

Rapport Seine-Aval 4



FLASH

Devenir des antibiotiques, flux de gènes
et de bactéries antibiorésistantes en estuaire
de Seine, exposition à l'Homme



Petit F., Denamur E., Budzinski H., Leclercq R., Favennec L.,
Chevé M., Bussi M., Féménias D., Garnier J.



Octobre 2012



GIP Seine-Aval
Pôle Régional des Savoirs
115 Bd de l'Europe
76 100 - Rouen

tel : 02 35 08 37 64
<http://www.seine-aval.fr>



Titre de la proposition : FLASH
Coordinateur(s) : Fabienne PETIT

Axe 2 : Risques sanitaires et environnementaux

**Devenir des antibiotiques, FLux de gènes et de bactéries
Antibiorésistantes en estuaire de Seine, épidémiologie, exposition à
l'Homme (FLASH).**

Rapport Scientifique : 2008-2011

*UMR M2C 6143/UMR 5255 LPTC/UMR SISYPHE/U722 INSERM CHU
Bichat/IHME EA 2128–CHU CAEN/CARE/CETAPS/UMR IDEES, FED
SCALE*



Ce travail a été rendu possible grâce à la collaboration active de M. Michel Leroux (Maire de Pont-Audemer), Mme Aurélie Lamy (Ville de Pont-Audemer), M. Yvon Goarvot et Mme Sophie Coté (hôpital de Pont-Audemer), les pharmaciens de la ville de Pont-Audemer qui ont fourni les données de consommation en antibiotiques, des personnes qui nous ont permis l'accès au centre médicalisé et à la station d'épuration de Pont-Audemer. Nous remercions particulièrement M. Perier (agriculteur) qui nous a donné accès à son cahier d'élevage ainsi que M. Garaudeaux, vétérinaire responsable du 'Groupement de Défense Sanitaire du Cheptel de l'Eure'.

Sans leurs collaborations, cette étude pilote en France n'aurait pas pu être réalisée. Merci de ne pas utiliser les données de ce rapport sans leurs accords et d'anonymiser les conclusions de ce travail lors de la diffusion publique.

Sommaire

Résumé.....	5
I- Rappel des objectifs/ Equipes participantes	9
I-1 Equipes participantes	9
I-2 Objectifs.....	9
I-3 Bilan du programme	13
II- Démarche méthodologique	15
II-1 Les sites ateliers	15
II-2 Stratégie d'échantillonnage	16
II-2-1 Le continuum hospitalier	16
II-2-2 Le continuum agricole	16
Apports monodisciplinaires.....	17
III Résultats :	18
III-1 Quantification qualitative et quantitative des transferts à l'estuaire (UMR M2C).....	18
III-1-1 Fonctionnement hydrologique de la Risle	18
III-1-2 Apport de la Risle dans l'embouchure de l'estuaire/ Comportement hydro-sédimentaire de la Risle.....	28
III-2 Contamination des eaux en résidus médicamenteux le long d'un continuum hospitalier et agricole (UMR 5255 LPTC).....	38
III-2-1 Continuum hospitalier	38
III-2-2 Continuum agricole	45
III-3 Caractérisation de la pathogénicité pour l'homme de <i>Cryptosporidium</i> sp et des souches d' <i>E. coli</i> isolées de Seine (Parasitologie, CHU Rouen)	50
Approche multidisciplinaire intégrative du projet FLASH.....	53
III-4 Devenir des antibiotiques, bactéries antibiorésistantes et des souches pathogènes dans des hydrosystèmes de surface (Microbiologie, UMR M2C, INSERM U722, IHME EA 2128).....	54
III-4-1 Contamination en antibiotiques et bactéries antibiorésistantes, présence de souches pathogènes le long d'un continuum hospitalier	54
III-4-2 Contamination en antibiotiques et bactéries antibiorésistantes, présence de souches pathogènes le long d'un continuum agricole	60
III-4-3 Devenir des populations d' <i>E. coli</i> antibiorésistantes le long du transect « Risle-embouchure- estuaire ».	73
III-4-4 Contamination en antibiotiques et bactéries antibiorésistantes, présence de souches pathogènes en estuaire de Seine	79
III-5 Approche socio-économique: exposition de l'Homme aux contaminants chimiques et perception du risque	94
III-5-1 Exposition de l'Homme aux contaminants chimiques et microbiologiques : usages récréatifs et activité de pêche (contribution du CETAPS).	94
III-5-2 Représentation des acteurs (praticiens hospitaliers et exploitants agricoles) du risque sanitaire et environnemental lié à l'usage des antibiotiques (contribution du CARE EA2260)	102
Valorisation opérationnelle	108
III-6 Evaluation du risque.....	109
III-6-1 Impact environnemental de la contamination en antibiotiques et en bactéries antibiorésistantes	109
III-6-2 Evaluation quantitative du risque de gastroentérites lié à la présence de souches d' <i>Escherichia coli</i> entéropathogènes chez les pratiquants de loisirs nautiques	118

III-6-3 Un outil de discrimination de l'origine des contaminants microbiens (bovins / humains) lors de contamination	123
III-6-4 Des éléments pour la modélisation de la contamination en bactéries fécales et/ou en antibiotiques	123
IV Valorisation scientifique	125
V Bibliographie non exhaustive	128
VI Annexe méthodologique	131
Méthodologie socio économie (CARE, IDEES).....	131
Méthodologie sociologie (CETAPS)	132
Analyses microbiologiques (M2C, U 722, EA 2128)	134
Analyses chimiques (UMR 5255 LPTC)	135

Résumé

Contexte et objectifs

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 et la démographie de leurs bassins versants. Un des enjeux majeurs des prochaines décennies sera d'évaluer la vulnérabilité microbiologique mais aussi la capacité de résilience des eaux à la contamination par des germes fécaux, qui dans les pays industrialisés s'accompagne d'une contamination par des molécules médicamenteuses prescrites en médecine humaine ou vétérinaire.

Les eaux de l'estuaire de Seine, exutoire d'un bassin versant où vit plus de 26% de la population française et où se concentrent près de 40% de l'activité agricole et industrielle nationale présentent une contamination élevée en bactéries et parasites d'origine fécale, dont des souches d'*E. coli* multirésistantes aux antibiotiques. Lors de l'exercice précédent du programme Seine-Aval, il a été montré que la contamination en bactéries et parasites d'origine fécale diffère selon les zones de l'estuaire (apport des affluents, usage des bassins versants, dynamique sédimentaire, salinité), les facteurs hydrologiques (débit, pluviométrie) et qu'il était difficile d'évaluer l'impact relatif des contaminations diffuses, majoritairement d'origine agricole sur la qualité microbiologique des eaux, notamment en période humide.

Pour autant, en absence d'information sur le pouvoir pathogène des souches bactériennes et de parasites, et sur la réalité de l'exposition humaine, il était impossible d'évaluer le risque sanitaire associé. De même, il était difficile d'appréhender le risque environnemental consécutif aux rejets de bactéries fécales antibiorésistantes, et/ou d'antibiotiques aux concentrations mesurées dans l'environnement, notamment la dissémination des gènes de résistance ou la perturbation des cycles biogéochimiques.

Dans ce contexte, le projet multidisciplinaire FLASH, visait à (i) caractériser la pathogénicité pour l'homme des souches d'*E. coli*, *Enterococcus* et *Cryptosporidium* sp circulant dans les eaux (ii) améliorer les connaissances de la relation entre l'usage vétérinaire et humain en antibiotiques, la dynamique de contamination du milieu en molécules antibiotiques et l'occurrence et le devenir de bactéries antibiorésistantes (iii) identifier l'origine des contaminants microbiens (animal/ humain) (iv) définir les périodes favorables et établir des bilans quantitatifs des apports à l'estuaire en *E. coli* antibiorésistantes et en antibiotiques, pour différentes conditions hydrologiques et en fonction de la dynamique sédimentaire, (v) déterminer l'exposition de l'homme aux contaminants chimiques et microbiologiques et étudier la représentation qu'ont les acteurs (praticiens hospitaliers et exploitants agricoles) des risques sanitaire et environnemental liés à l'usage des antibiotiques.

Ce projet de recherche repose sur une démarche multidisciplinaire intégrative qui réunit à la fois les compétences en microbiologie, génétique, chimie, hydrogéologie et psycho-économie. Il a pour originalité de se doter d'un comité d'usagers, impliquant les directions des hôpitaux, des médecins hospitaliers, des responsables de la ville de Pont-Audemer et de sa station d'épuration, du groupement sanitaire d'éleveur du département de l'Eure et le responsable d'exploitation agricole. Ces différents partenaires ont accepté de collaborer et souhaitent être étroitement associés au déroulement du programme.

Principaux Résultats

Evaluation quantitative du risque de gastroentérites lié à la présence de souches d'*Escherichia coli* entéropathogènes chez les pratiquants de loisirs nautiques

Des souches d'*E. coli* entéropathogènes circulent dans les eaux de Seine, et dans celles du continuum agricole du bassin versant de la Risle. Dans les eaux de l'estuaire sur 268 souches (il n'a été isolé que 2 souches d'*E. coli* entéropathogènes sur le site de Poses. D'après les critères de la directive européenne, et sur la base des abondances des *E. coli* et des *Enterococcus*, la qualité de ces eaux était insuffisante sauf sur le site de Poses. La présence de souches entéropathogènes dans les eaux du continuum agricole (7/293) dont des souches STEC

responsables de gastroentérites sévères qui peut s'aggraver de syndrome hémolytique et urémique. Il est toutefois notable d'observer que ces souches ne se retrouvent plus à l'aval du continuum suggérant qu'elles ne se maintiennent pas longtemps sous forme cultivable dans l'environnement aquatique.

Une estimation du risque de gastroentérite lié à la présence de souches entéropathogènes dans les eaux a été effectuée sur la base des valeurs de doses infectantes rapportées dans la littérature et des usages récréatifs connus sur la zone contaminée. Sur le site de la selle, des souches très virulentes STEC d'origine bovine ont été isolées mais à priori il n'y a pas d'usage de ces eaux à des fins récréatives ni de consommation écartant ainsi tout risque. Sur les sites de la Risle et de la Tourville, où des activités kayak ou de natation sont observées, le risque imputable à la présence de souches aEPEC, DAEC, EAEC n'est pas avéré si on considère d'une part, la dose infectante minimale occasionnant une gastroentérite chez l'adulte et d'autre part, les résultats de l'étude sur les usages nautiques qui montre que seuls 2% des kayakistes boivent la tasse. Cette conclusion ne peut pas être extrapolée à des enfants ou des personnes immunodéficientes. Un raisonnement analogue peut être reporté pour le site de Poses où a priori il n'y a pas d'activité de loisirs. Il serait intéressant toutefois d'évaluer les connexions hydrauliques avec les zones récréatives, et donc un éventuel impact sur le site de Lery-Poses. Dans les effluents traités de STEP, ce raisonnement n'est pas pertinent mais il est possible de considérer les risques potentiels dans les eaux directement à l'aval du rejet.

En conclusion, une estimation quantitative du danger ne permet pas de conclure à l'existence d'un risque avéré de gastroentérite chez les pratiquants de kayak, adulte et en bonne santé, qui utilisent la zone de la Risle pour pratiquer cette activité

Origine des parasites isolés en estuaire de Seine

L'évaluation du danger lié au caractère viable et infectant des parasites retrouvés dans l'environnement n'a pas pu être étudiée du fait de l'absence de technique validée disponible. Toutefois, l'analyse rétrospective des *Cryptosporidium* (23 génotypage /60 isolats) isolés de Seine lors de l'exercice précédent du programme Seine – Aval, montre que quelle que soit la saison et le site, seules 2 espèces sont identifiées : *C. hominis*, purement anthroponotique, et *C. parvum* parasite des ruminants, prédominant notamment chez les veaux âgés de moins de 3 semaines, et de l'Homme.

Contamination en antibiotiques et bactéries antibiorésistantes dans les eaux : déterminisme et devenir

Afin de répondre à ces objectifs et de pouvoir extrapoler à l'estuaire de Seine, cette étude a été effectuée le long de deux continuums sur le bassin versant de la Risle: (i) rejets hospitaliers – STEP - eaux de Seine, (ii) exploitation animale (bovins) - eaux de rivière – Risle, et dans la zone de l'embouchure de l'estuaire où se rejettent les eaux de la Risle. Les sites équipés (1, 2, 3) ont été équipés de sondes multi paramètres mesurant la turbidité, conductivité, température, hauteur d'eau, pression toutes les 15 minutes pendant 1 à 2 ans selon les sites. Le site à la confluence Risle – estuaire de Seine soumis à une forte dynamique n'a pas permis la mise en place de mesures continues.

Les études menées le long du continuum hospitalier montrent qu'il n'existe pas de relation simple entre les phénotypes de résistances des souches d '*E. coli* et d'*Enterococcus* isolées dans les eaux, la contamination en antibiotique du milieu et les prescriptions. En effet, la contamination, en molécules antibiotiques dans les eaux résulte à la fois de la prescription médicale (type de molécule et période épidémique), de la persistance dans les eaux des antibiotiques et/ou de leurs métabolites, des facteurs hydrologiques (débits). Le long du continuum, des rejets hospitaliers jusqu'à la Risle, la contamination en antibiotiques diminue mais les concentrations (de l'ordre du ng.L⁻¹) ne sont pas suffisantes pour exercer une pression de sélection responsable de l'émergence de souches antibiorésistantes. L'occurrence de souches d'*E. coli* et d'*Enterococcus* antibiorésistantes dans les eaux résulte de la pression de sélection exercée lors des traitements médicamenteux chez l'homme. Leur abondance dans les eaux

diminue le long du continuum : le nombre de souches hospitalières porteuses de supports génétiques impliqués dans l'antibiorésistance (intégrons, gène *erm*) décroît le long du continuum au profit de souches mieux adaptées à l'environnement.

Le long du continuum agricole, l'évolution quantitative et qualitative de la contamination des eaux par les molécules médicamenteuses, notamment les antibiotiques, reflète le gradient d'anthropisation, plus précisément les contributions respectives croissantes de la pression exercée par les exploitations bovines et la densité humaine de l'amont vers l'aval. Comme dans les eaux du continuum hospitalier, les antibiotiques les plus fréquemment retrouvés sont les molécules les plus persistantes mais les concentrations en antibiotiques sont trop faibles pour exercer une pression de sélection sur les microorganismes.

En parallèle à cette contamination chimique, pour des niveaux équivalents d'abondance en bactéries fécales, la structure des populations d' *E. coli* et la diversité au sein des populations d'*Enterococcus*, est aussi dépendante, et donc informative, de l'origine humaine ou animale de la contamination. Au sein de ces populations, la proportion de bactéries antibiorésistantes et le flux de gènes correspondant, semblent dépendre des pratiques d'élevages, une pratique d'agriculture raisonnée générant moins de bactéries antibiorésistantes dans les eaux.

La proportion de souches d'*E. coli* antibiorésistantes circulant dans les eaux n'évolue pas significativement le long du transect 'Risle – Honfleur'. Le phénotype de résistance et la structure des populations d'*E. coli* montrent qu'en période hivernale, la contamination d'origine humaine est majoritaire, alors qu'en période estivale un évènement pluvieux génère un apport conséquent de bactéries fécales d'origine bovine. Une fois rejetées dans les eaux de l'embouchure de l'estuaire, les bactéries antibiorésistantes présentent différentes vitesses de chute selon leur association aux particules, une partie d'entre elles décantant sur les vasières les plus proches des rejets. Dans les eaux où la concentration pondérale en MES est élevée, la zone du bouchon vaseux, la répartition des bactéries dans la colonne d'eau est dépendante de la dynamique des matières en suspension ; les bactéries associées aux particules décantables se concentrant dans le fond en période de jusant.

La contamination des eaux de l'estuaire de Seine en molécules antibiotiques n'est pas très élevée (de l'ordre d'une dizaine de ng pour 9 molécules), comparée à la pression anthropique exercée sur son bassin versant et aux résultats obtenus sur les deux continuums hospitaliers et agricoles. La contamination en antibiotiques des rejets de la STEP est rapidement diluée dans les eaux de l'estuaire. Les molécules les plus stables sont retrouvées (fluoroquinolones, macrolides et sulfamides) et se diluent dans la zone de l'embouchure (de l'ordre du ng) à l'exception de la sulfaméthoxazole. Il serait intéressant de connaître les propriétés d'adsorption cet antibiotique aux particules afin de savoir si l'augmentation observée dans la zone du bouchon vaseux est liée à l'augmentation en MES à ce niveau de l'estuaire (zone du bouchon vaseux).

Les résistances majoritairement retrouvées chez les *E. coli* isolées des eaux de Seine correspondent essentiellement à des prescriptions en médecine humaine à l'exception de la tétracycline et la kanamycine aussi utilisées en médecine vétérinaire. La majeure partie de ces souches sont multirésistantes, ces propriétés s'expliquant pour partie par la présence d'intégrons.

Les concentrations observées dans les eaux de l'estuaire de Seine, ne sont pas non plus compatibles avec une pression de sélection responsable de l'émergence de souches résistantes, ces bactéries antibiorésistantes ont été sélectionnées dans les réservoirs humains et animaux soumis à des traitements antibiotiques. Les analyses génétiques sur la structure des populations d'*E. coli* dans les eaux suggèrent une contamination majoritairement d'origine humaine sans exclure pour autant une contribution d'origine agricole avec des apports d'origine humaine à Poses en période de haut débit.

Exposition de l'Homme aux contaminants chimiques et perception du risque

Les deux enquêtes sociologiques montrent qu'il existe des activités récréatives dans l'estuaire de Seine sur des sites contaminés. La pratique expose dès lors les usagers à un risque sanitaire. L'étude de la pêche à pied a permis d'identifier et de quantifier l'existence d'une activité de prélèvement sur les trois sites normalement interdits à l'année à l'embouchure de l'estuaire (Le Havre, Octeville-sur-Mer, Saint-Jouin-Bruneval). 450 individus y pêchent de façon régulière et 16,9% des interrogés y prélèvent des bivalves pour leur propre consommation. L'étude sur la

Risle révèle, démontre, l'existence d'une importante activité kayak (environ 5000 pratiquants occasionnels auxquels s'ajoutent 400 pratiquants réguliers). Parmi eux on estime à 1372 le nombre d'individus exposés à un risque sanitaire (par ingestion d'eau), dont 184 qui présentent un risque élevé de contamination du fait d'une exposition régulière.

Les travaux des économistes ont cherché à caractériser la perception que peuvent avoir les acteurs des risques potentiels associés à la pollution des eaux par les résidus de médicaments. Une enquête menée auprès d'un échantillon représentatif de 218 médecins généralistes de Haute-Normandie a montré que les médecins sont sensibilisés à ces risques potentiels au même titre qu'à d'autres risques environnementaux ou sanitaires pourtant avérés et mieux documentés. Même s'ils ont tendance à ne pas faire confiance aux pouvoirs publics en matière de maîtrise des risques environnementaux et sanitaires, les trois quarts des médecins interrogés se disent favorables à la mise en oeuvre, dès à présent, de mesures visant à limiter les conséquences potentielles des rejets de médicaments dans les eaux, en application du principe de précaution.

