est plus petite dans la fraction F4 (vitesse de chute $< 0,01 \text{ mm.s}^{-1}$), alors que des floccs de taille supérieure à $50 \mu\text{m}$ sont spécifiquement retrouvés dans la fraction F1 (vitesse de chute $> 1 \text{ mm.s}^{-1}$).
- La composition minéralogique des floccs est essentiellement constituée d'aluminosilicates, de quartz, de carbonates; ces derniers étant plus spécifiquement retrouvés dans la fraction F4 et dans l'eau de surface.
- La diversité des microorganismes, composante organique active de ces floccs, ne présente pas de différence entre la fraction F1 et F4, et ce quelle que soit la taille du flocc, sauf pour les communautés microbiennes présentes sur les floccs de taille supérieure à $50 \mu\text{m}$ dont la vitesse de chute est $> 1 \text{ mm.s}^{-1}$.
- Quantitativement dans l'eau de surface et à ce niveau de l'estuaire, *E. coli* est majoritairement dans la fraction F4, et associée, à raison de 74%, à des particules de taille comprise entre $2 \mu\text{m}$ et $50 \mu\text{m}$, et 26%, à des particules de taille comprise entre $0,45 \mu\text{m}$ et $2 \mu\text{m}$. En revanche, lors des expériences d'érodimétrie, les populations d'*E. coli* remises en suspension lors de l'érosion des sédiments, sont majoritairement associées aux fractions F2 et F3.
- Il n'existe pas de différence de structure de population entre le fond et la surface, ni entre les différentes fractions ; ce qui suggère un brassage des matières en suspension important gouverné par l'hydrodynamisme de l'estuaire.
- La structure de la population d'*E. coli* présente dans l'eau de surface en présence du bouchon vaseux (à basse mer et en étiage), est différente de celle observée en période



de crue (et hors bouchon vaseux). La période de crue se caractérise par un apport plus important de souches d'origine humaine (effluent de STEU), alors qu'en période d'étiage la structure des populations évoque un apport majoritairement d'origine animale (affluents intra-estuariens).

- Dans l'embouchure cohabitent des espèces *Aeromonas* : autochtones de l'estuaire, des espèces spécifiquement associées au biote (copépodes) et des espèces pathogènes pour l'Homme rejetées par les STEU (qui ne sont jamais retrouvées associées aux copépodes)
- Des espèces pathogènes de *Vibrio* sont présentes dans la colonne d'eau et dans les sédiments des vasières intertidales

Rôle des vasières dans la contamination de la colonne d'eau et le maintien des intégrons cliniques

- L'érosion des vasières intertidales est responsable d'un apport en *E. coli* et en *Vibrio* pathogènes dans la colonne d'eau, les vasières de l'estuaire sont donc une zone dynamique où les *E. coli* et les bactéries pathogènes se déposent à pleine mer et au jusant, et sont remises en suspension dans la colonne d'eau au flot.
- Les sédiments de Seine, sont des environnements où une grande diversité d'intégrons environnementaux est retrouvé au sein des génômes des communautés microbiennes, suggérant une réponse adaptative de ces communautés à une exposition chronique aux contaminants chimiques.
- Dans les zones impactées par des rejets de STEU, les intégrons cliniques se déposent à la surface mais ne s'y maintiennent pas en fonction du temps, notamment dans les zones ou avec des forçages dynamiques importants (embouchure, transect « Risle – Embouchure »). En revanche dans la carotte Rhapsodis, prélevée dans une zone non soumise à des phénomènes d'érosion naturelle, les intégrons peuvent se maintenir.

En terme de valorisation, au delà d'une valorisation scientifique des résultats dans des revues à comité de lecture (1 soumise, 5 en préparation), une valorisation opérationnelle des résultats sur la vitesse de chute des populations d'*E. coli* contribuera à enrichir les modèles sur la dynamique de la contamination fécale dans la zone du bouchon vaseux, développés à l'Ifremer. Un guide de stratégie d'échantillonnage pourrait être proposé à destination des scientifiques ou institutionnels concernés. En s'appuyant sur nos observations, la mise en place d'une procédure utilisant notamment le modèle MARS, devrait constituer une aide en routine à la stratégie d'échantillonnage sur toute la zone de l'estuaire. Les résultats sur l'occurrence des intégrons cliniques pourront être présentés au CES eaux de l'Anses dont C. Dagot (INSERM, Limoges), R. Duran (IPREM, Pau) et F. Petit (CNRS Rouen) sont membres, et intégrés dans la revue systématique des connaissances : « Quelles sont les solutions efficaces pour lutter contre la contamination des milieux naturels en antibiotiques, résidus et bactéries résistantes ? 2017 (coordinateur: Pr A. Andremont ; Réponse à l'appel à Projet de la Fondation pour la recherche sur la biodiversité. Ministère de l'environnement, de l'énergie et de la mer, C. Dagot et F. Petit membres du comité de pilotage).