Transfert de gènes de résistance aux antibiotiques entre bactéries allochtones et bactéries autochtones

L'analyse génétique rétrospective de 9 souches multirésistantes aux antibiotiques isolées de l'estuaire de Seine montre que ces souches hébergent des plasmides transférables entre souches d' E. coli avec des fréquences comprises entre $2,2 \cdot 10^{-1}$ et $2,6 \cdot 10^{-8}$. Des expériences de transfert de gènes de résistance entre E. coli et Aeromonas (espèce autochtone de l'estuaire de Seine) ont été réalisées avec une fréquence de $2,8 \cdot 10^{-3}$ pour un transfert conjugatif de plasmide et de 10^{-6} pour des co-transferts de résistance mercure – streptomycine par transformation. Toutefois, ces fréquences qui sont du même ordre que celles décrites dans la littérature sont probablement surestimées car elles ne reproduisent pas la réalité environnementale, et doivent être pondérée par le temps de survie et de maintien de l'ADN dans l'environnement. Pour autant, ces résultats démontrent que ces transferts horizontaux de gènes de résistances sont possibles dans des micro-environnements où la densité microbienne est élevée comme les périphytons ou les biofilms, voir les organismes filtreurs.

Persistance des gènes de résistance aux antibiotiques et des bactéries d'origine fécale

Les résultats obtenus dans le cadre du projet Rhapsodis suggèrent que les sédiments anciens ont une capacité d'auto épuration et ne semblent pas favorables au maintien de gènes de virulence, de résistance aux antibiotiques issus de bactéries d'origine allochtone. Le contexte semble différent pour les dépôts sédimentaires plus récents puisque ceux-ci semblent favorables au maintien de l'ADN de bactéries d'origine fécale et donc potentiellement des gènes de virulence associés et/ou des gènes de résistance aux antibiotiques. Ce compartiment pourrait constituer un environnement favorable aux échanges génétiques par transferts génétiques horizontaux dans la mesure où les bactéries ne perdent pas leur viabilité et si la densité cellulaire est suffisante.

Impact des antibiotiques sur l'activité des communautés nitrifiantes et dénitrifiantes des sédiments

L'étude des effets de la vancomycine sur les communautés microbiennes des sédiments après 3 semaines d'incubation en réacteur, montrent un impact sur la production de nitrite, alors que la réduction de nitrate ne semble pas affectée. La vancomycine et la fluméquine, à de faibles concentrations (100 et 1000 ng L^{-1}), correspondant aux concentrations mesurées dans le milieu ne modifient pas significativement les taux de réduction du nitrate dans les sédiments amont et aval du rejet de STEP. Des faibles diminutions, significatives ont été observées en présence de sulfaméthoxazole avec 100 ng L^{-1} et 1000 ng L^{-1} . Des travaux sur les effets d'une multi-exposition chronique à des antibiotiques à de faibles concentrations seraient nécessaires pour s'approcher au mieux des conditions environnementales.

I- Rappel des objectifs/ Equipes participantes

I-1 Equipes participantes

- UMR CNRS 6143 Laboratoire M2C - F. Petit, T. Berthe, microbiologie ; N. Massei, M. Fournier, Hydrologie ; J. Deloffre, R. Lafite, sédimentologie. Université de Rouen (hydrologie, sédimentologie et microbiologie)

Doctorants : K. Oberlé (thèse FLASH), soutenance prévue fin 2012 ; M. Ratajczak soutenue en mai 2011 ; E. Laroche, soutenue en avril 2010 ; Maxence Lemoine, soutenance prévue en octobre 2013.

- INSERM U722 – E. Denamur, O. Clermont; épidémiologie d'*E. coli*, et microbiologie médicale Université Paris 7/CHU Bichat
- UMR CNRS 5255, H. Budzinski, P. Pardon, UMR CNRS 5805 EPOC-LPTC, Université Bordeaux

Doctorant : Marion Justine

- EA 2128 IHME, Roland Leclercq, Université de Caen/CHU Caen, Centre National de Référence des Entérocoques
- Parasitologie, Université de Rouen – L. Favennec, G. Gargala
- CARE EA2260- M.Chevé, socio- économie/ Université Rouen

Doctorant : N Chrin

- UMR CNRS 6266 IDEES - M. Bussi, Géographe, Université de Rouen

Doctorant : Barbara Evrard

- CETAPS EA3832 – D. Féménias, sociologie, Université Rouen
- UMR CNRS 7619 Sisyphe – J. Garnier, A. Laverman, Ecologie microbienne, Université Paris 6

Doctorant : Chen YAN

I-2 Objectifs

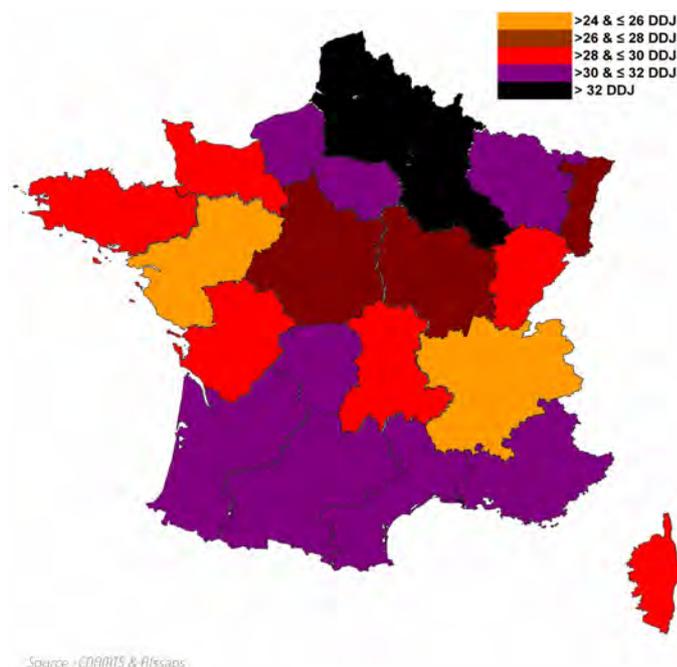


Figure 1 : Répartition de la consommation en antibiotiques en ville dans les régions de France métropolitaine (données AFFSAPS). DDJ, Dose Définie Journalière constituant une posologie de référence pour un adulte de soixante-dix kilos.

Le développement de la résistance aux antibiotiques est un problème majeur de santé publique. L'utilisation importante des antibiotiques en médecine humaine (Figure 1) et animale, et comme facteur de croissance en élevage (utilisés en France jusqu'en 2006; http://www.afssaps.fr/var/afssaps_site/storage/original/application/4604a7b9f7f10e796352be959c1b46b4.pdf), est considérée comme la raison principale de l'accroissement de la résistance bactérienne aux antibiotiques, et de la contamination des eaux environnementales par les antibiotiques et leurs produits de dégradation (Aarestrup, 2005, Barbosa and Levy, 2000; Séveno et al, 2002). Le rejet de bactéries antibiorésistantes et de molécules antibiotiques dans les eaux est un enjeu sociétal, étroitement lié aux usages et à la perception du risque des praticiens hospitaliers et vétérinaires. L'évaluation de l'impact de ces rejets, de leurs effets possibles sur l'écosystème ou la santé humaine, est encore incomplètement documentée scientifiquement et nécessite le recours au principe de précaution (Godard, 2003).

Dans les eaux, il existe une corrélation positive entre la consommation d'antibiotiques et l'apparition de bactéries résistantes à ces mêmes antibiotiques, sans toutefois pouvoir toujours distinguer les origines humaine ou animale de ces apports (Goni-Urriza et al, 2000; Peak et al, 2007). Une fois dans l'environnement des événements de transferts de gènes de résistance aux antibiotiques, y compris entre espèces bactériennes phylogénétiquement éloignées sont possibles, mais ces fréquences de transferts de gènes de résistance aux communautés microbiennes autochtones sont aujourd'hui encore mal connues. Dans ces conditions l'environnement, pourrait constituer un réservoir provisoire en gènes de résistance. De même on ne connaît pas réellement l'impact sur l'écosystème des rejets d'antibiotiques à des concentrations réellement mesurées dans l'environnement : favorisent-ils la dissémination des gènes de résistance lorsqu'ils sont transférables ou influencent-ils le fonctionnement des cycles biogéochimiques.

Dans ce contexte, le projet multidisciplinaire FLASH, vise à évaluer les impacts des rejets en antibiotiques et en souches antibiorésistantes dans les eaux, afin de mieux appréhender le risque sanitaire et environnemental, voire de proposer des modifications dans les usages des prescripteurs en antibiotiques.

Les eaux de l'estuaire présentent une contamination élevée en bactéries et parasites d'origine fécale, dont des souches d'*E. coli* multirésistantes aux antibiotiques, en parallèle à une contamination par des molécules pharmaceutiques et des perturbateurs endocriniens. Lors de l'exercice précédent du programme Seine-Aval, il a été montré que le déterminisme de la contamination fécale dépend des zones de l'estuaire (affluent, usage des bassins versants, dynamique sédimentaire, salinité), des facteurs hydrologiques (débit, pluviométrie), mais il n'existe aucune information sur l'épidémiologie des souches de bactéries et de parasites circulant dans les eaux et donc de leur pathogénicité pour l'Homme.

La majorité des antibiotiques, sont rejetés dans les effluents traités des stations d'épuration, sous forme de molécules peu modifiées, dans les eaux de Seine. Leur persistance varie de quelques jours à plusieurs années selon le milieu (eau ou sédiments). Dans ces environnements, l'effet de la présence d'antibiotiques dans les eaux, à des concentrations inférieures aux seuils thérapeutiques, sur la sélection, le devenir des bactéries antibiorésistantes et sur la dissémination des gènes de résistance reste aujourd'hui mal connu. L'environnement aquatique peut ainsi jouer un rôle essentiel comme réservoir et lieu d'échange de gènes au sein des communautés microbiennes.

Ce projet de recherche repose sur une démarche multidisciplinaire intégrative qui réunit à la fois les compétences en microbiologie, génétique, chimie, hydrogéologie et psycho-économie. Il a pour objectifs :

- 1- d'identifier l'origine des contaminants microbiens (animal/et humains) et de caractériser la pathogénicité pour l'homme des souches d'*E. coli* et de *Cryptosporidium sp* stockés lors des campagnes de prélèvement dans le cadre du programme seine aval 3.

- 2- de discriminer les apports microbiens d'origine animale / humaine à l'échelle d'un site atelier où il sera possible de suivre 2 types de continuums (i) rejets hospitaliers - STEP - eaux de Seine et (ii) exploitation animale (bovins) - eaux de rivière - estuaire de Seine.

3- d'étudier le devenir des antibiotiques, du transfert des bactéries antibiorésistantes (*E. coli*) et du flux de gènes correspondant, le long des deux continuums cités précédemment.

4- de caractériser les résistances bactériennes et les supports génétiques correspondants (plasmide, transposon et intégron) chez les populations (*E. coli*), rejetées dans l'environnement. La recherche de gènes de résistance cibles sera effectuée dans les biofilms et chez les bactéries autochtones de l'environnement. Une recherche de la dissémination de gènes entre les bactéries antibiorésistantes allochtones au milieu, et les communautés indigènes des eaux réceptrices s'effectuera le long des deux continuums.

5- de caractériser quantitativement et qualitativement ces transferts à partir des bassins versants, et définir les périodes favorables aux rejets des bactéries antibiorésistantes dans les eaux par ruissellement des sols. Le devenir des bactéries rejetées par la Risle dans l'embouchure de l'estuaire, intégrera les caractéristiques hydrosédimentaires du milieu récepteur afin de définir les périodes où les moules de baie de Seine sont susceptibles d'être contaminées par des bactéries antibiorésistantes. Le rôle des copépodes comme vecteurs de bactéries d'origine fécale sera aussi intégrée dans cette étude en relation avec le projet COBAC.

6- de déterminer l'exposition de l'homme aux contaminants chimiques et microbiologiques par une étude des usages récréatifs et liés à l'activité de la pêche sur le site atelier retenu.

7- d'étudier la représentation qu'ont les acteurs (praticiens hospitaliers et exploitants agricoles) du risque sanitaire et environnemental lié à l'usage des antibiotiques. L'analyse économique fournira des outils théoriques et des résultats empiriques qui seront mobilisés afin d'étudier la procédure de décision face à des risques nouveaux et imparfaitement connus, de leur évaluation jusqu'à la définition de mesures à la fois proportionnées et acceptables, par les différents publics concernés.

En parallèle, une tentative de bilan à l'échelle du bassin versant de cet affluent par intégration des données acquises dans un modèle spatialisé (SENEQUE), devrait permettre à l'issue de ces travaux d'évaluer la contamination depuis la source de pollution jusqu'à l'exutoire et le long du continuum rivière – estuaire – baie de Seine en collaboration avec les modélisateurs du PIREN SEINE (J.M. Mouchel).

Le suivi des populations de bactéries antibiorésistantes et du flux de gènes correspondants, et l'analyse des antibiotiques et de leurs produits de dégradation sont effectués le long de deux continuums sur le bassin versant de la Risle: (i) rejets hospitaliers – STEP - eaux de Seine, (ii) exploitation animale (bovins) - eaux de rivière – Risle, et dans la zone de l'embouchure de l'estuaire où se rejettent les eaux de la Risle.

Ce projet a pour originalité de se doter d'un comité d'usagers, qui permet l'implication des directions des hôpitaux, des médecins hospitaliers, des responsables de la ville de Pont-Audemer et de sa station d'épuration, du groupement sanitaire d'éleveur du département de l'Eure et des responsables d'exploitations agricoles. Ces différents partenaires ont accepté de collaborer mais souhaitent être étroitement associés au déroulement du programme. La création d'un comité de suivi du projet sera élargie aux différents acteurs impliqués directement dans le projet ainsi qu'aux partenaires institutionnels (GIP Seine Aval, Agence de l'eau, DRASS, DIREN,..). L'objectif étant que les usagers puissent s'approprier les résultats, afin de proposer des outils d'aide à la décision pour une gestion du risque environnemental, voire sanitaire, consécutif aux rejets dans les eaux d'antibiotiques et de bactéries antibiorésistantes.

Le projet Flash est un projet porté par les équipes de Seine-Aval et adossé à une équipe du PIREN Seine et a bénéficié d'un financement complémentaire par EC2CO-CNRS.

Ce projet repose sur une démarche intégrative multidisciplinaire, sur la complémentarité des approches : observations *in situ* et expérimentations en laboratoire ; études de processus, et analyse statistique des données. L'objectif opérationnel est l'élaboration d'outils d'aide à la décision afin de mieux appréhender le risque sanitaire et environnemental, voire de proposer des modifications dans les usages, selon l'approche DPSIR (Driving forces, Pressure, State, Impact, Response) présentée Figure 2. L'approche circulaire proposée par le modèle DPSIR est particulièrement pertinente pour le projet FLASH car au-delà des recommandations des pouvoirs publics, les perceptions des praticiens et des usagers contrôlent en grande partie aujourd'hui les apports au milieu. Ainsi à l'issue de ce programme, il devrait être possible de tester des scénarii qui évaluent les quantités d'antibiotiques et de bactéries antibio-résistantes rejetées par la Risle

dans l'estuaire, pour des conditions extrêmes en terme de pratiques médicales et vétérinaires, et en terme de pluviométrie. La construction des scénarii, puis leur simulation et le rendu des résultats sont à la base de la démarche du projet, et le processus d'interaction avec la société qui en résulte permet d'alimenter le schéma DPSIR en consolidant, on l'espère, les niveaux de perception, et en allant au-delà des relations entre rejets et concentrations (voire effet) dans le milieu auxquelles s'arrêtent bien des projets de recherche environnementaux. Les expériences en microcosmes développées en parallèle à l'UMR Sisyphé (Programme PIREN SEINE) devraient permettre d'estimer le risque environnemental associé sur l'activité des communautés fonctionnelles.

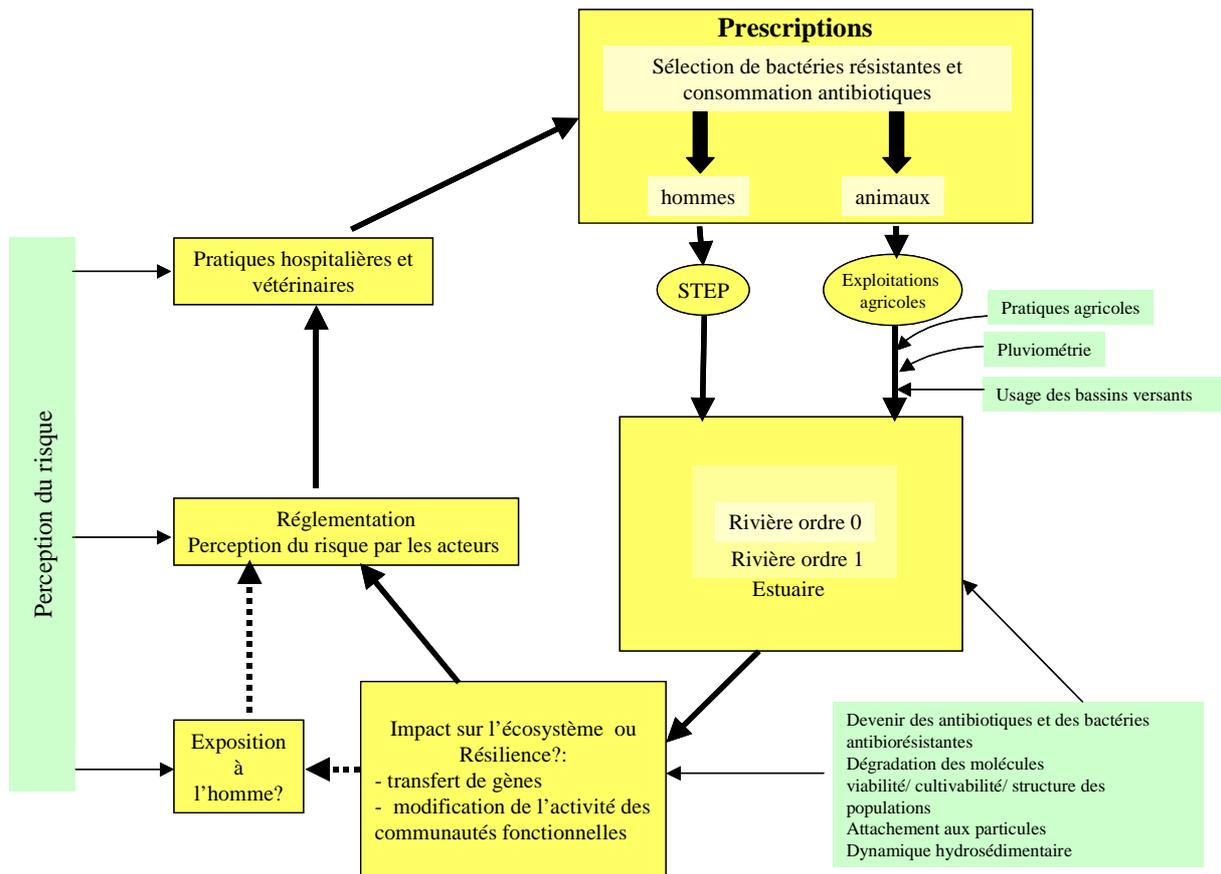


Figure 2 : Intégration du programme Flash dans la démarche DPSIR

I-3 Bilan du programme

Bilan des actions réalisées

Actions proposées	Réalisation	Valorisation opérationnelle	Valorisation scientifique <i>*Publication co signée entre les partenaires</i>
Epidémiologie des <i>Cryptosporidium parvum</i> circulant dans les eaux et moules de baies de Seine	Fait 1 <i>non fait dans les moules mais analyse rétrospective des données SA3 en cours</i>		*Publication à rédiger (moules) bilan SA3
Epidémiologie des souches d' <i>E. coli</i> circulant dans les eaux et dans les moules de baies de Seine	Fait 1, 2, 3, 4 (Non réalisé dans les moules) [¥]	Analyse quantitative du risque chez les pratiquants de loisirs sportifs	Publication socio-microbio envisagée
Discrimination des origines humaines et animales des contaminations microbiologiques.	Fait	Outils de discrimination sur base de la distribution des phylogroupes	*Ratajczak et al, 2010 *Ratajczak et al en préparation *Une publication en cours
Devenir des molécules antibiotiques	Fait 2, 3, 4, 5 MEDSEINE	Recommandation sur la base de leur persistance dans l'environnement	Laroche et al, 2010 *Oberlé et al, 2012
Flux de bactéries antibiorésistantes et des gènes correspondants	Fait 1, 2, 3 A faire 4		*Justine et al, en préparation *Oberlé et al, en préparation *Leclercq et al, à soumettre
Résistances bactériennes et les supports génétiques chez (<i>E. coli</i>) et entérocoques	Fait 2, 3		
Transfert de gènes entre les bactéries antibiorésistantes allochtones au milieu, et les communautés indigènes des eaux réceptrices,	Fait expérimentation en laboratoire		
Recherche de gènes de résistance cibles dans les biofilms de l'environnement, le long des deux continuums.	Fait dans les sédiments Rhapsodis ; Echantillons de vasières à analyser (FESEL/SCALE)	Rôle épurateur des sédiments : résilience de l'environnement et résistome.	Kaci et al, en cours
Définir les périodes favorables aux rejets des bactéries antibiorésistantes dans les eaux	Fait		En cours thèse de Kenny Oberlé
Bilans quantitatif et qualitatifs des transferts à partir des bassins versants	Fait	Données à utiliser dans les modèles du fonctionnement de la Seine (Sénèque/Riverstrahler) et de son estuaire (SiAM)	Rencontre envisagée avant fin 2012
Bilan des apports sédimentaires	Fait		
Devenir des bactéries rejetées par la Risle dans l'embouchure de l'estuaire en fonction de leur vitesse de chute	Fait		
Le rôle des copépodes comme vecteurs de bactéries d'origine fécale	Fait et à poursuivre Thèse COBAC		
Caractérisation des populations exposées au danger microbiologique via les pratiques sportives et de loisirs	Fait	Analyse quantitative du risque liée à la présence d' <i>E. coli</i> entéro-pathogènes	Evrard et al, 2011 Publication commune envisagée (socio-microbiologie)
Représentation des acteurs (praticiens hospitaliers et exploitants agricoles) du risque sanitaire et environnemental lié à l'usage des antibiotiques.	Fait et à poursuivre Thèse en cours	Mesures proportionnées et acceptables, par les différents publics concernés.	

(1) Souchier Seine-Aval 3 ; (2) continuum hospitalier : rejets hospitaliers - STEP - eaux de Seine ; (3) continuum agricole : exploitation animale (bovins) - eaux de rivière - estuaire de Seine ; (4) Estuaire de Seine : transect Poses – Honfleur ; (5) zone embouchure Risle – zone littorale, STEP intra estuarienne.

(¥) Une analyse rétrospective sera effectuée sur la base des résultats déjà acquis dans Seine-Aval 3 et des données de l'AESN et Ifremer en 2013.

II- Démarche méthodologique

II-1 Les sites ateliers



Figure 3 : Cartographie de la zone d'étude du projet FLASH. Des continuums hospitaliers et agricoles jusqu'à la confluence Risle - estuaire de Seine. Le site de mesures ponctuelles situé à la confluence Risle – estuaire de Seine est soumis à une forte dynamique n'ayant pas permis la mise en place de mesures continues. Pour les sites équipés (1, 2, 3) de sondes multi paramètres (Troll *In Situ* 9500) mesurant la turbidité, conductivité, température, hauteur d'eau, pression toutes les 15 minutes pendant 1 à 2 ans selon les sites. L'échantillonnage des points 1, 2 et 3 du continuum agricole a été réalisé à l'aide de collecteurs ISCO.

II-2 Stratégie d'échantillonnage

II-2-1 Le continuum hospitalier

Le continuum hospitalier est composé d'un centre de soin (hôpital et maison de retraite), d'une station d'épuration (effluents bruts et traités) et de son rejet dans la rivière. La contamination en antibiotiques et bactéries fécales résistantes aux antibiotiques a été étudiée le long de ce continuum lors de deux périodes : faible et forte épidémiologie. La consommation en antibiotiques du centre de soins et de la médecine de ville a été déterminée en collaboration avec les pharmaciens du centre de soins et de la ville. Le site du centre de soins est composé d'un hôpital (87 patients) et d'une maison de retraite (180 patients). Le temps de séjour des patients varie de 4 à 28 jours à l'hôpital et est en moyenne de 10 ans à la maison de retraite. Ces derniers ne sont pas en permanence sous traitements aux antibiotiques mais sont exposés plusieurs fois tout au long de leur séjour. Les effluents de l'hôpital (site n°1) et de la maison de retraite (site n°2) sont collectés ponctuellement (juin 2009) ou à l'aide d'un collecteur automatique ISCO 6700 (décembre 2009). Ces effluents ainsi que les eaux usées des 9058 habitants de la ville sont alors collectées par l'unique station d'épuration de la zone d'étude. Les traitements de la station d'épuration consistent en une première étape de dégrillage, d'une décantation et d'un clarificateur primaire. La deuxième étape du traitement consiste à la mise en place d'un système de boues activées et d'un second clarificateur. Les échantillons d'eau sont moyennés sur 24h (1 litre par heure) pour l'effluent brut (site n°3) et l'effluent traité (site n°4) lors des deux périodes. Le dernier site est le rejet de l'effluent traité de la station d'épuration dans la Risle (site n°5). Il a été échantillonné ponctuellement (juin 2009) mais également moyenné pendant 24h (décembre 2009). Les échantillons ont été collectés dans des bouteilles en verre pour les analyses chimiques et dans des flacons en polyéthylène pour les analyses microbiologiques.

II-2-2 Le continuum agricole

La contamination des eaux en antibiotiques et en bactéries fécales résistantes aux antibiotiques a été déterminée le long du continuum agricole caractérisé par un gradient d'anthropisation. Le long de continuum, les sites 1, 2 et 3 ont été équipés de sondes Troll[®] *In Situ* 9500 permettant la mesure des paramètres de turbidité, conductivité, hauteur d'eau, pression et température à haut débit (intervalle des mesures : 15 minutes). L'échantillonnage a été réalisé sur 4 sites caractérisés par des usages de sols contrastés lors de la stabulation (novembre 2009) et du pâturage (décembre 2010) des bovins sur le bassin versant. Le ruisseau du sébec est localisé dans une zone forestière (site 0) tandis que le site du ruisseau de Selles (site 1) est localisé à la proximité immédiate d'une exploitation agricole où l'élevage de 450 bovins a lieu. Les sites de la Tourville (site 2) et de la Risle (site 3) sont localisés respectivement à l'entrée et dans la zone urbaine du continuum hospitalier où une partie du des habitations du centre-ville rejette leurs eaux usées dans le milieu naturel. La consommation d'antibiotiques pour le traitement des bovins de l'exploitation a été déterminée en collaboration avec l'exploitant et le vétérinaire affecté au cheptel. Lors des deux campagnes, les échantillons ont été collectés à l'aide de collecteurs automatiques (ISCO 6700) et tous les échantillons ont été moyennés sur 24 heures (1 litre par heure).

Apports monodisciplinaires

Volet hydrologie et sédimentologie

**Quantification qualitative et quantitative des transferts à l'estuaire
(UMR M2C)**

III Résultats :

III-1 Quantification qualitative et quantitative des transferts à l'estuaire (UMR M2C)

III-1-1 Fonctionnement hydrologique de la Risle

Cette partie a pour but de donner un cadre hydrologique et hydrogéologique général pour caractériser la dynamique de la Risle et son évolution au cours des dernières décennies.

L'objectif est ici i) de caractériser brièvement la dynamique hydrologique de la Risle sur le long terme (i.e. les quatre dernières dizaines d'années), ii) de tester l'applicabilité d'un modèle hydrologique de type conceptuel pour caractériser la relation pluie-débit dans un contexte crayeux à forte composante karstique.

A. Contextes physiographique, géologique et hydrogéologique

Le bassin versant de la Risle est principalement situé dans le département de l'Eure (à environ 80%), avec une partie présente dans le département de l'Orne. Sa superficie totale est d'environ 2320 km². La Risle possède un linéaire d'environ 159 km. Elle prend sa source dans les collines du Perche dans le département de l'Orne et se jette dans l'estuaire de la Seine au niveau des communes de Berville-sur-Mer et de St Samson-de-la-Roque situées dans le département de l'Eure. Son principal affluent est la Charentonne (linéaire de plus de 100 km) grossi lui-même par le Guiel (linéaire de plus de 25 km).

L'occupation des sols sur le bassin consiste en 3.1% de zones urbanisées, 23.7% de terres pâturées et 55.7% de terres cultivées (Figure 4). A ces usages, s'ajoute la présence de 32 stations d'épurations réparties sur tout le bassin versant et responsables d'apports ponctuels en contaminants dans les eaux.

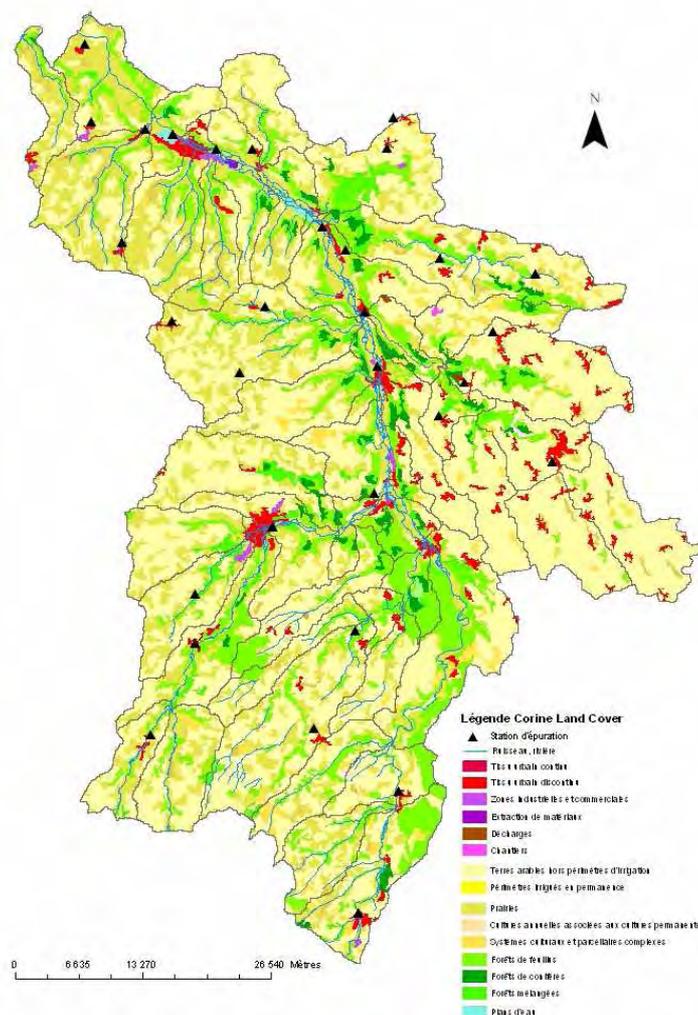


Figure 4 : Couverture Corine Land Cover de l'occupation des sols sur le bassin versant de la Risle.

Le bassin de la Risle est localisé sur les plateaux de l'Ouest du Bassin Parisien, qui présentent un pendage globalement vers l'Est. Le substrat de ces plateaux est de nature crayeuse et est recouvert de formations superficielles, d'épaisseurs plus ou moins importantes, constituées par des dépôts tertiaires ponctuels et des argiles à silex résultant de l'altération de la craie (Laignel, 1997 et 2003). Cette couche d'argiles à silex, ou altérites à silex, est recouverte par des loëss qui sont des dépôts sédimentaires d'origine éolienne (Lautridou, 1985). Les travaux de Laignel (1997) et Quesnel (1997) mettent en évidence, au niveau du bassin versant de la Risle, des épaisseurs d'argiles à silex diminuant globalement d'amont en aval d'environ 20 à 6 m. Des épaisseurs de loëss importantes se concentrant au niveau de la jonction entre la Charentonne et la Risle sont également mises en évidence. Elles peuvent atteindre jusqu'à une trentaine de mètres, les plus faibles épaisseurs étant situées principalement à l'amont et à l'aval du bassin.

Les caractéristiques géomorphologiques régionales sont très différentes selon que l'on se situe au Nord ou au Sud de la Seine (Laignel et al, 2003). Au Nord, les plateaux sont fortement découpés par des vallées actives et des vallons secs alors qu'au Sud, les vastes plateaux le sont par un réseau hydrographique très pauvre et peu hiérarchisé (Hauchard et al, 2002). En effet, le département de l'Eure est peu disséqué par le réseau hydrographique ; seulement deux rivières principales, la Risle à l'Ouest et l'Eure à l'Est, avec leurs affluents, sont présentes. Le Modèle Numérique de Terrain (MNT, au pas de 50 m) traité par Système d'Information Géographique

(SIG) permet d'effectuer une analyse globale du relief. Au niveau du bassin versant de la Risle, nous observons une diminution du relief d'amont en aval, les plus hautes altitudes atteignant 389 m en amont. Le contexte structural du département de l'Eure a été étudié par de nombreux auteurs (Juignet, 1974 ; Kuntz et Wyns, 1976 ; Kuntz et al, 1977, 1981, 1982 ; Kuntz et Monciardini, 1985). Wazi (1988) s'est principalement focalisé sur la vallée de l'Oison, de ce fait, le schéma structural proposé n'est pas exhaustif puisque certaines zones n'ont pas été étudiées. Cependant, le contexte structural a été complété par certains grands axes structuraux tels que l'anticlinal et le synclinal du Sud de l'Eure (Valdes, 2005). La Figure 5 indique les principaux accidents structuraux du département de l'Eure. Au niveau du bassin de la Risle nous observons trois failles F2, F3, F4, l'accident supposé de la Risle Fr, et l'anticlinal A1.

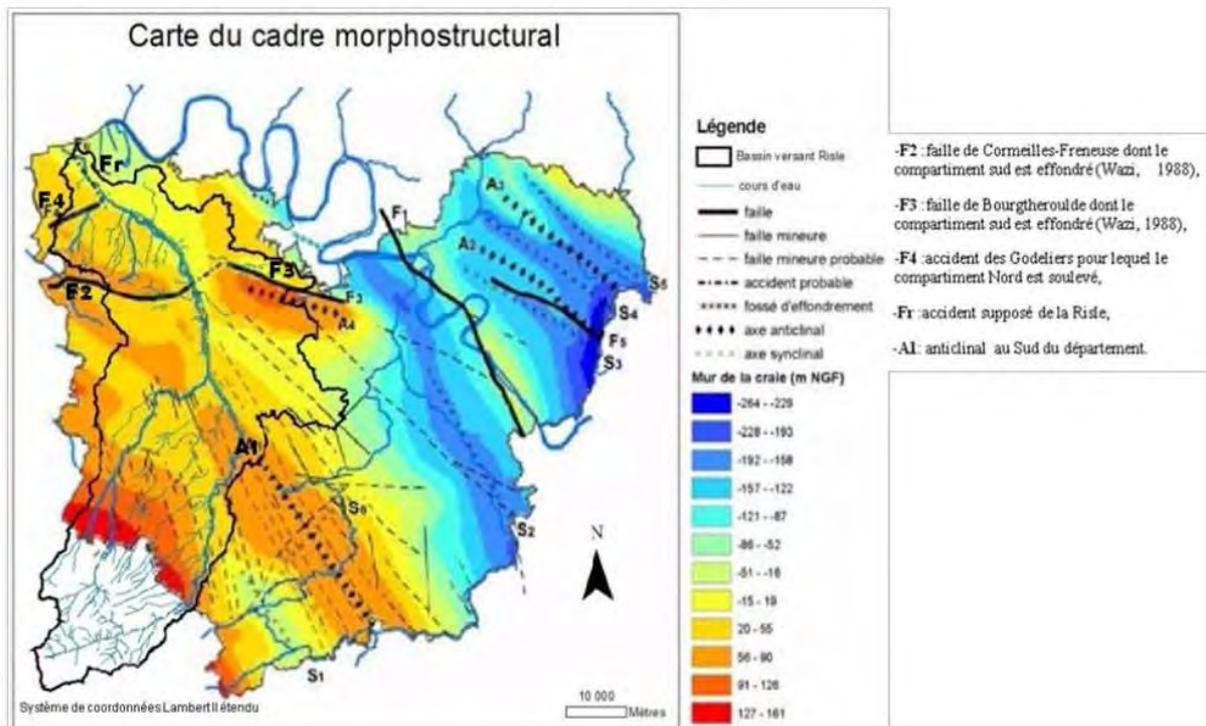


Figure 5 : Contexte structural du département de l'Eure.

D'un point de vue hydrogéologique, la Risle est soutenue par l'aquifère de la craie. L'aquifère de la craie est une nappe à surface libre ; sa surface piézométrique épouse relativement bien la forme du relief en formant des dômes sous les plateaux et des dépressions dans les vallées. La Seine est le principal axe de drainage de l'aquifère de la craie, de ce fait, nous observons un sens global de l'écoulement du Sud vers le Nord en rive gauche. Cependant, la nappe est drainée par les autres cours d'eau du département entraînant la division de l'aquifère en plusieurs bassins versants souterrains : en rive droite, plusieurs petits bassins alimentent la Seine, alors qu'en rive gauche, la Risle et l'Eure sont deux grandes sous-unités hydrogéologiques drainées par la Seine (Figure 6a).

L'aquifère de la craie possède une géométrie variable. En effet, la puissance de la nappe, qui correspond à la différence d'altitude entre le niveau piézométrique et le mur de la craie, varie spatialement et temporellement. Les variations temporelles correspondent aux périodes de recharge (après l'hiver) et de vidange (après l'été) de la nappe. Spatialement, au niveau du bassin versant de la Risle, la puissance diminue d'amont en aval passant d'une centaine de mètres à moins d'une vingtaine de mètres (Figure 6b).