BIBLIOGRAPHIE

- Abella, J., Fahy, A., Duran, R., Cagnon, C. (2015) Integron diversity in bacterial communities of freshwater sediments at different contamination levels. *FEMS Microbiology Ecology* 91
- Amos, G.C., Gozzard, E., Carter, C.E., Mead, A., Bowes, M.J., Hawkey, P.M., Zhang, L., Singer, A.C., Gaze, W.H., and Wellington, E.M. (2015). Validated predictive modelling of the environmental resistome. *The ISME Journal* 9, 1467–1476.
- Baker-Austin, C., Trinanes, J.A., Taylor, N.G.H., Hartnell, R., Siitonen, A., and Martinez-Urtaza, J. (2012). Emerging *Vibrio* risk at high latitudes in response to ocean warming. *Nature Climate Change* 3, 73–77.
- Barraud, O., Baclet, M.C., Denis, F., and Ploy, M.C. (2010). Quantitative multiplex real-time PCR for detecting class 1, 2 and 3 integrons. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 65, 1642–1645.
- Barraud, O., François, B., Chainier, D., Vignau, M., Ploy, M.-C. (2014) Value of integron detection for predicting antibiotic resistance in patients with Gram-negative septicemia, *International Journal of Antimicrobial Agents*, 44, 351–353
- Berthe, T., Touron, A., Leloup, J., Deloffre, J., and Petit, F. (2008). Faecal-indicator bacteria and sedimentary processes in estuarine mudflats (Seine, France). *Marine Pollution Bulletin* 57, 59–67.
- Berthe, T., Ratajczak, M., Clermont, O., Denamur, E., and Petit, F. (2013). Evidence for Coexistence of Distinct *Escherichia coli* Populations in Various Aquatic Environments and Their Survival in Estuary Water. *Applied and Environmental Microbiology* 79, 4684–4693.
- Borruso, L., Harms, K., Johnsen, P.J., Nielsen, K.M., and Brusetti, L. (2016). Distribution of class 1 integrons in a highly impacted catchment. *Science of The Total Environment* 566-567, 1588–1594.
- Calero-Cáceres, W., Méndez, J., Martín-Díaz, J., and Muniesa, M. (2017). The occurrence of antibiotic resistance genes in a Mediterranean river and their persistence in the riverbed sediment. *Environmental Pollution* 223, 384–394.
- Cambray, G., Guerout, A.-M., and Mazel, D. (2010). Integrons. *Annual Review of Genetics* 44, 141–166.
- Carlet J., LeCoz P. 2016, http://social-sante.gouv.fr/IMG/pdf/rapport_antibiotiques.pdf
- Chen, W.-M., Lin, Y.-S., Young, C.-C., and Sheu, S.-Y. (2013). *Pseudorhodofera aquiterrae* sp. nov., isolated from groundwater. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 63, 169–174. doi:10.1099/ijs.0.039842-0.
- Chen, K., and Zhou, J.L. (2014). Occurrence and behavior of antibiotics in water and sediments from the Huangpu River, Shanghai, China. *Chemosphere* 95, 604–612.
- Clermont, O., Christenson, J.K., Denamur, E., and Gordon, D.M. (2013). The Clermont *Escherichia coli* phylo-typing method revisited: improvement of specificity and detection of new phylo-groups: A new *E. coli* phylo-typing method. *Environmental Microbiology Reports* 5, 58–65.
- Crump, B.C., and Baross, J.A. (1996). Particle-attached bacteria and heterotrophic plankton associated with the Columbia River estuarine turbidity maxima. *Marine Ecology Progress Series* 138, 265–273.
- Crump, B. C., Armbrust, E. V., and Baross, J. A. (1999). Phylogenetic Analysis of Particle-Attached and Free-Living Bacterial Communities in the Columbia River, Its Estuary, and the Adjacent Coastal Ocean. *Appl. Environ. Microbiol.* 65, 3192–3204.
- Cui, H., Yang, K., Pagaling, E., and Yan, T. (2013). Spatial and Temporal Variation in Enterococcal Abundance and Its Relationship to the Microbial Community in Hawaii Beach Sand and Water. *Appl. Environ. Microbiol.* 79, 3601–3609. doi:10.1128/AEM.00135-13.
- Cuvilliez, A., Lafite, R., Deloffre, J., Lemoine, M., Langlois, E., and Sakho, I. (2015). River flow control on intertidal mudflat sedimentation in the mouth of a macrotidal estuary. *Geomorphology* 239, 174–181.
- D'Ambrosio, L., Ziervogel, K., MacGregor, B., Teske, A., and Arnosti, C. (2014). Composition and enzymatic function of particle-associated and free-living bacteria: a coastal/offshore comparison. *The ISME Journal* 8, 2167–2179.
- Decker, Brooke K.a; Palmore, Tara N.a,b, The role of water in healthcare-associated infections (2013) *Current Opinion in Infectious Diseases*, In Nosocomial and Healthcare related infections Edited by Trish M. Perl 26, 345–351.
- Deloffre, J., Lafite, R., Lesueur, P., Verney, R., Lesourd, S., Cuvilliez, A., and Taylor, J. (2006). Controlling factors of rhythmic sedimentation processes on an intertidal estuarine mudflat — Role of the turbidity maximum in the macrotidal Seine estuary, France. *Marine Geology* 235, 151–164.
- Deloffre, J., Verney, R., Lafite, R., Lesueur, P., Lesourd, S., and Cundy, A.B. (2007). Sedimentation on intertidal mudflats in the lower part of macrotidal estuaries: Sedimentation rhythms and their preservation. *Marine Geology* 241, 19–32.
- Di Cesare, A., Eckert, E., and Corno, G. (2016). Co-selection of antibiotic and heavy metal resistance in freshwater bacteria. *Journal of Limnology* 75.
- Droppo, I.G., Ross, N., Skafel, M., and Liss, S.N. (2007). Biostabilization of cohesive sediment beds in a freshwater wave-dominated environment. *Limnology and Oceanography* 52, 577–589.
- Droppo, I. G., Liss, S. N., Williams, D., Nelson, T., Jaskot, C., and Trapp, B. (2009). Dynamic existence of waterborne pathogens within river sediment compartments. implications for water quality regulatory aairs.