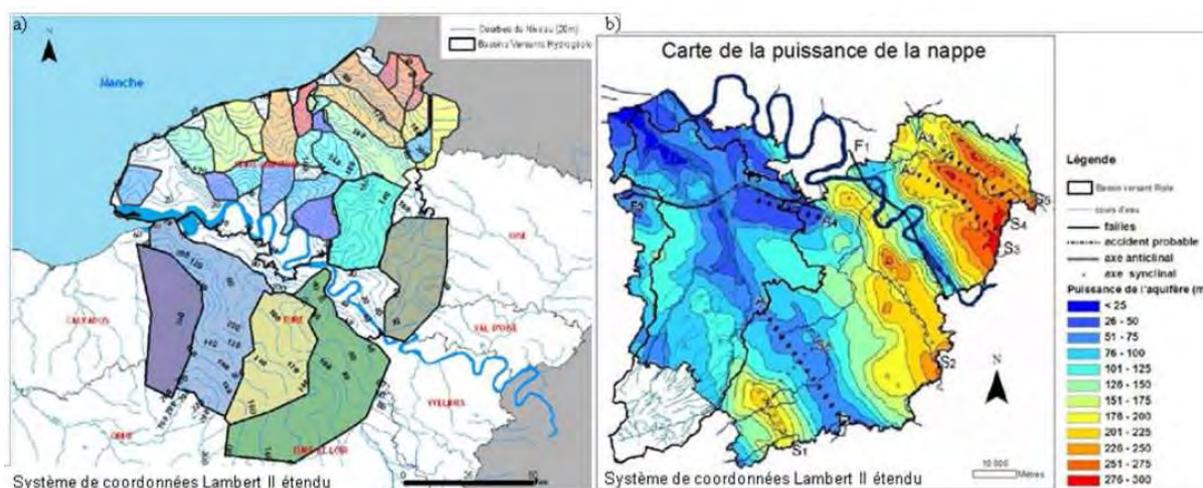


Figure 6 : a) Bassins versants hydrogéologiques en Haute-Normandie ; b) épaisseur de l'aquifère de la Craie dans l'Eure.

B. Analyse de la variabilité des régimes hydrologiques sur le long-terme

B.1 Données de base et pré-traitements

Différentes stations pluviométriques et stations de jaugeages ont été utilisées sur le bassin versant afin de rendre compte des variations spatiales du comportement hydrologique de la Risle. Les données de débits au pas de temps journalier sont issues de la Banque HYDRO (www.hydro.eaufrance.fr/). Huit stations de mesure de débit ont été retenues selon les périodes de mesures disponibles (Tableau 1) et leur localisation d'amont en aval sur le bassin versant de la Risle (Figure 7). Les éventuelles lacunes dans les données hydrométriques ont été comblées en établissant des relations entre stations proches. Malgré la proximité des stations, leur différence de localisation amont-aval induit nécessairement une non-linéarité dans leur relation au pas journaliers : la réponse hydrologique à un même signal de pluie est normalement plus étalée à l'aval qu'à l'amont, et le soutien des nappes est a priori croissant vers l'aval. Lorsque nécessaire, des relations non linéaires (i.e. différentes pour les faibles ou les forts débits) entre 2 stations consécutives ont donc été utilisées pour combler les lacunes de données.

Les données pluviométriques journalières sont issues de onze stations de Météo France réparties sur le bassin versant de la Risle.

Stations	Codes Station	Coordonnées		Années complètes débits	Bassin versant	Sous Bassin	Superficie bassin versant (Km2)
		X (lamb II étendu)	Y (lamb II étendu)				
Risle à Rai	R1	470860	2418153	1965-2009	Risle	Risle	149,28
Risle à Grosley-sur-Risle	R2	488665	2449087	1971-1987	Risle	Risle	486,67
Risle à Pont-Authou	R3	480373	2472837	1968-90/2000-2009	Risle	Risle	1800,18
Vernet à Glos-la-Ferrière	V1	472092	2429552	1978/1995	Risle	Risle	19,5
Charentonne à Bocquencé	C1	463840	2429442	1981-2009	Risle	Charentonne	65,82
Charentonne à Trinité-de-Réville	C2	466689	2443857	2002-2008	Risle	Charentonne	224,21
Guil à Montreuil l'Argillé	G1	464261	2440133	1978-94/1996-2009	Risle	Charentonne	83,31
Corbie à Toutainville	CO1	463932	2486742	1973-1996	Risle	Corbie	66,07

Tableau 1 : Stations de jaugeage sur le bassin de la Risle.

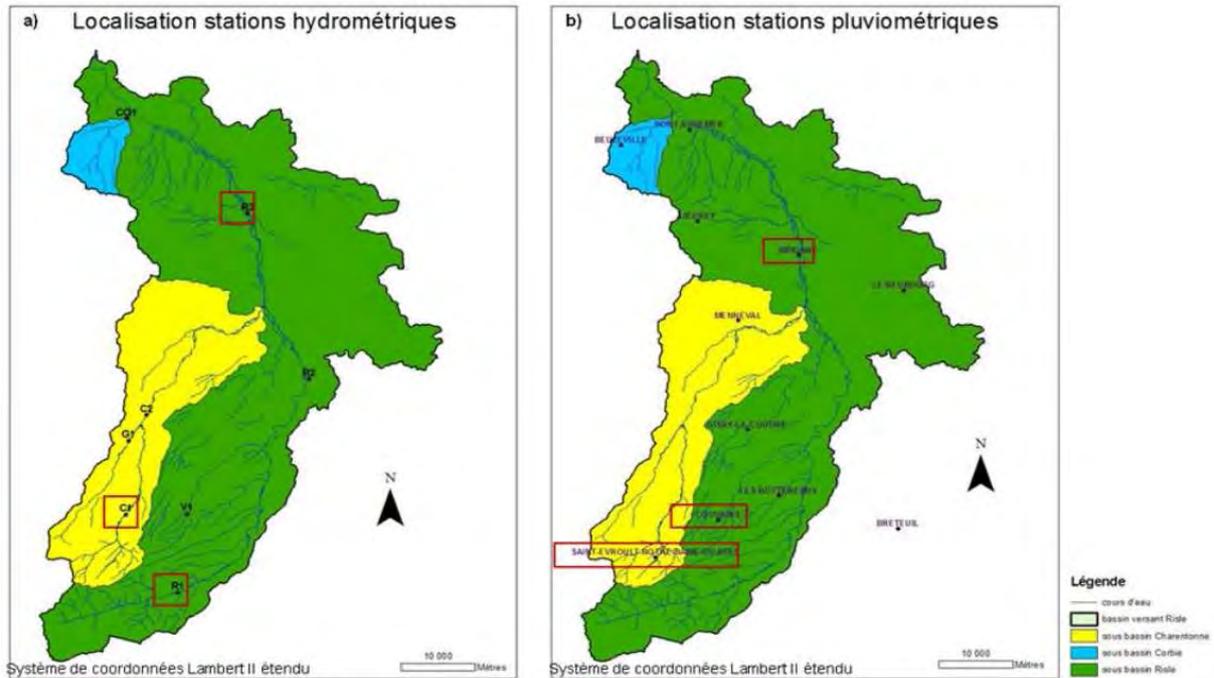


Figure 7 : a) Localisation des stations de jaugeage et b) des stations pluviométriques sur le bassin de la Risle.

Afin d'estimer le degré d'homogénéité de la répartition des pluies sur l'ensemble du bassin, la méthode du double cumul a été appliquée sur les différentes chroniques journalières des onze stations pluviométriques. La Figure 8 montre l'exemple du résultat issu de la méthode du double cumul pour la station à contrôler de Brionne, en ordonnées, et la station de référence du Neubourg en abscisses. Pour toutes les stations à contrôler, aucune rupture de pente n'a été observée. Les données pluviométriques sont donc réparties de façon homogène sur l'ensemble du bassin versant de la Risle. La différence entre la droite de référence du Neubourg et celle de la station à contrôler nous informe toutefois la pluie est généralement plus importante au Nord du département.

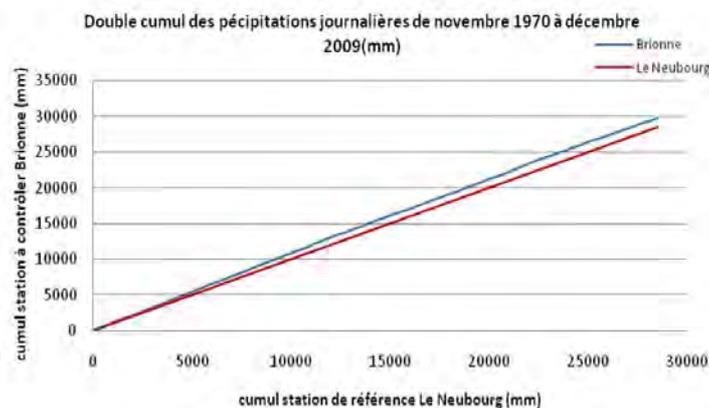


Figure 8 : Exemple d'application de la méthode du double-cumul sur les stations de Brionne et du Neubourg

B.2 Régimes pluviométriques et hydrologiques

Pour toutes les stations, une importante variabilité interannuelle a été observée, trait caractéristique des régimes de type pluvio-océaniques. Une tendance similaire est observée pour toutes les stations, avec une légère augmentation des précipitations d'octobre à décembre

et une baisse en août. De manière générale, les régimes interannuels des précipitations sont du même ordre de grandeur d'une station à l'autre et varient peu (Figure 9). La variabilité de la pluie est assez faible d'une station à une autre, confirmant les résultats précédents (double-cumul).

Comme pour les précipitations, une importante variabilité interannuelle est observée pour toutes les stations de l'amont vers l'aval, caractérisant un régime pluvio-océanique. Le régime est identique pour toutes les stations comme le montrent les graphiques des écoulements mensuels (Figure 10).

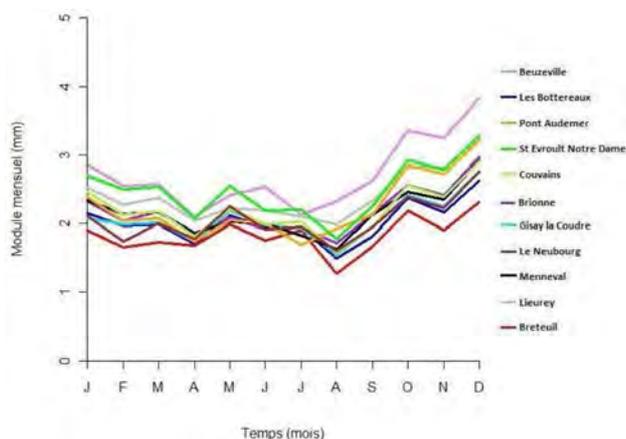


Figure 9 : Régimes pluviométriques des 11 stations du bassin de la Risle.

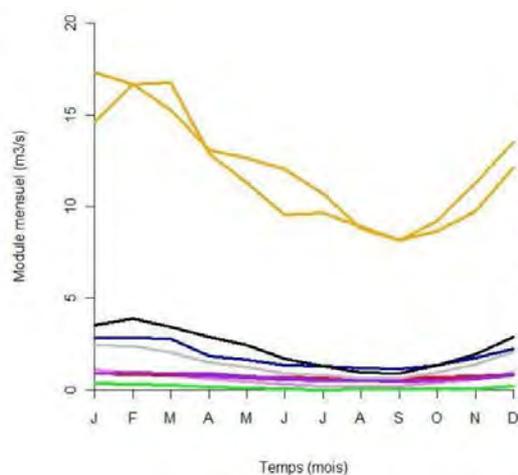


Figure 10 : Graphiques des écoulements mensuels interannuels des différentes stations de jaugeage sur le bassin de la Risle.

B.3 Etude de l'évolution à long terme des séries temporelles hydrologiques

Pour l'étude des variations hydrologiques à long terme, seules trois stations (Rai, Bocquencé et Pont-Authou) ont été étudiées. Ces trois stations sont celles dont les chroniques sont les plus longues, et leur localisation permet de rendre compte de l'évolution de l'amont vers l'aval du bassin de la Risle. En ce qui concerne les précipitations, les chroniques de Couvains, St Evroult-Notre-Dame, et Brionne ont été choisies en accord avec les stations de mesure hydrologique préalablement sélectionnées.

Pour les précipitations, les diagrammes temps-fréquence issus de la transformée en ondelettes continue des séries choisies (Figure 11) montrent l'existence des mêmes bandes spectrales de forte énergie pour les trois stations pluviométriques : une bande à environ 1 an, une à environ 5-9 ans, et une à environ 17-20 ans, quoique de plus faible énergie. Deux principaux modes de

variabilité peuvent donc être distingués : l'annuel et l'interannuel (basse fréquence / long terme). La composante spectrale à 1 an, correspondant au cycle hydrologique, s'intensifie dans les années 90 pour les trois stations, et dans les années 2000 pour Brionne et St Evroult-Notre-Dame. De plus, elle est discontinue aux trois stations. La composante à 5-9 ans s'intensifie aussi dans les années 90 pour les trois stations.

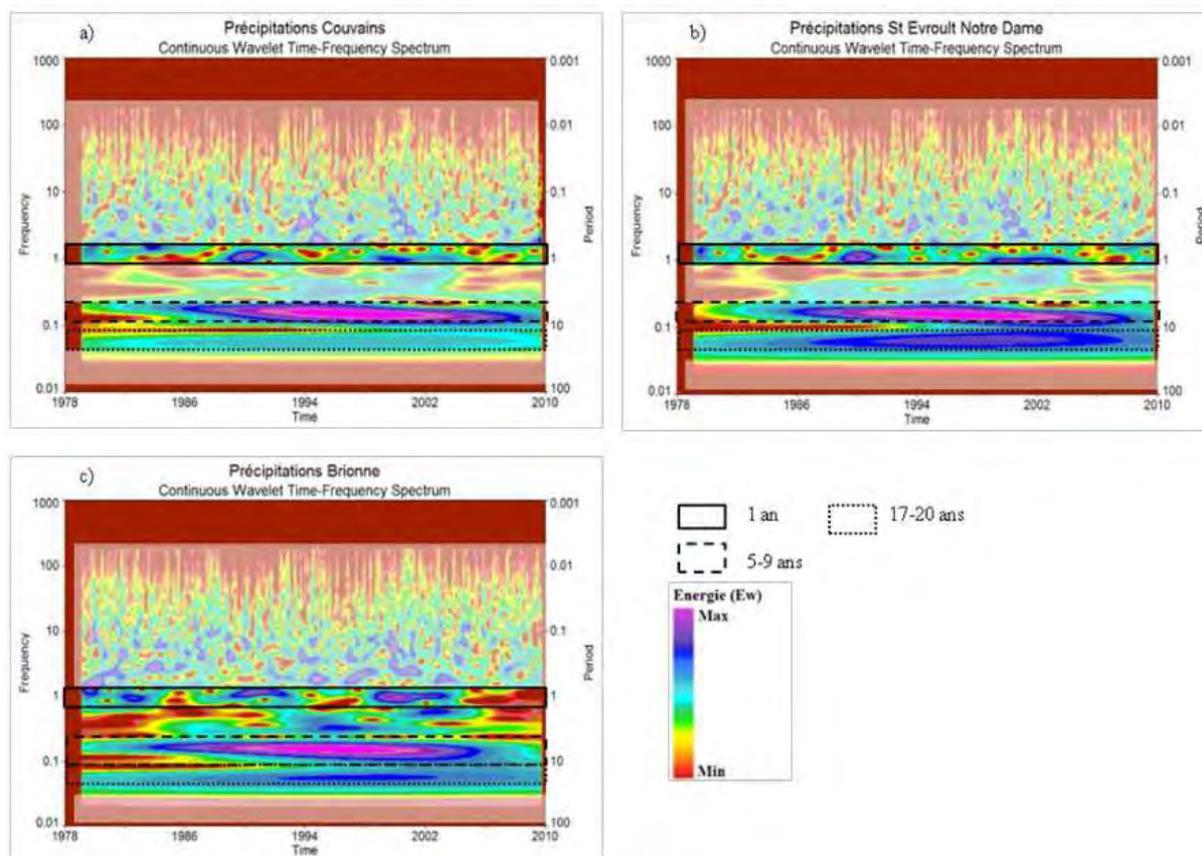


Figure 11 : Spectres en ondelettes des précipitations.

Les diagrammes temps-fréquence résultant de la transformée en ondelettes continue des trois stations de débit (Figure 12) montrent des structures similaires, à savoir la présence de trois bandes de forte énergie : une bande d'une période d'environ 1 an correspondant au cycle hydrologique avec alternance de saisons estivales et hivernales, et deux bandes de période d'environ 5-9 ans et 17-20 ans correspondant aux variations interannuelles (long terme). Notons ici que les durées des séries de débits ne sont pas équivalentes entre elles, ni aux séries de précipitations. Une intensification de la puissance de ces bandes de forte énergie est observée à partir des années 90 et jusqu'aux années 2000 voire 2005 pour les stations de Rai et Bocquencé. Cette tendance n'est pas identifiée au niveau de la station de Pont-Authou car la période étudiée se termine en 1990. De plus, une baisse de la puissance du cycle hydrologique est observée dans les années 70 pour les stations de Rai et Pont-Authou. Les mêmes composantes spectrales que celles des précipitations sont retrouvées.

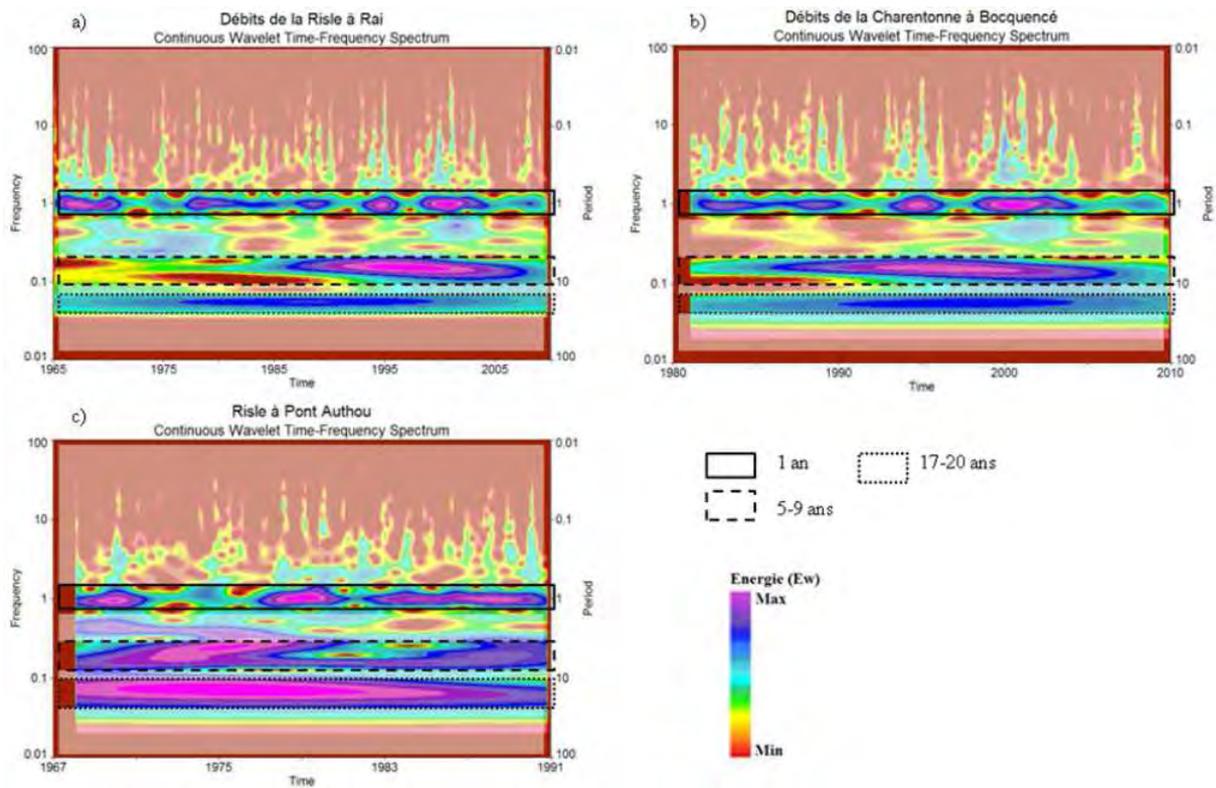


Figure 12 : Spectres en ondelettes des débits.