- Environ. Sci. Technol.* 43, 1737–1743. doi: 10.1021/es802321w
- Drudge, C.N., and Warren, L.A. (2014). Diurnal Floc Generation from Neuston Biofilms in Two Contrasting Freshwater Lakes. *Environmental Science & Technology* 48, 10107–10115.
- Du, J., Akter, S., Won, K., Singh, H., Yin, C. S., Kook, M., et al. (2015). *Undibacterium aquatile* sp. nov., isolated from a waterfall. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 65, 4128–4133. doi:10.1099/ijsem.0.000545.
- Dubrulle, C., Lesueur, P., Boust D., Dugué, O., Poupinet, N., Lafite (2007) Source discrimination of fine-grained deposits occurring on marine beaches: The Calvados beaches (eastern Bay of the Seine, France) *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, 72, 138–154
- Eisma, D., Li, A. (1993) Changes in suspended-matter floc size during the tidal cycle in the Dollard estuary. *Netherlands Journal of Sea Research*, 31, 107–117
- Fries, J.S., Characklis, G.W., and Noble, R.T. (2008). Sediment–water exchange of *Vibrio* sp. and fecal indicator bacteria: Implications for persistence and transport in the Neuse River Estuary, North Carolina, USA. *Water Research* 42, 941–950.
- Garcia-Armisen, T., Touron, A., Petit, F., and Servais, P. (2005). Sources of faecal contamination in the Seine estuary (France). *Estuaries* 28, 627–633.
- Gerdts, G., Brandt, P., Kreisel, K., Boersma, M., Schoo, K. L., Wichels, A. (2013). The microbiome of North Sea copepods. *Helgol. Mar. Res.* 67, 757.
- Ghylin, T. W., Garcia, S. L., Moya, F., Oyserman, B. O., Schwientek, P., Forest, K. T., et al. (2014). Comparative single-cell genomics reveals potential ecological niches for the freshwater actinobacteria lineage. *ISME J.* 8, 2503–2516. doi:10.1038/ismej.2014.135.
- Gillings, M.R. (2014). Integrons: Past, Present, and Future. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 78, 257–277.
- Gillings, M.R., Gaze, W.H., Pruden, A., Smalla, K., Tiedje, J.M., and Zhu, Y.-G. (2015). Using the class 1 integron-integrase gene as a proxy for anthropogenic pollution. *The ISME Journal* 9, 1269–1279.
- Lapoussière, A., Michel, C., Starr, M., Gosselin, M., and Poulin, M. (2011). Role of free-living and particle-attached bacteria in the recycling and export of organic material in the Hudson Bay system. *Journal of Marine Systems* 88, 434–445.
- Leverstein-van Hall M.A., Blok, H. E. M., Rogier, A., Donders, T., Paauw, A., Fluit Jan Verhoef A.D. (2003) Multidrug Resistance among Enterobacteriaceae Is Strongly Associated with the Presence of Integrons and Is Independent of Species or Isolate Origin *Journal of Infectious Disease* 187, 251–259.
- Henson, M. W., Hanssen, J., Spooner, G., Flemming, P., Pukonen, M., Stahr, F., et al. (2016). Microbial regime changes and indicators of eutrophication on the Mississippi River identified via a human-powered 2900 km transect. *bioRxiv*, 091512. doi:10.1101/091512.
- Kaci, A., Petit, F., Lesueur, P., Boust, D., Vrel, A., and Berthe, T. (2014). Distinct diversity of the *czcA* gene in two sedimentary horizons from a contaminated estuarine core. *Environmental Science and Pollution Research* 21, 10787–10802.
- Kaci, A., Petit, F., Fournier, M., Cécillon, S., Boust, D., Lesueur, P., and Berthe, T. (2016). Diversity of active microbial communities subjected to long-term exposure to chemical contaminants along a 40-year-old sediment core. *Environmental Science and Pollution Research* 23, 4095–4110.
- Koczura, R., Mokracka, J., Taraszewska, A., and Łopacińska, N. (2016). Abundance of Class 1 Integron-Integrase and Sulfonamide Resistance Genes in River Water and Sediment Is Affected by Anthropogenic Pressure and Environmental Factors. *Microbial Ecology* 72, 909–916.
- Laroche, E., Pawlak, B., Berthe, T., Skurnik, D., and Petit, F. (2009). Occurrence of antibiotic resistance and class 1, 2 and 3 integrons in *Escherichia coli* isolated from a densely populated estuary (Seine, France): Antibiotic-resistant *E. coli* from an estuary. *FEMS Microbiology Ecology* 68, 118–130.
- Le Hir, P., Ficht, A., Jacinto, R.S., Lesueur, P., Dupont, J.-P., Lafite, R., Brenon, I., Thouvenin, B., and Cugier, P. (2001). Fine sediment transport and accumulations at the mouth of the Seine estuary (France). *Estuaries* 24, 950–963.
- Lesourd, S., Lesueur, P., Brun-Cottan, J., Garnaud, S., and Poupinet, N. (2003). Seasonal variations in the characteristics of superficial sediments in a macrotidal estuary (the Seine inlet, France). *Estuarine, Coastal and Shelf Science* 58, 3–16.
- Lindh, M. V., Lefebvre, R., Degerman, R., Lundin, D., Andersson, A., and Pinhassi, J. (2015). Consequences of increased terrestrial dissolved organic matter and temperature on bacterioplankton community composition during a Baltic Sea mesocosm experiment. *AMBIO* 44, 402–412. doi:10.1007/s13280-015-0659-3.
- Liu, J., Fu, B., Yang, H., Zhao, M., He, B., and Zhang, X.-H. (2015). Phylogenetic shifts of bacterioplankton community composition along the Pearl Estuary: the potential impact of hypoxia and nutrients. *Front. Microbiol.* 6. doi:10.3389/fmicb.2015.00064.
- Manning, A.J., Langston, W.J., Jonas, P.J.C. (2010) A review of sediment dynamics in the Severn Estuary: Influence of flocculation *Marine Pollution Bulletin*, 61, 37–51
- Massot, M., Daubié, A.-S., Clermont, O., Jauréguy, F., Cougnal, C., Dahbi, G., et al. (2016). Phylogenetic, virulence