Ces échelles temporelles correspondent aux variations interannuelles constatées dans le débit de la Seine (Massei et al, 2010) et sont à mettre en relation avec certains modes de variabilité caractéristiques des oscillations du climat de l'Atlantique Nord, dont la NAO (oscillation Nord-Atlantique) constitue l'un des indicateurs.

Le calcul de la contribution de ces composantes annuelles et interannuelles à la variabilité des débits pour les trois stations d'intérêt montre que la contribution des oscillations de basse fréquence croît vers l'aval (Tableau 2). Ceci s'explique par la contribution supérieure de l'aquifère de la craie au débit (apport de la nappe) : l'aquifère agit sur le signal climatique comme un filtre passe-bas, exacerbant l'expression des basses fréquences climatiques par l'inertie de sa réponse hydrologique.

Stations	Basses fréquences		Cycle hydrologique	
	%reconstruction	écart type	%reconstruction	écart type
R1	8,27	0,47	13,66	0,6
C1	6,22	0,21	10,28	0,26
R3	21,79	2,66	21,91	2,67

Tableau 2 : Contributions calculées pour les différentes composantes spectrales extraites d'après les transformées en ondelettes continues.

Le soutien du débit de base par la nappe à l'aval est facilement observable grâce à la forme et à l'intensité de l'intercorrélation pluie-débit aux trois stations (Figure 13). Dans la mesure où la pluie s'apparente à un bruit blanc, cette fonction d'intercorrélation donne la réponse impulsionnelle du bassin (i.e. l'hydrogramme correspondant à une pluie unitaire et de durée correspondant au pas d'échantillonnage) : pour les stations de Ray et Bocquencé, situées à l'amont du bassin versant de la Risle, les fonctions d'intercorrélation montrent un retard à la pluie

de 1 jour, inférieur au temps de réponse de la station la plus aval de Pont-Authou (retard de 2 jours). Cette dernière réponse est également plus étalée dans le temps, et l'intensité de la corrélation moins importante (0,33). Ceci montre, pour Pont-Authou à l'aval, une plus grande persistance du débit dans le temps lié au soutien par la nappe ; de même le moindre degré de corrélation linéaire avec la pluie événementielle est lié à la présence dans le débit d'une composante non liée au débit de ruissellement directement issu de la pluie, i.e. une composante de nappe, qui diminue la corrélation avec la pluie au pas journalier.

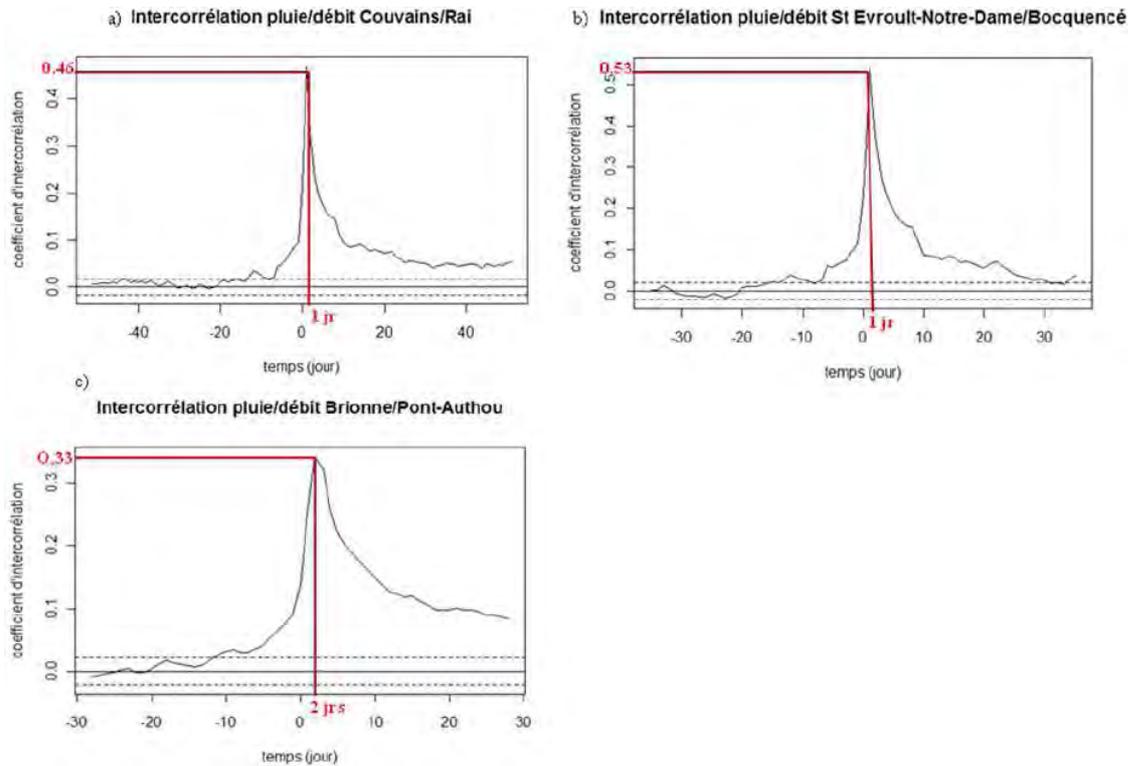


Figure 13 : Fonctions d'intercorrélation pluie-débit pour les stations analysées.

C. Essai de modélisation pluie-débit à différentes stations de l'amont vers l'aval

Le modèle conceptuel GR a été utilisé aux pas journalier (GR4J - Perrin et al, 2003), mensuel (GR2M - Mouelhi, 2003) et annuel (GR1A - Mouelhi, 2003). En entrée, les données de pluies et d'évapotranspiration potentielle journalières, mensuelles ou annuelles sont utilisées.

Les modèles GR4J, GR2M, et GR1A ont été appliqués aux stations de Bocquencé (C1), Rai (R1), Grosley-sur-Risle (R2), et Pont-Authou (R3) (Figure 14). Les critères de Nash sont présentés dans le Tableau 3 pour chaque pas de temps et montrent que les simulations par les différents modèles sont relativement bonnes. Les simulations les moins satisfaisantes sont celles issues du modèle au pas de temps annuel (particulièrement pour la station R3).

Critères de Nash (%)			
Stations	GR4J	GR2M	GR1A
C1	79	84	64
R1	64	78	51
R2	73	82	51
R3	67	68	23

Tableau 3 : Critères de Nash-Sutcliffe obtenus après calage des différents modèles pour les quatre stations (Bocquencé, Rai, Grosley-sur-Risle et Pont-Authou)

L'extrême simplicité du modèle GR1A, qui ne comporte pas de réservoir et effectue simplement une équilibration du bilan hydrologique par l'évapotranspiration, explique vraisemblablement ce mauvais résultat : dans des hydrosystèmes présentant de fortes variabilités interannuelles, le pas annuel ne constitue peut-être pas une période de référence assez pertinentes pour équilibrer un bilan hydrologique au pas annuel.

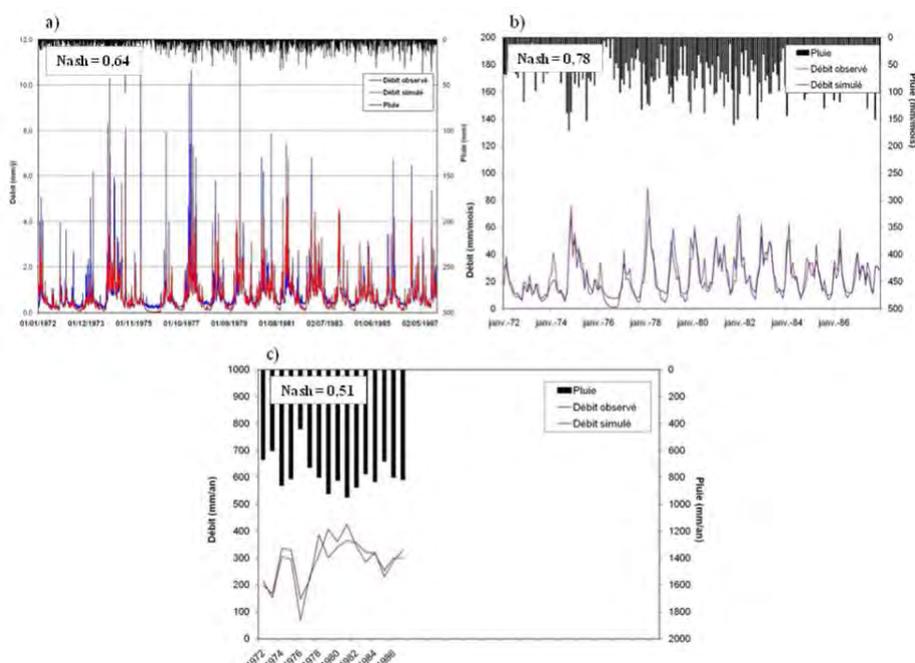


Figure 14 : Résultat du calage des modèles GR4J, GR2M et GR1A pour la station de Rai.

Le comportement hydrologique du bassin versant de la Risle semble être bien simulé par les modèles GR4J et GR2M malgré une tendance à respectivement sous-estimer ou surestimer légèrement les débits de base, et cela selon les années ou les stations considérées. Seul le modèle GR1A ne fonctionne pas de manière satisfaisante. Le caractère karstique du bassin ne semble donc pas dans ce cas altérer fortement les performances du modèle GR, connu par ailleurs pour sa versatilité.

Il ressort donc que ce type de modèle conceptuel semble être bien adapté pour la modélisation des flux hydriques à la fois sur la Risle dans son ensemble, et au niveau de sous-bassins, et ce malgré des degrés de soutien du débit par la nappe variables. Cette approche de modélisation pourra donc constituer une base adéquate en préalable à la modélisation des transferts d'éléments dissous ou particuliers.

III-1-2 Apport de la Risle dans l'embouchure de l'estuaire/ Comportement hydro-sédimentaire de la Risle

III-1-2-1 Site d'étude

La partie avale de la Risle est comprise entre le barrage de Pont-Audemer et son embouchure, zone de confluence entre la Risle et l'estuaire de la Seine. Cette partie de l'estuaire représente une longueur de 17 km. La marée dynamique remonte jusqu'au barrage de Pont-Audemer, alors que l'intrusion saline (variable en fonction du coefficient de marée) remonte jusque 4 km en amont de l'embouchure. D'un point de vue morphologique, la partie maritime de la Risle peut être divisée en 3 domaines :

- de Pont-Audemer jusqu'à Foulbec (13 km en aval de Pont-Audemer), la Risle présente un profil typique de rivière : peu ou pas de zones de dépôt latéral, les berges sont quasiment verticales (Figure 15A),
- de Foulbec à l'embouchure, les profils de berges présentent des pentes faibles associées à des zones latérales de dépôt de sédiment fin, de faible superficie (Figure 15B),
- à l'embouchure, les pentes sont variables, mais les zones de dépôt sont de superficie importante, y compris dans cette section de l'estuaire de la Seine (Figure 15C et D).



Figure 15 : Localisation des sites instrumentés dans la partie maritime de la Risle (aval du barrage de Pont-Audemer)

La mise en place d'instrumentation vise à comprendre les mécanismes dans ces 3 zones de la Risle. Dans la colonne d'eau, deux sites (Pont-Audemer et Foulbec) ont fait l'objet d'un suivi à l'aide de sondes multiparamétriques durant 3 cycles hydrologiques (Figure 15). La zone aval étant extrêmement dynamique n'a pas permis de mettre en place un suivi de la masse d'eau. Parallèlement un suivi sur les zones intertidales a été entrepris grâce à deux altimètres l'un implanté sur la zone d'embouchure et l'autre implanté sur la vasière la plus amont du système de la Risle (Foulbec). En raison du vandalisme des instruments, les enregistrements sont très

partiels pour ces zones. Toutefois, un suivi topographique à l'aide de piquets a été mis en place. Un suivi régulier (mensuel) permet de quantifier les flux sédimentaires en Risle.

III-1-2-1-1 Hydrodynamique dans la partie aval de la Risle

Durant la période étudiée (2009-2012), les débits moyens de la Risle (Pont-Audemer) et de la Seine (Barrage de Poses) sont respectivement de 11 et 330 m³.s⁻¹, avec des valeurs comprises entre 5 et 130 m³.s⁻¹ en Risle et de 180 et 1500 m³.s⁻¹ en Seine (Figure 16). D'un point de vue hydrologique, cette étude se déroule donc durant une période de crues de faibles intensités.

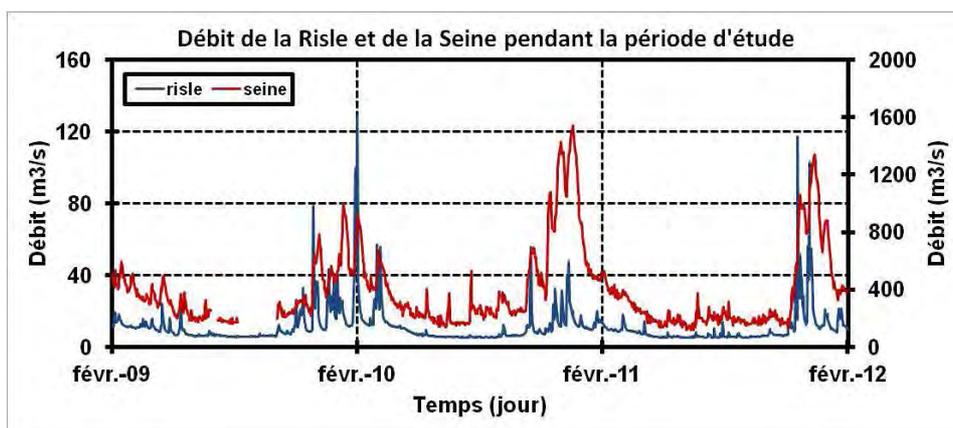


Figure 16 : Comparaison entre le débit de la Seine et le débit de la Risle

La contribution de la Risle au débit de la Seine (Figure 17), sur la période 2009-2012 est en moyenne de 3%, avec des valeurs qui oscillent entre 1 et 17%, les valeurs maximum de contributions ayant lieu lors des épisodes de crues, très souvent brefs mais intenses en Risle, ne durant rarement plus d'une semaine, avec une phase ascendante de crue très rapide, de l'ordre du jour.

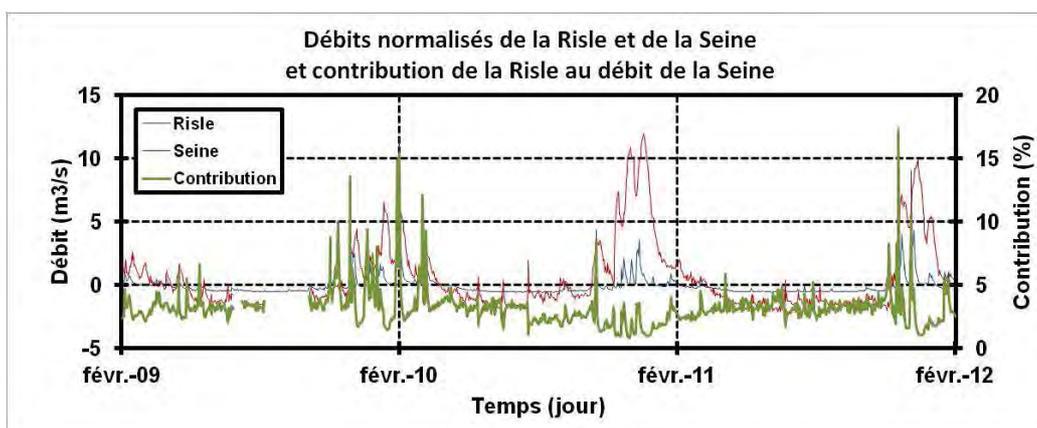


Figure 17 : Contribution de la Risle au débit de la Seine

Les mesures des hauteurs d'eau sur la Risle montrent que le système est de type macrotidal avec un marnage pouvant atteindre 7,2 m à l'embouchure en période de fortes vives-eaux (Tableau 4). L'onde de marée, qui se réfléchit ensuite sur le barrage de Pont-Audemer, possède un marnage de 2,25 m à cette même période. L'onde de marée se propage dans tout le système, y compris en période de mortes-eaux.

	Embouchure	Foulbec	Pont-Audemer
Grandes vives-eaux	7,2 m	3,2 m	2,25 m
Petites vives-eaux	6 m	2,5 m	1,75 m
mortes-eaux	2,6 m	1,5 m	0,75 m

Tableau 4 : Evolution longitudinale de l'amplitude de marée en Risle

La Figure 18 synthétise l'évolution longitudinale de l'hydrologie en Risle, avec une diminution de l'amplitude de marée et une augmentation de l'asymétrie de l'onde vers l'amont. Un gradient décroissant de l'aval vers l'amont est visible au niveau des vitesses de courant. Ces caractéristiques montrent que le fonctionnement de la partie maritime de la Risle est de type macrotidal.