- and antibiotic resistance characteristics of commensal strain populations of *Escherichia coli* from community subjects in the Paris area in 2010 and evolution over 30 years. *Microbiology* 162, 642–650. doi: 10.1099/mic.0.000242
- Maerz, J., Verney, R., Wirtz, K., and Feudel, U. (2011). Modeling flocculation processes: Intercomparison of a size class-based model and a distribution-based model. *Continental Shelf Research* 31, S84–S93.
- Maggi, F. (2009). Biological flocculation of suspended particles in nutrient-rich aqueous ecosystems. *Journal of Hydrology* 376, 116–125.
- Maggi, F. (2013). The settling velocity of mineral, biomineral, and biological particles and aggregates in water: SPM SETTLING VELOCITY IN WATER. *Journal of Geophysical Research: Oceans* 118, 2118–2132.
- Mikes, D., Verney, R., Lafite, R., and Belorgey, M. (2004). Controlling factors in estuarine flocculation processes: experimental results with material from the Seine Estuary, Northwestern France. *Journal of Coastal Research* 82–89.
- Mitchell, S.B. (2013). Turbidity maxima in four macrotidal estuaries. *Ocean & Coastal Management* 79, 62–69.
- Pejrup, M., and Mikkelsen, O.A. (2010). Factors controlling the field settling velocity of cohesive sediment in estuaries. *Estuarine, Coastal and Shelf Science* 87, 177–185.
- Petit, F., Clermont, O., Delannoy, S., Servais, P., Gourmelon, M., Fach, P., Oberlé, K., Fournier, M., Denamur, E., and Berthe, T. (2017). Change in the Structure of *Escherichia coli* Population and the Pattern of Virulence Genes along a Rural Aquatic Continuum. *Frontiers in Microbiology* 8.
- Ratajczak, M., Laroche, E., Berthe, T., Clermont, O., Pawlak, B., Denamur, E., and Petit, F. (2010). Influence of hydrological conditions on the *Escherichia coli* population structure in the water of a creek on a rural watershed. *BMC Microbiology* 10, 222.
- Read, D. S., Gweon, H. S., Bowes, M. J., Newbold, L. K., Field, D., Bailey, M. J., et al. (2015). Catchment-scale biogeography of riverine bacterioplankton. *ISME J.* 9, 516–526. doi:10.1038/ismej.2014.166.
- Savio, D., Sinclair, L., Ijaz, U. Z., Parajka, J., Reischer, G. H., Stadler, P., et al. (2015). Bacterial diversity along a 2600 km river continuum. *Environ. Microbiol.* 17, 4994–5007. doi:10.1111/1462-2920.12886.
- Seiler, C., and Berendonk, T.U. (2012). Heavy metal driven co-selection of antibiotic resistance in soil and water bodies impacted by agriculture and aquaculture. *Frontiers in Microbiology* 3.
- Selezska, K., Kazmierczak, M., Müsken, M., Garbe, J., Schobert, M., Häussler, S., Wiehlmann, L., Rohde, C., and Sikorski, J. (2012). *Pseudomonas aeruginosa* population structure revisited under environmental focus: impact of water quality and phage pressure: Environmental *P. aeruginosa* population structure. *Environmental Microbiology* 14, 1952–1967.
- Servais, P., Garcia-Armisen, T., George, I., and Billen, G. (2007). Fecal bacteria in the rivers of the Seine drainage network (France): Sources, fate and modelling. *Science of The Total Environment* 375, 152–167.
- Shi (2010) Tidal resuspension and transport processes of fine sediment within the river plume in the partially-mixed Changjiang River estuary, China: A personal perspective *Geomorphology* 12, 133–151
- Kaci, A., Petit, F., Lesueur, P., Boust, D., Vrel, A., and Berthe, T. (2014). Distinct diversity of the *czcA* gene in two sedimentary horizons from a contaminated estuarine core. *Environmental Science and Pollution Research* 21, 10787–10802.
- Kaci, A., Petit, F., Fournier, M., Cécillon, S., Boust, D., Lesueur, P., and Berthe, T. (2016). Diversity of active microbial communities subjected to long-term exposure to chemical contaminants along a 40-year-old sediment core. *Environmental Science and Pollution Research* 23, 4095–4110.
- Su, H.-C., Pan, C.-G., Ying, G.-G., Zhao, J.-L., Zhou, L.-J., Liu, Y.-S., Tao, R., Zhang, R.-Q., and He, L.-Y. (2014). Contamination profiles of antibiotic resistance genes in the sediments at a catchment scale. *Science of The Total Environment* 490, 708–714.
- Sylvain, F.-É., Cheaib, B., Llewellyn, M., Correia, T. G., Fagundes, D. B., Val, A. L., et al. (2016). pH drop impacts differentially skin and gut microbiota of the Amazonian fish tambaqui (*Colossoma macropomum*). *Sci. Rep.* 6. doi:10.1038/srep32032.
- Touron, A., Berthe, T., Gargala, G., Fournier, M., Ratajczak, M., Servais, P., and Petit, F. (2007). Assessment of faecal contamination and the relationship between pathogens and faecal bacterial indicators in an estuarine environment (Seine, France). *Marine Pollution Bulletin* 54, 1441–1450.
- Verney, R., Deloffre, J., Brun-Cottan, J.-C., and Lafite, R. (2007). The effect of wave-induced turbulence on intertidal mudflats: Impact of boat traffic and wind. *Continental Shelf Research* 27, 594–612.
- Verney, R., Lafite, R., and Brun-Cottan, J.-C. (2009). Flocculation Potential of Estuarine Particles: The Importance of Environmental Factors and of the Spatial and Seasonal Variability of Suspended Particulate Matter. *Estuaries and Coasts* 32, 678–693.
- Verney, R., Lafite, R., Claude Brun-Cottan, J., and Le Hir, P. (2011). Behaviour of a floc population during a tidal cycle: laboratory experiments and numerical modelling. *Continental Shelf Research* 31, S64–S83.
- Vrel, A., Boust, D., Lesueur, P., Deloffre, J., Dubrulle-Brunaud, C., Solier, L., Rozet, M., Thouroude, C., Cossonnet, C., and Thomas, S. (2013). Dating of sediment record at two contrasting sites of the Seine River using radioactivity data and hydrological time series. *Journal of Environmental Radioactivity* 126, 20–31.
- Wang, Y.P., Voulgaris, G., Li, Y., Yang, Y., Gao, J., Chen, J., and Gao, S. (2013). Sediment resuspension, flocculation, and settling in a macrotidal estuary: Flocculation and Settling in Estuary. *Journal of Geophysical Research: Oceans* 118, 5591–5608.

ANNEXE 1 : REPARTITION DES COEFFICIENTS DE MAREE (2015)