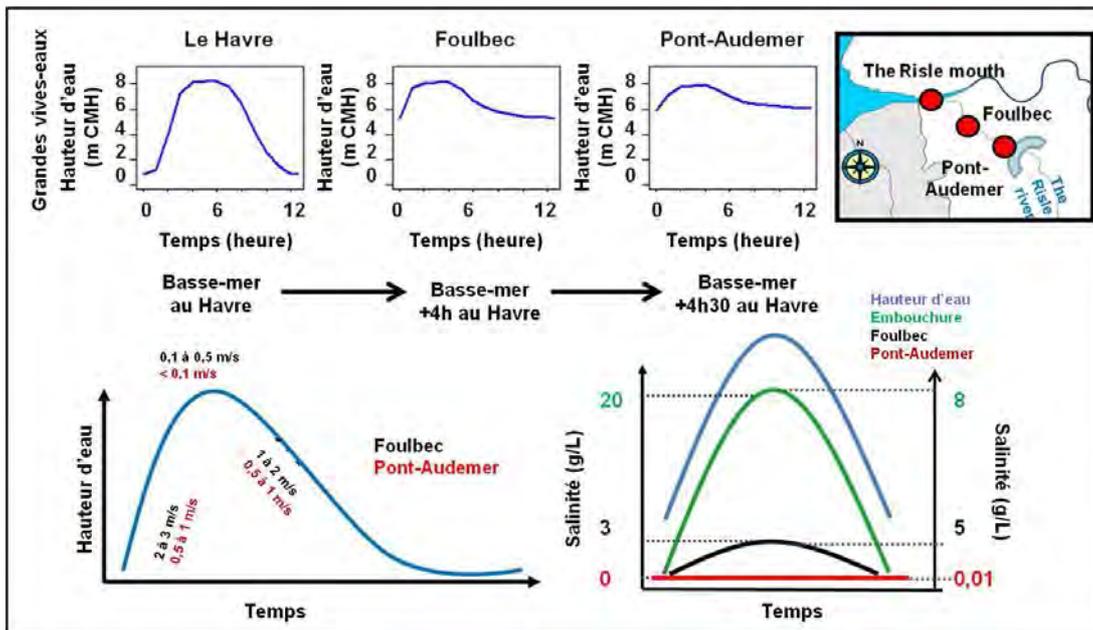


Figure 18 : Synthèse sur le comportement hydrologique longitudinal de la Risle maritime

D'un point de vue hydrodynamique, il est possible de distinguer deux sous-ensembles, avec un secteur amont localisé entre Pont-Audemer et Foulbec et un secteur aval situé entre Foulbec et l'embouchure.

III-1-2-1-2 Les apports d'eau marine en Risle

Les mesures de salinité à l'amont (Pont-Audemer) montrent l'absence d'eau marine (zone influencée uniquement par la marée dynamique). En revanche, les acquisitions réalisées à Foulbec montrent que la partie aval de la Risle est soumise à l'influence d'eau saumâtre provenant de l'estuaire de la Seine. En période de crue, en raison de l'augmentation des débits fluviaux, l'enregistrement de Foulbec ne montre pas de présence d'eau saumâtre : l'intrusion est localisée en aval de Foulbec. En plus de ce contrôle par le cycle hydrologique, un fort contrôle tidal s'exerce sur la salinité. En période d'étiage, la présence d'eau saumâtre ne se fait qu'en période de vives-eaux, avec des valeurs deux fois plus importantes lors des marées de grandes vives-eaux. En mortes-eaux, l'intrusion saline ne remonte pas jusqu'à Foulbec (Figure 19).

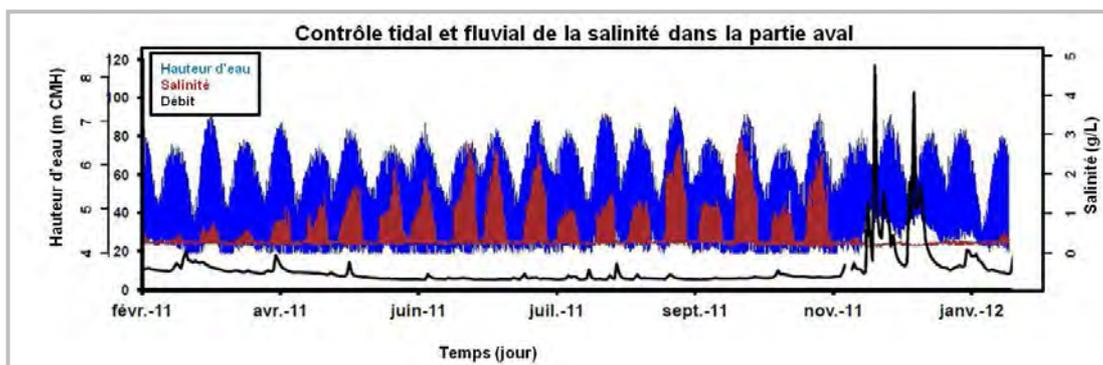


Figure 19 : Variabilité de la salinité à Foulbec sur la période d'étude

III-1-2-1-3 Evolution de la turbidité : dans la partie aval de la Risle

Les Figure 20 et Figure 21 montrent respectivement le contrôle saisonnier et tidal de la turbidité. Le contrôle saisonnier est lié au cycle hydrologique. En raison de l'apport d'eau douce en période de crue, la turbidité enregistrée à Foulbec est du même ordre de grandeur que celles enregistrée à Pont-Audemer. La période de crue, comme observée en Décembre 2011/Janvier 2012, s'oppose clairement à l'alimentation de la zone amont par le bouchon vaseux. En période d'étiage, l'alimentation en particules provient de l'aval de la Risle, elle est contrôlée principalement par les coefficients de marée. Lors des grandes vives-eaux, les marées sont plus importantes et permettent une remontée des particules de plusieurs kilomètres. Lors des périodes de mortes-eaux, cette remontée se fait uniquement entre Foulbec et l'embouchure. Avec la présence du bouchon vaseux en Risle, les concentrations en MES dans le secteur aval de la Risle peuvent atteindre des valeurs de 5 g.L^{-1} en période de grandes vives-eaux.

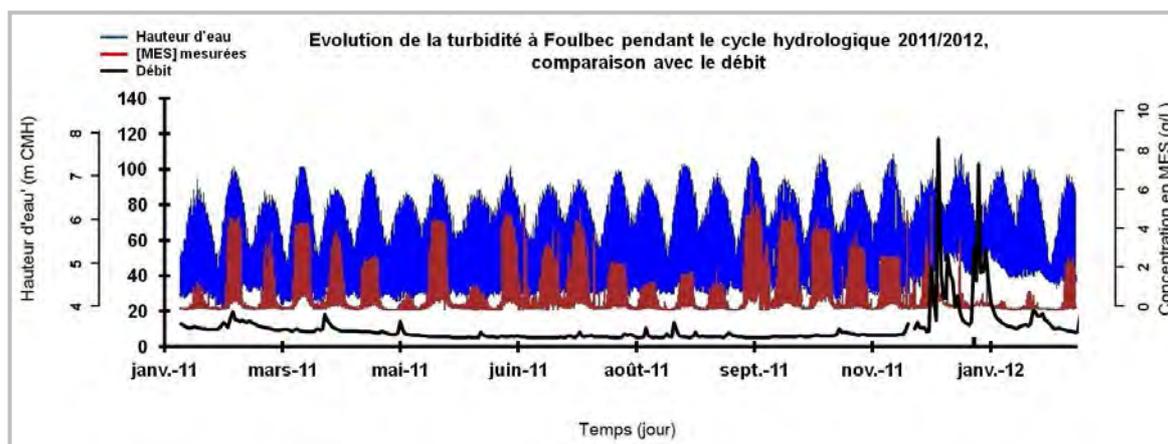


Figure 20 : Contrôle saisonnier de la turbidité dans la partie aval de la Risle

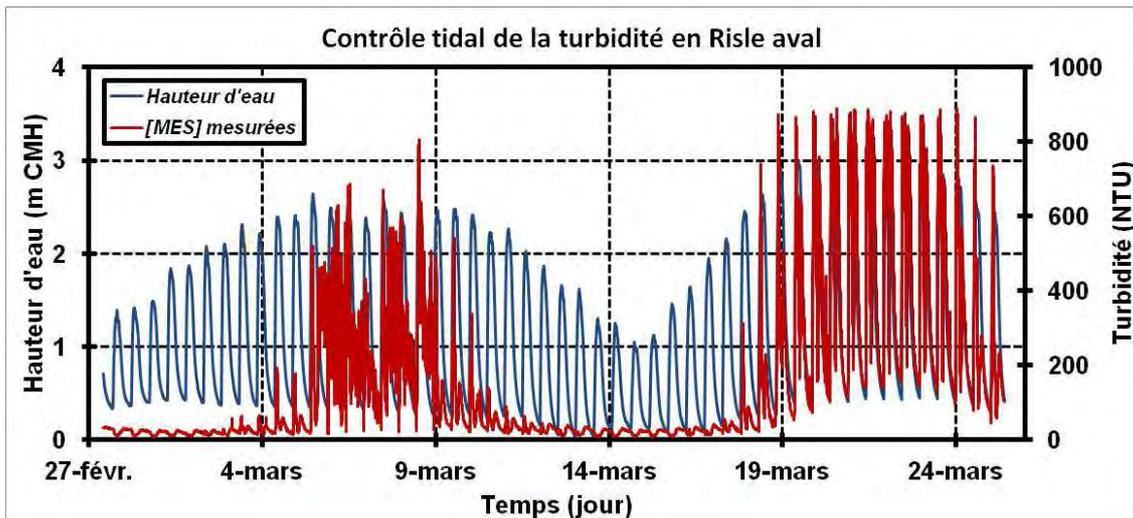


Figure 21 : Variabilité tidale de la turbidité en Risle

III-1-2-1-4 Evolution de la turbidité dans la partie amont de la Risle

Les valeurs de turbidité dans la partie amont de la Risle sont faibles (de l'ordre de 20 mg.L^{-1}). Le suivi d'un cycle tidal en période de vives-eaux montre une quasi-absence du contrôle de la marée sur la turbidité dans cette partie amont (Figure 22).

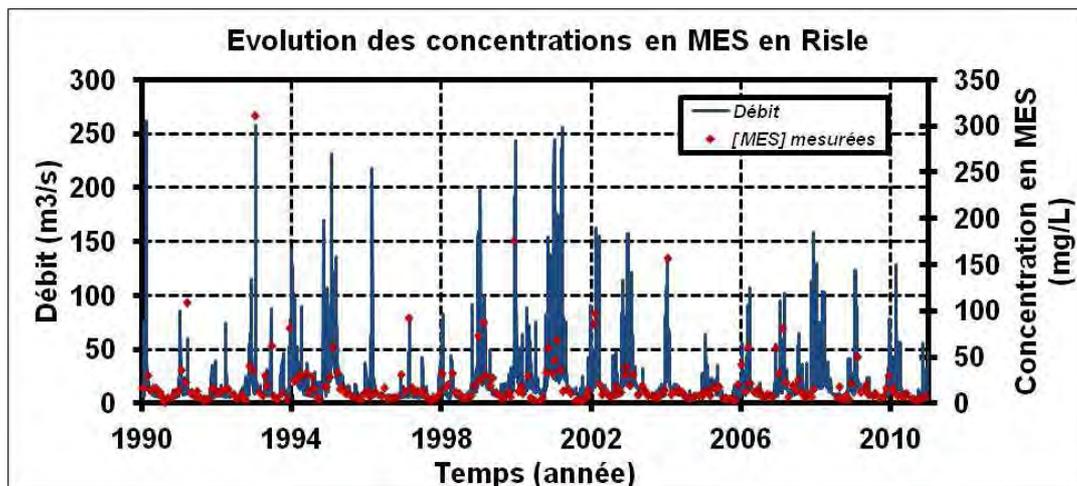


Figure 22 : Concentrations en MES en Risle (données DREAL)

En complément des mesures de la sonde multiparamétrique, des prélèvements bimensuels réalisés à l'amont de la Risle permettent de proposer une corrélation entre les débits liquides et les débits solides de la Risle (Figure 23).

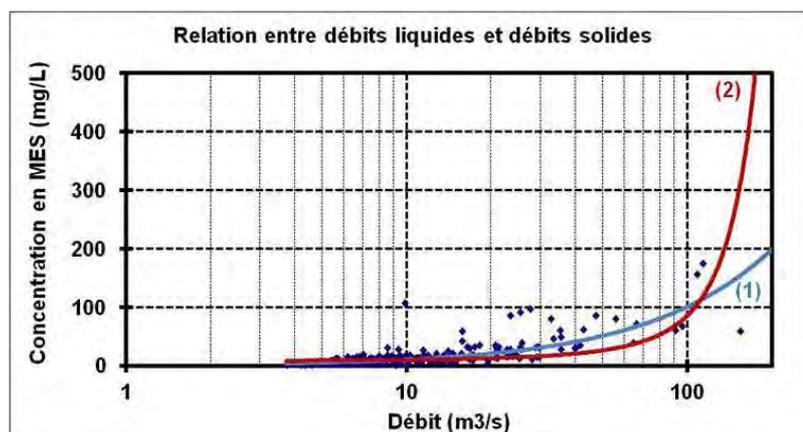


Figure 23 : Relation entre les débits liquides et les débits solides // (1) linéaire $CMES = 1,0605 \cdot Q + 2,1863$ avec $R^2 = 0,73$ // (2) $\exp CMES = 8,11^{e(0,0236 \cdot Q)}$ avec $R^2 = 0,38$

En se basant sur la relation linéaire entre les débits liquides et les débits solides en Risle, il est possible de réaliser une chronique de turbidité en Risle (Figure 24). Contrairement à la Seine, les plus fortes concentrations en MES sont synchrones lors des fortes crues. Cette différence peut être expliquée par la différence d'inertie entre le bassin versant de la Seine, d'une surface beaucoup plus importante que celui de la Risle, qui, du fait de sa surface, est plus réactif.

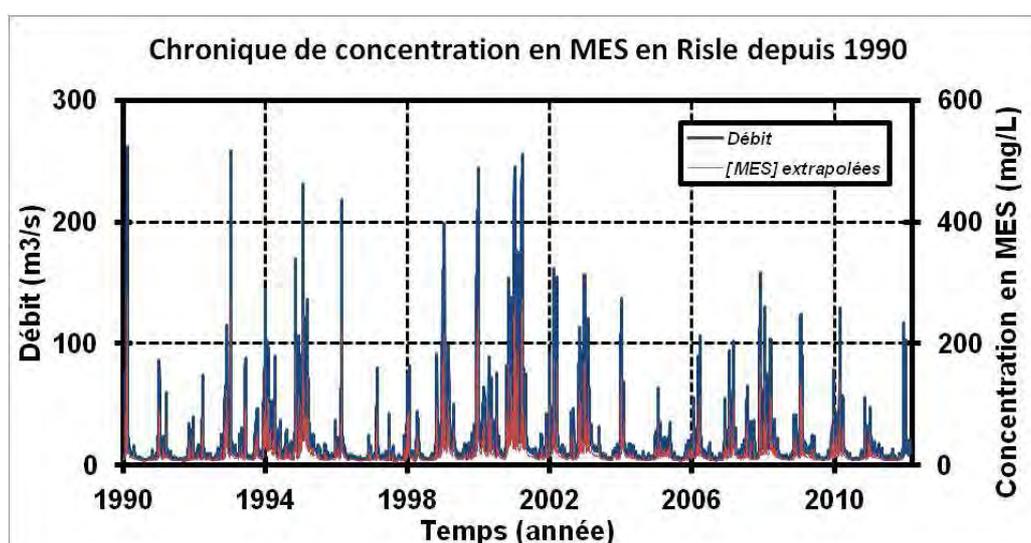


Figure 24 : Extrapolation des concentrations en MES en Risle à partir de la corrélation entre les débits liquides et les débits solides

Au final, la partie maritime de la Risle peut être comparée à un estuaire macrotidal : deux sous-ensembles sont à distinguer, une partie amont, entre Pont-Audemer et Foulbec avec les caractéristiques d'un estuaire fluvial (contrôle par le débit de la Risle, influence de la marée, eau douce et faibles concentrations en MES de l'ordre de 20 mg.L^{-1}) et une partie aval allant de Foulbec à la confluence entre la Seine et la Risle, qui peut être assimilée à un estuaire moyen (forçage tidal dominant, influence du débit de la Risle en période de crue, mélange eau douce / eau salée, masse turbide importante pouvant être comparée à un bouchon vaseux, qui est en réalité un piégeage d'une partie du bouchon vaseux de la Seine lors du flot).

III-1-2-1-5 Flux sédimentaires

Les apports amont

La chronique acquise au cours de l'étude permet l'extraction de flux annuel en Risle (Tableau 5). Les volumes exportés les plus importants sont rencontrés en période de crues de fortes intensités. Ces années coïncident avec les années où le flux annuel de MES est maximal en Seine (e.g. l'année hydrologique 2000-2001). La contribution de la Risle peut atteindre 6 % des apports en MES à Poses, la majeure partie de ces apports étant réalisés en période de crue.

Période*	Flux calculé en Risle	Flux calculé en Seine	Flux mesuré en Seine**	% Contribution de la Risle
1996-1997	4 200	430 000	518 000	0,8
1997-1998	7 900	525 000	503 000	1,6
1998-1999	29 000	923 000	887 000	3,3
1999-2000	50 000	1 202 000	1 077 000	4,6
2000-2001	77 000	2 511 738	1 297 648	5,9
2001-2002	17 000	1 184 000	1 289 000	1,3
2002-2003	30 000	780 000	731 000	4,1

Tableau 5 : Flux annuels en tonnes de MES par an en Risle et contribution par rapport aux apports particuliers de la Risle. *Flux annuel calculé du 01/09 au 31/08. **Les données manquantes ont été extrapolées.

Pour la période d'étude (2009-2012), le flux annuel moyen est de 5 700 tonnes.an⁻¹ de MES en provenance du bassin versant de la Risle (Tableau 6), soit un taux d'érosion moyen du bassin versant de 2 tonnes / km² / an. Ces tonnages peuvent sembler faibles, mais ces dernières années ont été faiblement intenses d'un point de vue hydrologique, les faibles précipitations ont entraîné un faible ruissellement et donc de plus faibles apports particuliers.

Période*	Flux calculé en Risle
2009-2010	5 700
2010-2011	4 800
2011-2012	6 600

Tableau 6 : Flux annuels en tonnes de MES par an en Risle durant la période d'étude

Les zones latérales de dépôt

Différentes zones de dépôt de matériel fin sont présentes en Risle : (i) une vasière déconnectée de la Risle à l'aval de la confluence dont la dynamique est liée au bouchon vaseux et à la marée (dépôts allant jusqu'à 40 cm observés en vives-eaux, lors de l'étiage), (ii) des vasières intertidales connectées à la Risle et localisées sur le premier kilomètre de la Risle et (iii) des dépôts latéraux vaseux au niveau des berges (d'une largeur métrique jusqu'à Foulbec). Ce stock de matériel fin représente au total une surface de 50 000 m².

Les processus d'érosion et de sédimentation sont difficilement quantifiables avec les outils actuels et leurs limitations techniques. Sur la période d'étude, les observations ont permis de déterminer la Risle comme une filandre fortement en érosion. Peu de périodes de dépôts ont été acquises, mais elles restent relativement importantes avec des dépôts en période de vives-eaux qui peuvent atteindre 10 à 40 cm, en particulier à l'embouchure. Le principal constat réalisé est l'érosion très présente, brève et intense avec des effondrements de blocs vaseux pluri-métriques à proximité de l'embouchure. Les dépôts latéraux en Risle montrent une érosion de près de 10 centimètres sur toutes les surfaces envasées. Ce constat d'érosion est notamment visible à l'embouchure avec des marques d'érosion pluri-métriques faisant état d'une déstabilisation des dépôts (Figure 25 et Figure 26). Une quantification de ces érosions permet d'estimer un volume de 10 000 tonnes de vases érodées durant le cycle hydrologique 2011/2012.