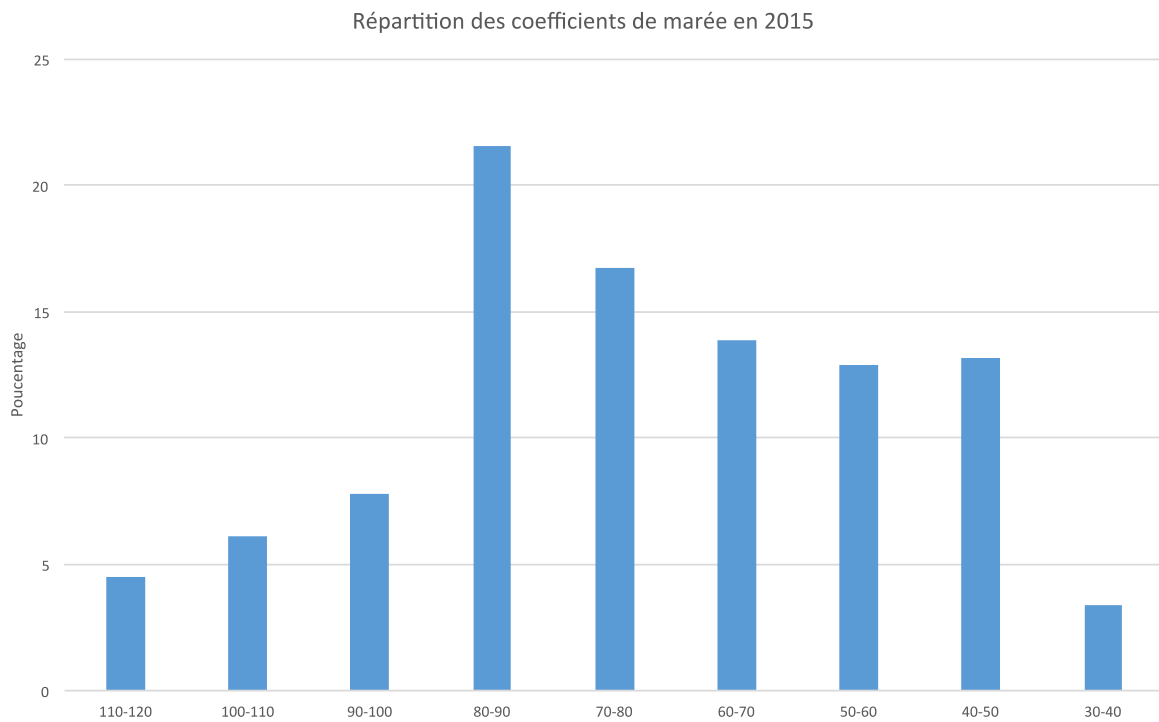


Figure A1: Répartition des coefficients de marée en 2015

ANNEXE 2 : CRITERES DE CHOIX DES VITESSES DE DECANTATION

Le choix des vitesses de décantation correspond à la gamme de vitesses mesurées par différents auteurs et recensées (Van Leussen, 1994 ; Pejrup & Mikkelsen, 2010) et mesurées en estuaire de Seine. On observe sur la figure A2, une dispersion des vitesses sur 2 ordres de magnitude entre $1 \text{ mm}\cdot\text{s}^{-1}$ et $0,01 \text{ mm}\cdot\text{s}^{-1}$. Ces vitesses sont retrouvées en Seine selon le type de floccs et/ou de particules. Les vitesses retenues par la décantation dans le cadre du projet DYNAPAT sont représentatives de cette gamme.

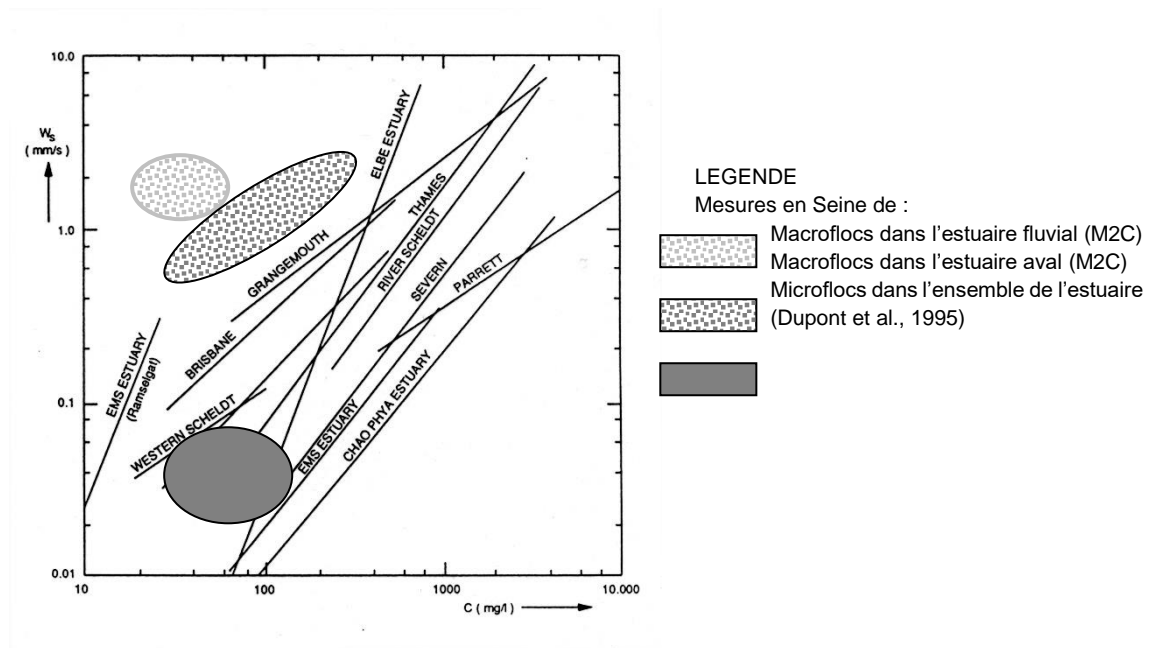


Figure A2: Les droites de régression montrant les relations entre W_s (vitesse de chute) et C (concentration de MES) ont été obtenues par différents auteurs sur différents systèmes (Van Leussen, 1994 modifié).

ANNEXE 3 : PROFILS GRANULOMETRIQUES DES CAMPAGNES DYNAPAT

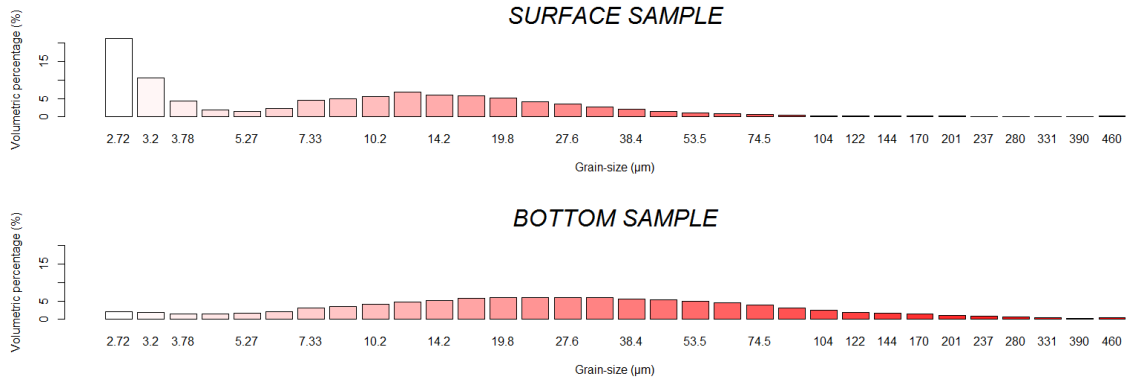


Figure A3-1 : Comparaison des profils granulométriques des échantillons de surface (1m au-dessous de la surface) et du fond (1m au-dessus du fond) au cours de la campagne DYNAPAT 1