Figure 25 : Evolution du stock de particules fines au niveau du canal de retour de l'embouchure de la Risle (A Janvier 2011 // B Mai 2011 // C Septembre 2011 // D Janvier 2012).



Figure 26 : Marques d'érosion sur une vasière intertidale de l'embouchure

Le piégeage du bouchon vaseux

Les fortes concentrations en MES à l'aval, de l'ordre du gramme par litre, ne peuvent être expliquées par les apports continentaux transportés par la Risle, ces teneurs sont principalement liées au piégeage d'une partie du bouchon vaseux de la Seine par la Risle lors du flot. Les données acquises montrent que ce volume piégé fluctue entre 5 000 tonnes (lors des marées de mortes-eaux) à 25 000 tonnes (lors des marées de grandes vives-eaux).

Conclusion

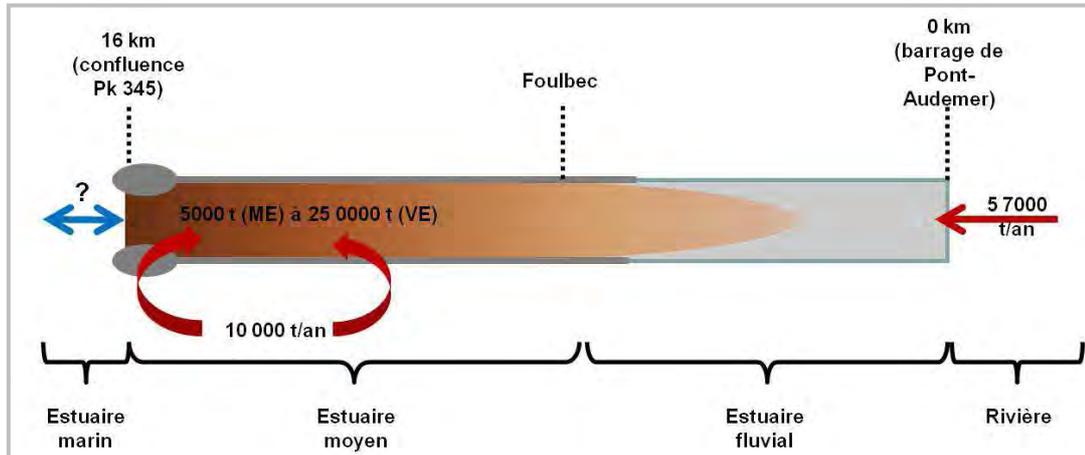


Figure 27 : Bilan des apports en MES à l'estuaire

Durant la période d'étude, les apports moyen annuels en MES par la Risle sont estimés à 5 700 tonnes.an⁻¹ (Figure 27). Cette faible valeur pouvant être expliquée par des débits moyens relativement faibles. La principale source de MES semble être liée à l'érosion des dépôts latéraux vaseux (berges et vasières). Ces érosions sont brèves et massives avec des arrachements de blocs vaseux pluri-métriques. Les observations réalisées au cours du cycle hydrologique 2011/2012 permettent de quantifier cet apport à hauteur de 10 000 tonnes.an⁻¹. Il y a donc un disponible sédimentaire de 15 000 tonnes en Risle. Si l'on quantifie le bouchon vaseux de la Risle, son volume oscille entre 5 000 et 25 000 tonnes, respectivement en mortes-eaux et grandes-vives-eaux. Ce volume étant supérieur aux apports des différentes sources en Risle (apports amont et remise dans le système). D'un point de vue sédimentaire, il existe une forte connexion la partie aval de la Risle et la Seine.

Apports monodisciplinaires

Volet chimie

**Contamination des eaux en résidus médicamenteux le long d'un
continuum hospitalier et agricole
(UMR 5255 LPTC)**

III-2 Contamination des eaux en résidus médicamenteux le long d'un continuum hospitalier et agricole (UMR 5255 LPTC)

III-2-1 Continuum hospitalier

III-2-1-1 Etude des classes thérapeutiques spécifiques à ces travaux

L'analyse des échantillons provenant du continuum hospitalier fait ressortir une contamination importante par les antibiotiques et les β -bloquants. Les anti-VIH sont également retrouvés mais essentiellement en entrée de station d'épuration (Figure 28 et Figure 29).

Dans un premier temps, la contamination par les 5 classes thérapeutiques de chacune des matrices du continuum a été étudiée. Les échantillons provenant des effluents hospitaliers sont majoritairement contaminés par les antibiotiques, été comme hiver. En effet, la concentration totale en antibiotiques des effluents hospitaliers est de 48,7 $\mu\text{g/L}$ en été et de 343,4 $\mu\text{g/L}$ en hiver alors que celles des β -bloquants sont respectivement de 0,7 $\mu\text{g/L}$ et de 1,5 $\mu\text{g/L}$ et celles des autres classes thérapeutiques sont inférieures à la centaine de ng/L . Les échantillons provenant des effluents de la maison de retraite sont majoritairement contaminés par les antibiotiques en hiver (81,3 $\mu\text{g/L}$) et par les β -bloquants en été (8,8 $\mu\text{g/L}$). L'entrée de STEP est fortement marquée par une contamination en β -bloquants (11,7 $\mu\text{g/L}$ en été et 7,1 $\mu\text{g/L}$ en hiver) mais les antibiotiques (5,7 $\mu\text{g/L}$ en été et 5,9 $\mu\text{g/L}$ en hiver) et les anti-VIH (2,1 $\mu\text{g/L}$ en été et 0,3 $\mu\text{g/L}$ en hiver) sont également très présents. La sortie de STEP et l'eau de surface impactée par ce rejet sont contaminées principalement par les antibiotiques (ex. : sortie de STEP \approx 2,5 $\mu\text{g/L}$) et les β -bloquants (ex. : sortie de STEP \approx 3,8 $\mu\text{g/L}$) bien que les anti-VIH (ex. : sortie de STEP \approx 0,2 $\mu\text{g/L}$) soient également détectés dans ces matrices.

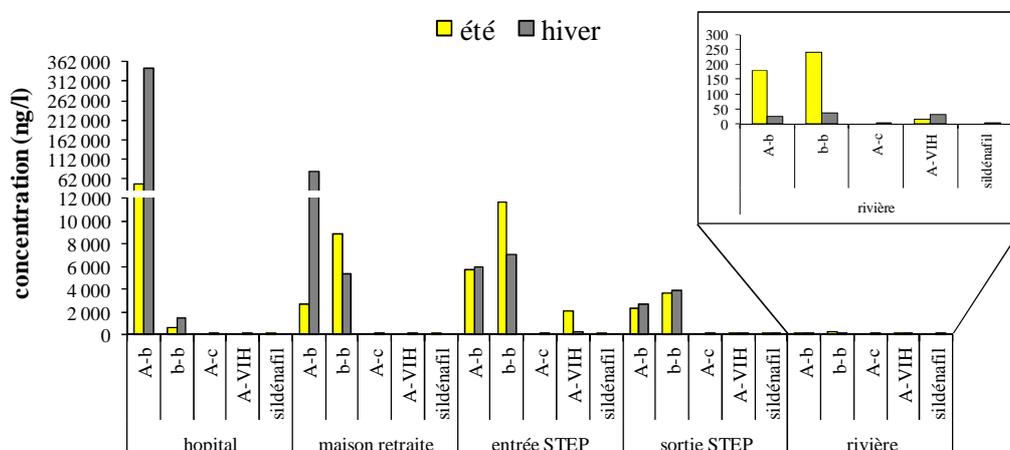


Figure 28 : Présence des différentes classes thérapeutiques dans les 5 matrices analysées dans le continuum hospitalier (A-b : antibiotiques, b-b : β -bloquants, A-c : anticancéreux, A-VIH : anti-VIH).

Dans un second temps, l'évolution de la contamination le long du continuum au sein de chacune des classes thérapeutiques a été étudiée (Figure 29). De plus, en comparant les niveaux de contamination de l'effluent hospitalier, de l'effluent de la maison de retraite avec celui de l'entrée de la station d'épuration, l'origine de la contamination peut être identifiée.

- Au sein des antibiotiques, l'effluent hospitalier est plus contaminé que celui de la maison de retraite et est plus contaminé que les eaux usées en entrée de STEP, en été comme en hiver (Figure 29). En conséquence, la contamination de l'eau par les antibiotiques provient majoritairement des rejets hospitaliers. Les concentrations hivernales dans les effluents de l'hôpital (343,4 $\mu\text{g/L}$) et de la maison de retraite (81,3 $\mu\text{g/L}$) sont nettement plus importantes que

les concentrations estivales (hôpital : 48,7 µg/L, maison de retraite : 2,7 µg/L). Cette observation semble logique au regard du mode d'utilisation de ces médicaments. En revanche, la différence saisonnière est inversée dans les eaux de la rivière (été : 180 ng/L, hiver : 24 ng/L) probablement à cause d'une dilution moins importante en été en raison du débit plus faible. Dans les eaux usées en entrée et en sortie de STEP, la différence saisonnière n'est pas marquée. La concentration moyenne en antibiotiques est de 5,8 µg/L en entrée et de 2,5 µg/L en sortie de STEP. Une diminution de la contamination globale en antibiotiques des eaux usées suite à leurs passages dans la STEP est donc observée. Cependant, tous les antibiotiques et par conséquent toutes les familles d'antibiotiques ne sont pas éliminés de la même façon dans la STEP étudiée (Figure 30). Les β-lactames, les tétracyclines et le métronidazole (autres Ab) sont bien éliminés (abattements > 75 %). Contrairement aux résultats obtenus lors de l'étude du continuum Hérault et à ceux obtenus par Castiglioni *et al.* (2006), les fluoroquinolones sont mieux éliminés en hiver (abattement > 65 %) qu'en été (abattement < 35 %). Quelle que soit la saison, l'élimination des macrolides et des sulfonamides dans la STEP est très variable avec des abattements respectifs compris entre -74 % et 91% et entre -2341 % et 71%. La valeur de "- 2341 %" correspond à l'abattement de la sulfapyridine en été. Deux hypothèses peuvent expliquer ce chiffre : i) le type d'échantillonnage mis en œuvre puisqu'en été le bidon collecteur n'était pas rempli en entier (15 litres pour une contenance de 25 litres); et ii) la variabilité analytique de la mesure car d'un point de vue général, les concentrations mesurées en entrée (0,4 ng/L) et en sortie (9 ng/L) sont du même ordre de grandeur. De fortes variations avaient également été observées pour les sulfonamides par Castiglioni *et al.* (2006) ou Gobel *et al.* (2007). Pour les macrolides, des abattements proches de 90 % ont été calculés au cours de cette étude.

- Dans le cas des β-bloquants, la contamination des effluents de la maison de retraite est plus importante que celle des effluents hospitaliers (Figure 29). Néanmoins, les β-bloquants sont d'avantage présents en entrée de STEP que partout ailleurs ce qui signifie que la maison de retraite est la principale source de contamination de l'eau mais que les eaux usées d'origine urbaine y contribuent aussi. Comme pour les antibiotiques, les concentrations sont plus faibles en sortie de STEP qu'en entrée. Les β-bloquants sont donc en partie éliminés par les traitements appliqués dans la STEP étudiée (Figure 30). Cependant, l'élimination est variable avec des taux d'abattement compris entre -197 % et 88 %. Comme dans les résultats de Gabet-Giraud *et al.* (2010), l'abattement du propranolol est faible, 13 % en été et 28 % en hiver et celui du métoprolol est variable (-197 % été, 58 % hiver). Comme pour la sulfapyridine, la valeur de "-197 %" pour le métoprolol en été peut s'expliquer par l'échantillonnage pratiqué en cette saison. Les différences saisonnières de concentrations sont moins marquées que pour les antibiotiques, ce qui semble cohérent avec les modes d'usage de ces composés. Néanmoins, l'eau du point « rivière » est plus contaminée en été (240 ng/L) qu'en hiver (37 ng/L), probablement pour la même raison que pour les antibiotiques.

- Contrairement aux antibiotiques et aux β-bloquants, les concentrations en anticancéreux et anti-VIH sont plus fortes en entrée de STEP que dans les effluents des établissements de soin (Figure 29). La contamination provient donc majoritairement des eaux usées d'origine urbaine. De plus, l'hôpital ne dispose pas d'un service de cancérologie ce qui explique les faibles concentrations en anticancéreux dans les effluents des établissements de soin. Le méthotrèxate et le tamoxifène sont les 2 anticancéreux qui ont été détectés en entrée de STEP à des concentrations respectivement de 22 ng/L et 4 ng/L. Le tamoxifène a également été détecté en sortie de STEP à une concentration de 2 ng/L. Ces 2 molécules semblent donc éliminées par les traitements appliqués dans la STEP. Les anti-VIH ont été analysés à des concentrations plus fortes en été (2138 ng/L) qu'en hiver (302 ng/L) en entrée de STEP mais à des concentrations équivalentes en sortie (205 ng/L été, 188 ng/L hiver). Ils ont également été détectés dans les eaux du cours d'eau mais les concentrations hivernales (30 ng/L) sont plus fortes que celles estivales (15 ng/L). L'élimination des anti-VIH dans la STEP est bonne avec des abattements compris entre 57 % et 100 % selon les composés (Figure 30). Par exemple, l'abacavir et la lamivudine sont éliminées respectivement 97 % et 98 % en été. Ces résultats sont en accord avec ceux de Prasse *et al.* (2010) qui trouvent des taux d'élimination supérieurs à 99 % et à 76 % pour ces 2 mêmes molécules. Par ailleurs, Prasse *et al.* (2010) ont mesurés des concentrations en névirapine plus fortes en sortie qu'en entrée de STEP et dans cette étude, la névirapine n'a été dosée qu'en sortie de STEP. Ces 2 résultats vont dans le même sens.

- Le sildénafil a majoritairement été dosé en été et à un niveau équivalent entre les effluents des établissements de soin et les eaux usées en entrée de STEP (Figure 29). Il semblerait donc que le sildénafil provienne des eaux usées d'origine urbaine mais aussi des eaux usées des centres de soin. Il n'a été retrouvé qu'à de faibles concentrations (< 5 ng/L) en sortie de STEP. Son élimination a été estimée à 83 % (Figure 30). Le sildénafil est donc bien éliminé dans les STEP ce qui est en accord avec Nieto *et al.* (2010a) qui ont estimé son élimination à 68 %.

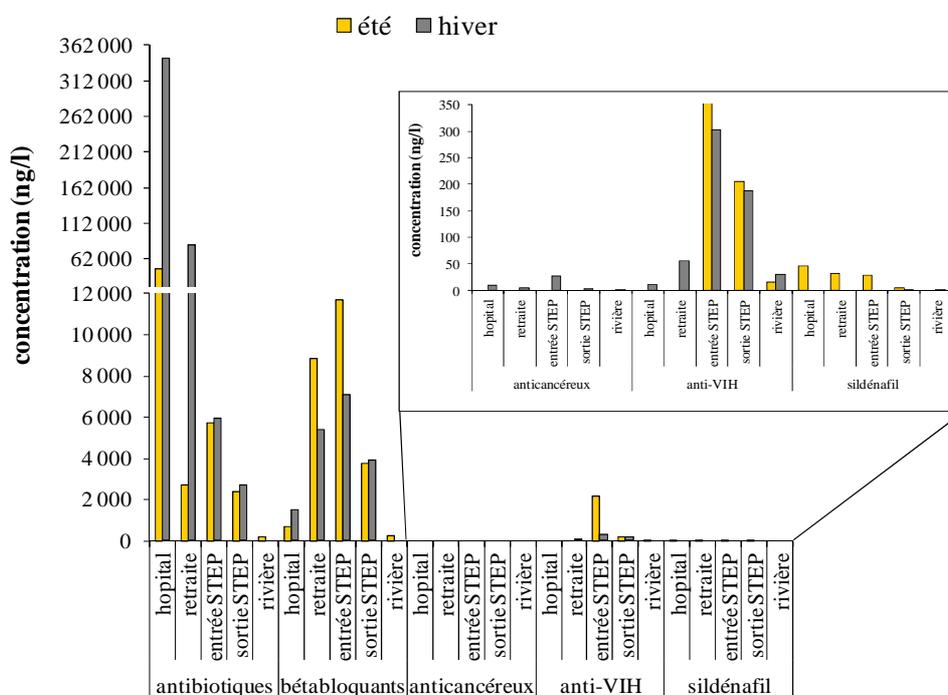


Figure 29 : Présence et niveau de contamination des antibiotiques, β -bloquants, anticancéreux, anti-VIH et sildénafil, en été et en hiver le long d'un continuum hospitalier.

Les résultats d'analyses globales du continuum hospitalier (Figure 31) montrent que la contamination des effluents des centres de soins (hôpital et maison de retraite) est bien plus importante en hiver qu'en été. Ce sont majoritairement les antibiotiques qui sont responsables de cette tendance. A l'inverse, la contamination des eaux usées en entrée de STEP est plus importante en été qu'en hiver. C'est la dilution des eaux usées en hiver par les eaux de pluies qui explique ce constat. En été comme en hiver, bien que les tendances individuelles soient variables, de façon globale, les eaux en entrée de STEP sont plus contaminées qu'en sortie. Il y a donc une bonne efficacité du traitement. La contamination des eaux de surface est faible. Cependant, elle est plus forte en été qu'en hiver en raison de la plus faible dilution du rejet de STEP dans la rivière en été. En conclusion, une diminution globale de la contamination est observée le long du continuum hospitalier.

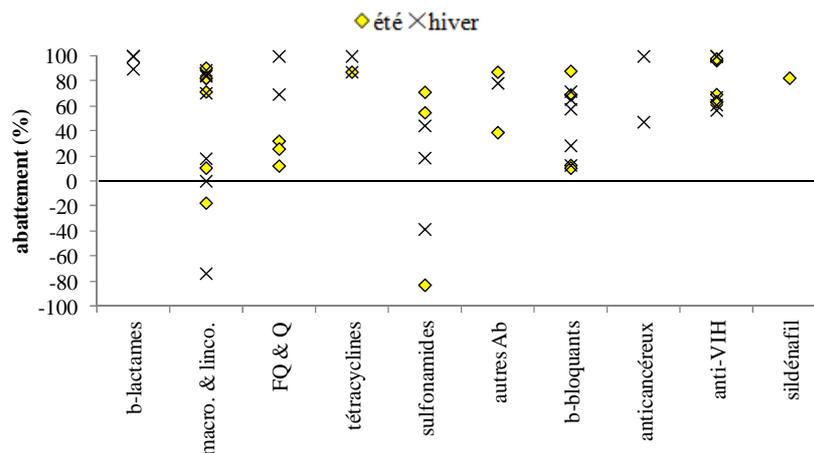


Figure 3

Figure 30 : Abattements estivaux et hivernaux des différentes molécules au sein des différentes classes thérapeutiques et famille d'antibiotiques (les abattements inférieurs à - 100 % apparaissent sur le graphique au niveau de la ligne -100 %) (macro. & linco. : macrolides et lincosamides, FQ & Q : fluoroquinolones et quinolones, autres Ab : autres antibiotiques).

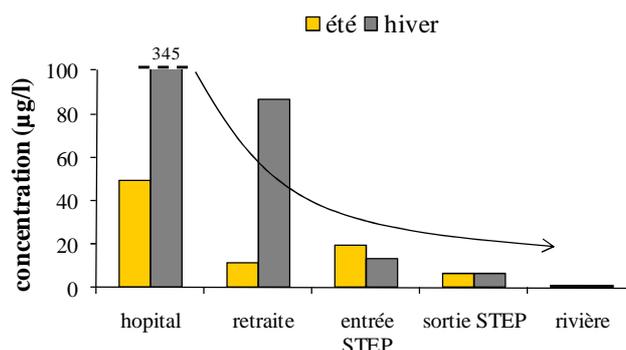


Figure 31 : Concentration totale ($\Sigma 78$) en molécules pharmaceutiques le long du continuum hospitalier, comparaison été/hiver.

III-2-1-2 Etudes des autres classes thérapeutiques

Au cours de ce projet « FLASH », 21 molécules appartenant à 5 autres classes thérapeutiques (analgésiques et AINS, antiépileptiques et antidépresseurs, bronchodilatateurs, hypolipémiants et stimulants) ont été analysées. Dans les divers échantillons prélevés le long du continuum hospitalier, la classe des analgésiques et AINS est la plus abondante avec des concentrations qui peuvent atteindre les 2,7 mg/L dans les rejets des établissements de soin en été (Figure 32). Hiver comme été, les stimulants (caféine et théophylline) représentent la deuxième classe la plus abondante dans les effluents hospitaliers, dans les eaux usées en entrée de STEP et dans les eaux de la rivière. En hiver, c'est également la deuxième classe la plus abondante dans les effluents de la maison de retraite alors qu'en été, ce sont les antiépileptiques et les antidépresseurs. Les bronchodilatateurs apparaissent aussi comme des composés participant à la contamination des eaux usées en sortie de maison de retraite, particulièrement en été. En sortie de STEP, les antiépileptiques et les antidépresseurs participent presque autant à la contamination des eaux que les analgésiques et AINS. Dans la rivière, les antiépileptiques et les antidépresseurs constituent la troisième classe qui contribue à la contamination de l'eau.

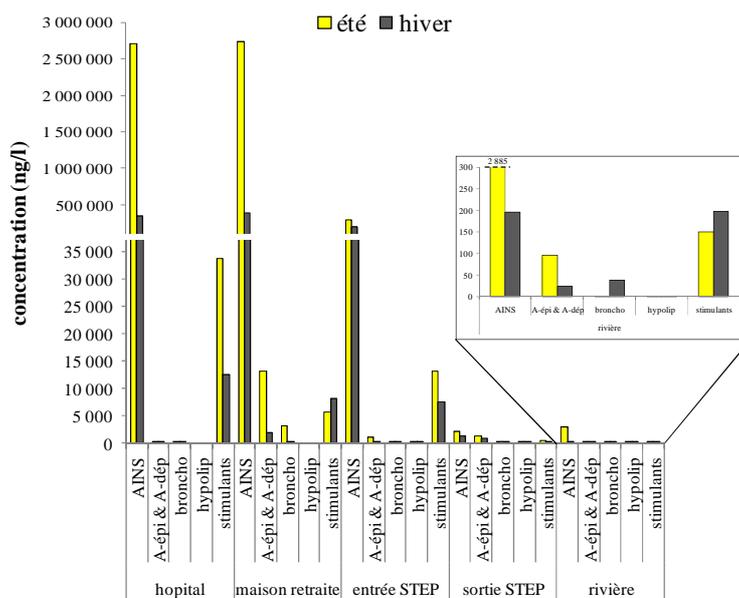


Figure 32 : Présence des différentes classes thérapeutiques dans les 5 matrices analysées dans le continuum hospitalier (AINS : analgésiques et AINS, A-épi. & A-dép. : antiépileptiques et antidépresseurs, broncho. : bronchodilatateurs, hypolip. : hypolipémiants).

L'évolution de la contamination le long du continuum au sein de chacune des classes thérapeutiques a ensuite été étudiée (Figure 33). Comme pour les premières classes thérapeutiques étudiées, en comparant les niveaux de contamination de l'effluent hospitalier, de l'effluent de la maison de retraite avec celui de l'entrée de la station d'épuration, l'origine de la contamination peut être identifiée.

- Avec des niveaux de concentration plus élevés dans les effluents hospitaliers (été : 2710,6 µg/L, hiver : 353,5 µg/L) et dans les effluents de la maison de retraite (été : 2733,5 µg/L, hiver : 394,6 µg/L) que dans les eaux usées en entrée de STEP (été : 287,5 µg/L, 194,9 µg/L), la contamination des eaux par les analgésiques et les AINS provient majoritairement des centres de soin. Les concentrations en sortie de STEP sont beaucoup plus faibles, quelques µg/L, qu'en entrée de STEP, quelques centaines de µg/L, traduisant ainsi une bonne élimination de ces composés dans les STEP. Ce qui est en accord avec les valeurs relevées dans la littérature (Figure 34). Dans la rivière, les analgésiques et AINS sont détectés à une concentration plus forte en été (2,9 µg/L) qu'en hiver (0,2 µg/L).

- Avec des concentrations plus fortes dans les effluents de la maison de retraite que dans les effluents hospitaliers ou dans les eaux usées en entrée de STEP, il peut être conclu que la contamination des eaux usées par les antiépileptiques et les antidépresseurs provient de la maison de retraite. En été la concentration en antiépileptiques et antidépresseurs est sensiblement égale entre l'entrée (1,1 µg/L) et la sortie (1,2 µg/L) de STEP et en hiver, la concentration mesurée en sortie (0,8 µg/L) est plus forte que celle mesurée en entrée (0,3 µg/L). Ceci traduit une mauvaise élimination de ces composés dans la STEP, en particulier de la carbamazépine ce qui est en accord avec de nombreuses autres études (Ternes, 1998 ; Bendz *et al*, 2005 ; Castiglioni *et al*, 2006 ; Vieno *et al*, 2007 ; Kasprzyk-Hordern *et al*, 2009 ; Miège *et al*, 2009). Ces composés ont été retrouvés eux aussi à une concentration plus forte en été (97 ng/L) qu'en hiver (24 ng/L) dans les eaux de la rivière.

- Les bronchodilatateurs sont dosés à une concentration élevée (3 µg/L) dans les eaux usées de la maison de retraite alors qu'ils sont dosés à moins de 50 ng/L dans les effluents hospitaliers et en entrée de la STEP en été. En hiver, ils sont dosés à une concentration plus élevée dans les effluents hospitaliers (163 ng/L) que dans les effluents de la maison de retraite ou dans les eaux usées en entrée de STEP. Ceci traduit une origine par les centres de soin majoritaire et la différence été/hiver semble cohérente avec les modes d'usage de ces médicaments. En effet, en été, avec la chaleur, les difficultés respiratoires sont plus importantes, en particulier pour les personnes âgées, ce qui explique un usage plus grand des

bronchodilatateurs en cette saison à la maison de retraite. En été, leurs concentrations sont plus importantes en entrée (49 ng/L) qu'en sortie (22 ng/L) de STEP ce qui signifie que ces composés sont bien éliminés. Ceci est en accord avec les résultats de Kasprzyk-Hordern *et al.* (2009). En revanche, en hiver, les concentrations sont plus fortes en sortie (172 ng/L) qu'en entrée de STEP (25 ng/L) ce qui signifie que les composés ne sont pas éliminés dans la STEP ce qui est en accord avec les résultats de Castiglioni *et al.* (2006). En effet, ces auteurs trouvent que le salbutamol n'est pas éliminé dans les STEP en hiver alors qu'il est un peu éliminé en été (abattement : 12 %).

- Le gemfibrozil (hypolipémiant) n'a pas été dosé ni en été ni en hiver dans les eaux usées provenant des centres de soin. Sa présence en entrée de STEP provient donc uniquement des eaux usées urbaines. Ce composé est analysé à des concentrations similaires entre l'été et l'hiver et à des concentrations plus fortes en entrée (≈ 130 ng/L) qu'en sortie (≈ 20 ng/L) de STEP. Il est donc relativement bien éliminé dans la STEP ce qui est en accord avec les résultats de Ternes (1998), de Bendz *et al.* (2005), de Miège *et al.* (2009) et de Gros *et al.* (2010).

- Bien qu'ils soient dosés à des concentrations plus fortes dans les effluents hospitaliers que dans les effluents de la maison de retraite ou dans les eaux usées en entrée de STEP en été ; en hiver, les stimulants sont dosés à des concentrations équivalentes entre les 3 matrices. Leur origine est donc variée et ces composés proviennent des 3 sources évoquées. Leurs concentrations en sorties (0,1 - 0,5 $\mu\text{g/L}$) de STEP sont plus faibles qu'en entrée (7 - 13 $\mu\text{g/L}$) ce qui traduit une bonne élimination dans les STEP. Néanmoins ils sont dosés à des concentrations relativement importantes dans les eaux de surface (été : 151 ng/L, hiver : 198 ng/L).

Les résultats d'analyses globales du continuum hospitalier (Figure 31) montrent que la contamination des effluents des centres de soins (hôpital et maison de retraite) est plus importante en été qu'en hiver contrairement à ce qui avait été observé pour les premières classes thérapeutiques étudiées (Figure 31). Ce sont majoritairement les analgésiques et les AINS qui sont responsables de cette tendance. La différence de concentration entre l'été et l'hiver n'est presque plus marquée dans les eaux usées en entrée de STEP et elle disparaît en sortie de STEP ou dans les eaux de la rivière. Comme pour les autres classes thérapeutiques étudiées, en été comme en hiver, de façon globale, les eaux en entrée de STEP sont plus contaminées qu'en sortie, il y a donc une bonne efficacité générale du traitement bien qu'individuellement certaines molécules soient moins bien ou mal éliminées. La contamination des eaux de surface est faible. En conclusion, une diminution globale de la contamination est observée le long du continuum hospitalier.

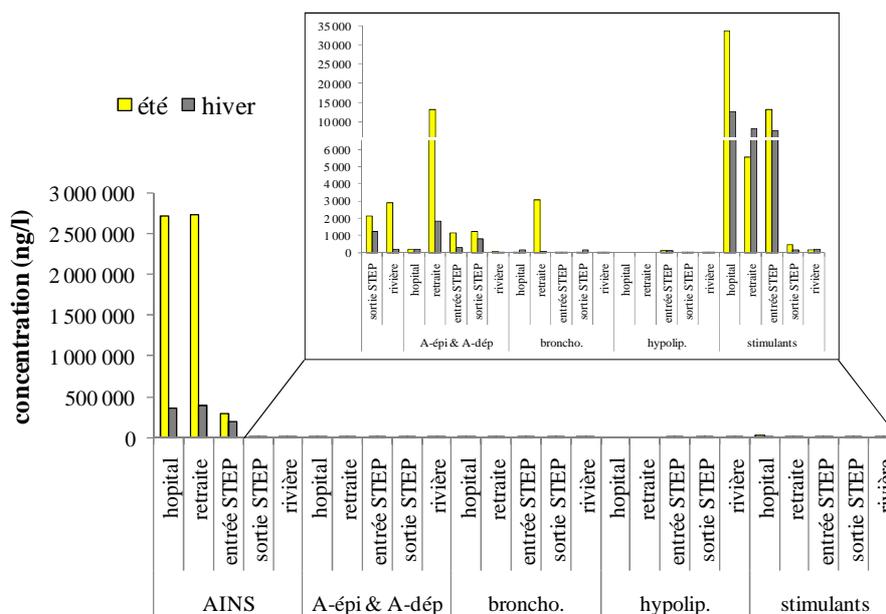


Figure 33 : Présence et niveau de contamination des analgésiques et AINS (AINS), des antiépileptiques et antidépresseurs (A-épi. & A-dép.), des bronchodilatateurs (broncho.), des hypolipémiants (hypolip.) et des stimulants, en été et en hiver le long d'un continuum hospitalier (retraite : maison de retraite).

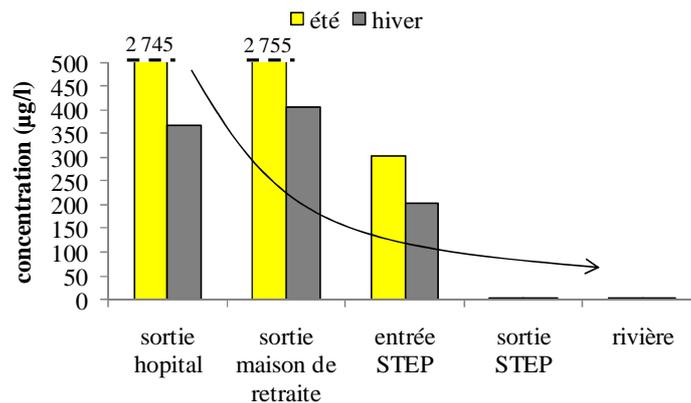


Figure 34 : Concentration totale ($\Sigma 21$) en molécules pharmaceutiques le long du continuum hospitalier, comparaison été/hiver.

III-2-1-3 Bilan toutes classes thérapeutiques confondues

En additionnant les concentrations mesurées pour l'ensemble des 99 composés analysés, la Figure 35 a été obtenue. Les concentrations estivales sont plus fortes que celles hivernales, particulièrement dans le cas des effluents des centres de soin. Néanmoins, quelle que soit la saison, les concentrations mesurées dans les effluents des centres de soin sont supérieures à celles mesurées en entrée de STEP, elles-mêmes supérieures aux concentrations totales mesurées en sortie de STEP. Les concentrations mesurées en sortie de STEP sont aussi plus fortes que celles mesurées dans les eaux de surface. En conclusion, une diminution de la contamination le long du continuum hospitalier a été observée.

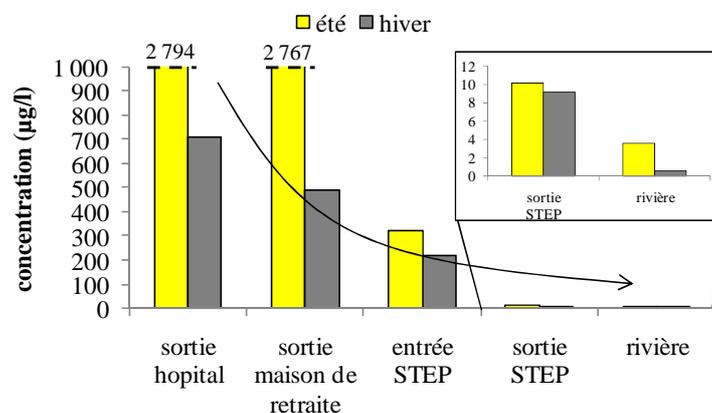


Figure 35 : Concentration totale ($\Sigma 99$) en molécules pharmaceutiques le long du continuum hospitalier, comparaison été/hiver.

Par ailleurs, la contribution de chacune des 10 classes thérapeutiques à la contamination des eaux a été étudiée (Figure 36).

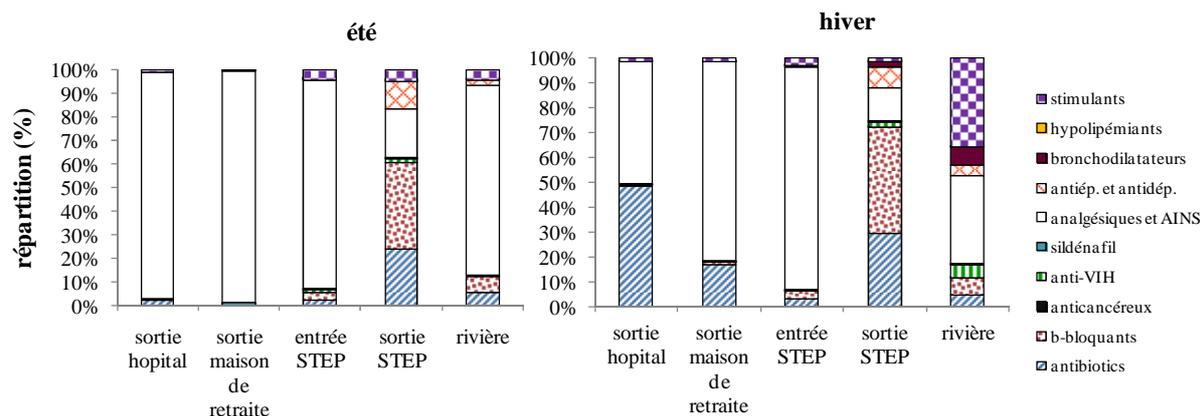


Figure 36 : Contribution des 10 classes thérapeutiques étudiées à la contamination totale des eaux le long du continuum hospitalier.

- En été, à l'exception des effluents de la station d'épuration, les analgésiques et AINS sont responsables de la contamination des eaux à plus de 80 %. Les antibiotiques, les β -bloquants, les anti-VIH et les stimulants contribuent légèrement ($\approx 10\%$) à la contamination des eaux usées en entrée de STEP. En sortie de STEP, la contamination des eaux se répartit entre les β -bloquants (37 %), les antibiotiques (23 %), les analgésiques et AINS (21 %) et les antiépileptiques et antidépresseurs (12 %). Enfin, les antibiotiques et les β -bloquants participent respectivement à hauteur de 5 % et 7 % à la contamination des eaux de surface.

- En hiver, les analgésiques et AINS se partagent la contamination des eaux usées en sortie des établissements de soin (hôpital et maison de retraite) avec les antibiotiques. Ces derniers représentent alors respectivement 48 % et 17 % de la contamination des effluents hospitaliers et de la maison de retraite. Le profil de contamination des eaux usées en entrée de STEP est le même en hiver qu'en été. En sortie de STEP, la contamination des eaux se répartit entre les β -bloquants (43 %), les antibiotiques (29 %), les analgésiques et AINS (14 %) et les antiépileptiques et antidépresseurs (9 %). En dehors des anticancéreux, du sildénafil et du gemfibrozil (hypolipémiant), la contamination des eaux de surface se répartit entre toutes les classes thérapeutiques étudiées avec une majorité d'analgésiques et AINS et de stimulants (36 % chacun).

III-2-2 Continuum agricole

III-2-2-1 Etude des classes thérapeutiques spécifiques à ces travaux

Le long du continuum agricole, les antibiotiques et les β -bloquants sont également les composés les plus présents et les plus abondants (Figure 37). Le point numéro 5, qui correspond au point « rivière » du continuum hospitalier, est le plus contaminé et révèle l'impact du rejet de la STEP sur la contamination de la rivière, en particulier avec les anti-VIH. Les points 1 et 2 sont contaminés majoritairement ($> 80\%$) par des antibiotiques (ex. : érythromycine, lincomycine, enrofloxacin) ce qui met en avant une influence agricole de la contamination, probablement lié à de l'élevage. En effet ces antibiotiques sont administrés aux animaux et ils ont déjà été dosés par