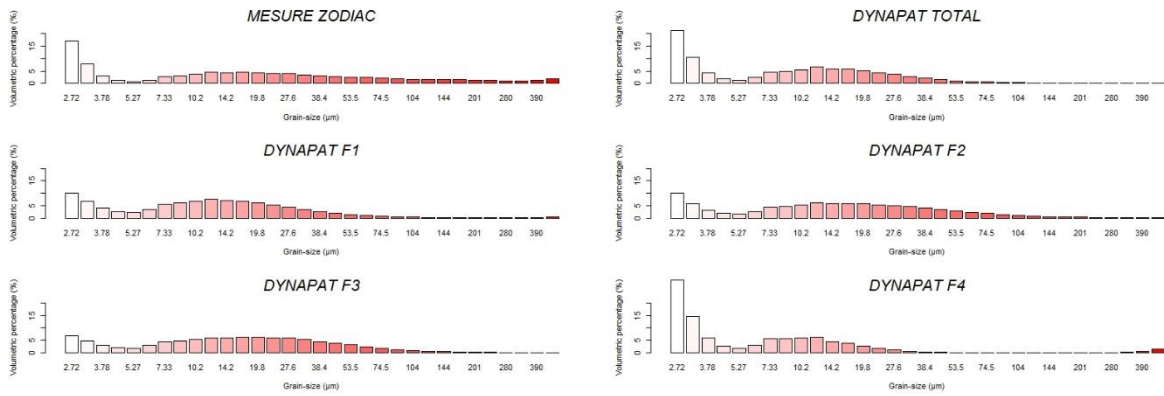


Figure A3-2 : Comparaison des profils micro-granulométriques de la campagne DYNAPAT 1: eau du chenal (mesure zodiac), eau avant la décantation (DYNAPAT Total) et dans les différentes fractions de décantations F1, F2, F3, et F4 (données LISST 100X-C).

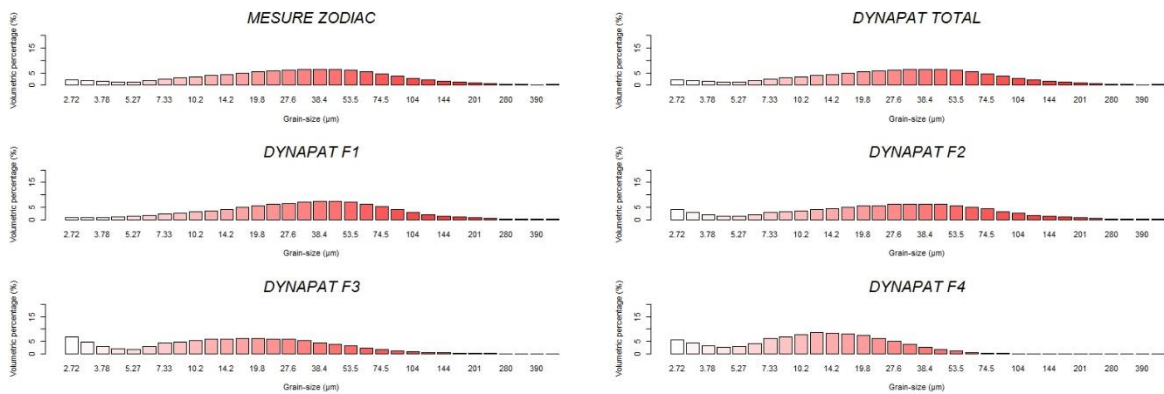


Figure A3-3 : Comparaison des profils micro-granulométriques de la campagne DYNAPAT 2: eau du chenal (mesure zodiac), eau avant la décantation (DYNAPAT Total) et dans les différentes fractions de décantations F1, F2, F3, et F4 (données LISST 100X-C).

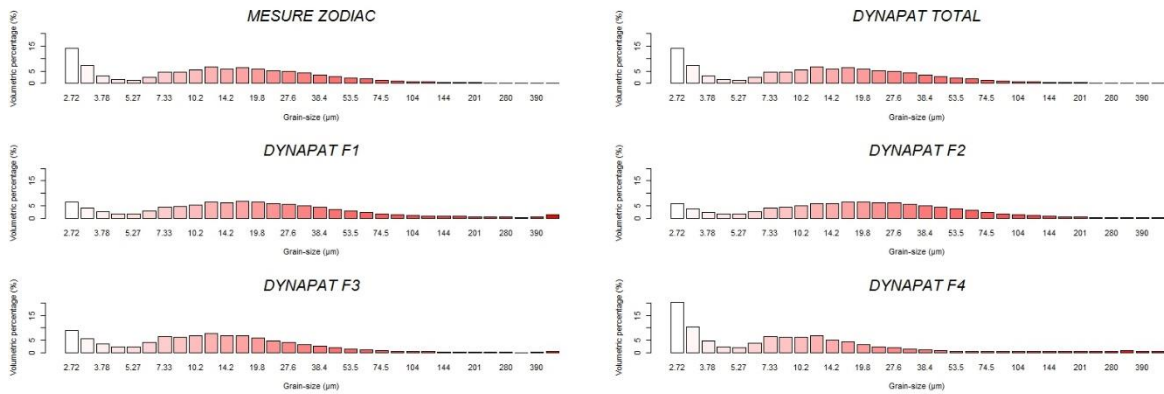


Figure A3-4 : Comparaison des profils micro-granulométriques de la campagne DYNAPAT 3: eau du chenal (mesure zodiac), eau avant la décantation (DYNAPAT Total) et dans les différentes fractions de décantations F1, F2, F3, et F4 (données LISST 100X-C).

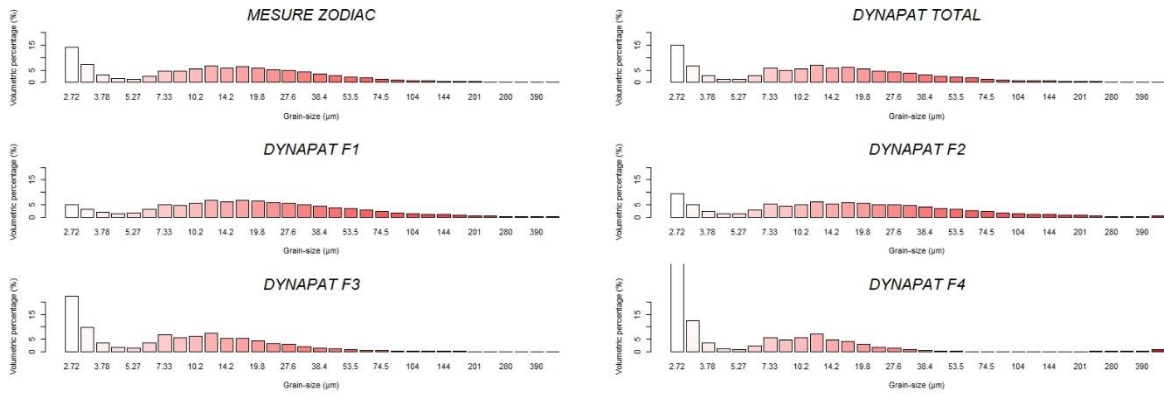


Figure A3-5 : Comparaison des profils micro-granulométriques de la campagne DYNAPAT 4: eau du chenal (mesure zodiac), eau avant la décantation (DYNAPAT Total), et dans les différentes fractions de décantations F1, F2, F3, et F4 (données LISST 100X-C).

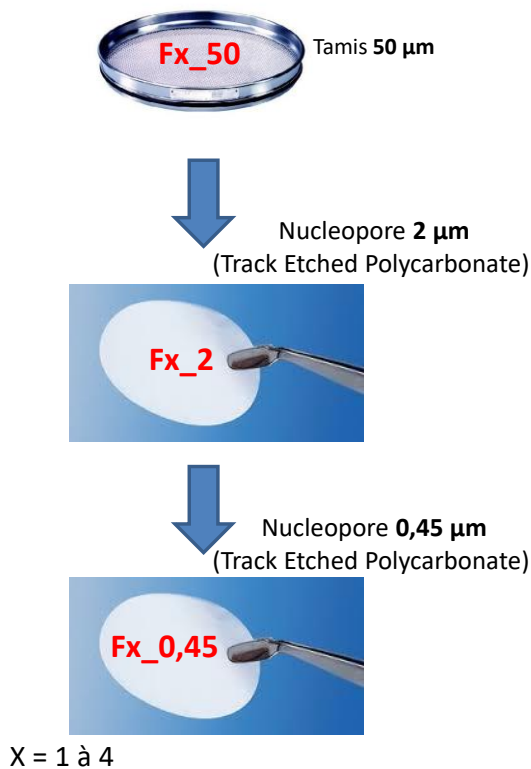
ANNEXE 4 : ANALYSE DE LA DIVERSITE DES COMMUNAUTES BACTERIENNES

Les particules sont séparées en fonction de la taille sur la base d'un tamisage en série, pour chaque fraction issue de la décantation (F1, F2, F3, F4) avant extraction des ADN. Ces prélèvements ont été réalisés en triplicata (3 ampoules du décanteur). Chaque fraction collectée (F1 à F4) a été filtrée sur des tamis de 50 μm , 2 μm et 0,45 μm (Figure ci-dessous).

Les particules retenues sur chaque tamis ont été utilisées pour extraire le métagénome des communautés microbiennes associées aux particules (kit PowerSoil, Mobio). A partir de ces acides nucléiques, les régions variables du gène codant l'ARNr 16S ont été amplifiées par PCR (protocole Genotoul) à partir de trois extractions indépendantes puis les amplicons ont été mélangés par la suite. Le séquençage haut débit (Miseq Illumina) des amplicons obtenus a été réalisé sur la plateforme Get du Genotoul de Toulouse.

Chaque fraction F1 à F4

Rétentat analysé pour chaque fraction

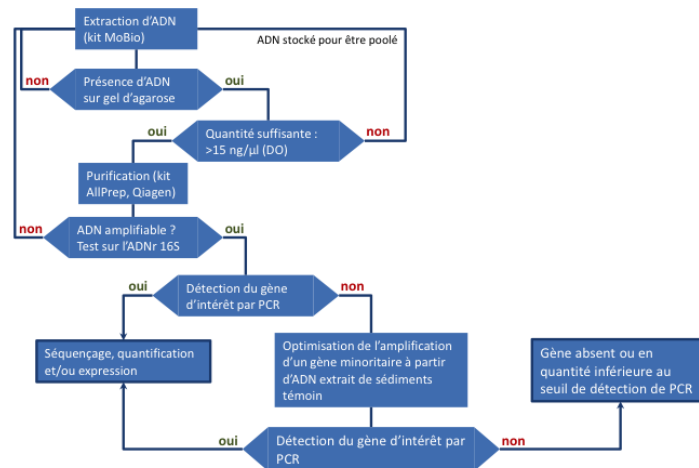


Analyses moléculaire / bio-informatique

- Extraction des acides nucléiques (MoBio)
- Amplification par PCR de la région V3-V4 de l'ADNr 16S - fragment de 460 pb (amorces F343 et R784)
- Séquençage MiSeq (Plateforme Get, Genotoul Toulouse)
- Analyse des séquences avec QIIME – assignation taxonomique avec SILVA ver 213

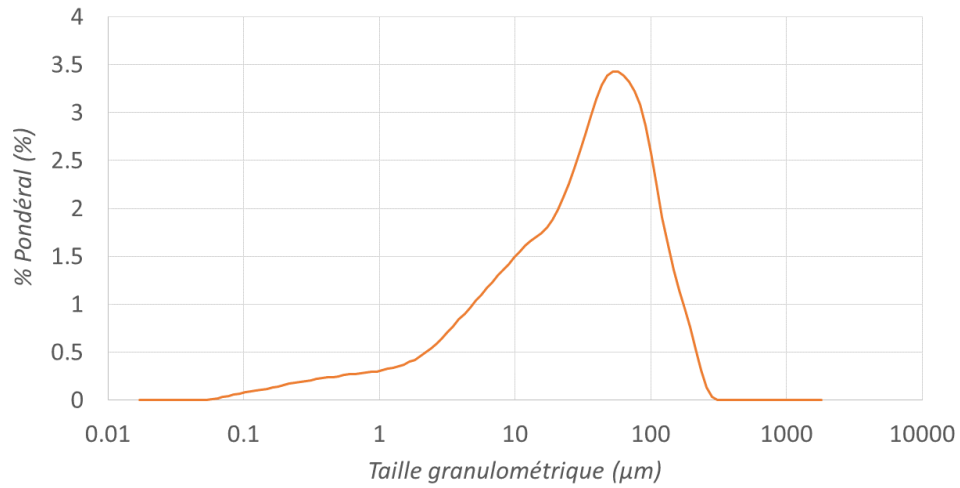
ANNEXE 5 : OPTIMISATION ET VALIDATION DU PROTOCOLE D'EXTRACTION DES ADN

Optimisation et validation du protocole d'extraction des ADN à partir d'échantillons de sédiments ou des filtrats (séparation en fonction de la taille) issues des fractions de l'expérimentation de décantation (F1, F2, F3, et F4)



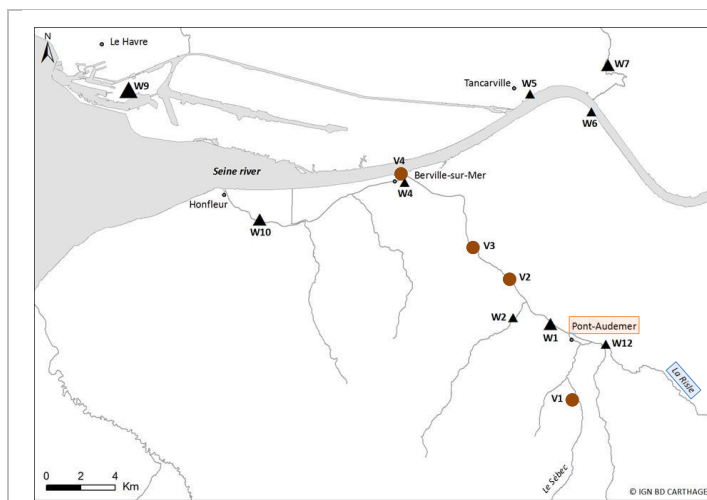
Optimisation et validation du protocole d'extraction des ADN à partir d'échantillons de sédiments ou de biofilms. Ce protocole a été mis à profit pour mener des inter-calibrations entre laboratoires (UMR M2C / IPREM Université de Pau et des Pays de l'Adour), dans le cadre du projet DYNAPAT (thèse en cours de Cynthia Oliveira). Il permet de s'assurer que l'absence de détection d'un gène d'intérêt à partir d'ADN extraits de sédiments, n'est pas due à la technique (présence d'inhibiteurs potentiels de la réaction de PCR, composition minéralogique responsable d'un faible rendement lors de l'extraction...).

ANNEXE 6 : GRANULOMETRIE DE L'ECHANTILLON DE SEDIMENT POUR LES EXPERIMENTATIONS FLOCSIM



Granulométrie de l'échantillon de sédiment prélevé à Tancarville, et utilisé pour les expérimentations Floccsim 2A et 2B (granulomètre Beckman Coulter LS14100). Les deux modes à 10 et 80 µm, avec un D50 de 36,2µm, sont retrouvés classiquement en estuaire de la Seine.

ANNEXE 7 : CARACTERISTIQUES DES SEDIMENTS PRELEVES LE LONG DU TRANSECT « RISLE- EMOUCHURE »



Sites d'échantillonnage (cercles : V1 à V4) dans le bassin versant de la Risle le long du continuum « Rivière (aval exploitation bovine) – Station de traitement des eaux usées W1, Pont Audemer) – Confluence Risle/Seine ». Les triangles représentent les STEU (stations de traitement des eaux usées). Campagne du 05/07/2015.

Sites échantillonnés	Profondeur (cm)	Géochimie				Granulométrie				
		Matière organique (g/kg)	C (g/kg)	N (g/kg)	C/N	Taille moyenne (µm)	Taille médiane (µm)	Argile (%)	Silts (%)	Sables (%)
V1	0 - 3	13,3	7,67	0,53	14,5	321,7		0,8	15,4	83,8
	3 - 6	49,4	28,5	1,4	20,3	195,2	189,1	1,3	23,4	75,3
	6 - 9	48,1	27,8	1,34	20,7	580,1	642,3	0,4	5,2	94,4
	9 - 12	68	39,3	1,88	20,9	631,2	708,2	0,4	5	94,6
V2	0 - 3	31,4	18,2	1,35	13,4	35,44	41,52	3,1	63,9	33
	3 - 6	33,9	19,6	1,5	13,1	28,77	35,26	4,4	69,8	25,8
	6 - 9	28,1	16,3	1,21	13,5	33,67	41,69	4,2	64	31,8
	9 - 12	21,1	12,2	0,956	12,8	29,6	38,72	5,2	66,6	28,2
V3	0 - 3	30,3	17,5	1,38	12,7	33,16	39,33	3,5	65,6	30,9
	3 - 6	36	20,8	1,59	13,1	32,23	37,08	3,6	67,6	28,8
	6 - 9	34,6	20	1,64	12,2	44,86	49,63	3	56,6	40,4
	9 - 12	34,2	19,8	1,57	12,5	29,55	35,17	4	69,3	26,7
V4	0 - 3	22,8	13,2	1,06	12,4	28,64	36,46	4,8	65,5	29,7
	3 - 6	24	13,9	1,18	11,8	30,07	36,69	4,6	64,5	30,9
	6 - 9	27,9	16,1	1,39	11,6	28,83	34,74	4,7	65,6	29,7
	9 - 12	20,8	12	0,927	12,9	33,18	41,17	4,4	61,2	34,4

POUR PLUS D'INFORMATIONS SUR LE GIP SEINE-AVAL

www.seine-aval.fr

CONTACT

Groupement d'Intérêt Public Seine-Aval

Pôle Régional des Savoirs

115, Boulevard de l'Europe

76100 ROUEN

Tél : 02 35 08 37 64

gipsa@seine-aval.fr

En cas d'utilisation de données ou d'éléments de ce rapport, il devra être cité sous la forme suivante :

Petit F. (Coord.), Berthe T., Barraud O., Cagnon C., Dagot C., Deloffre J., Duran R., Lafite R., Petit C., Ploy M.-C., 2018. Projet DYNAPAT : Impact de la dynamique particulière sur le devenir des bactéries pathogènes dans la zone du bouchon vaseux de l'estuaire de Seine. Rapport de recherche du programme Seine-Aval 5, 66 p.

Le GIP Seine-Aval ne saurait être tenu responsable d'évènements pouvant résulter de l'utilisation et de l'interprétation des informations mises à disposition.

Pour tout renseignement, veuillez contacter le GIP Seine-Aval.

Les membres financeurs du GIP Seine-Aval sont :

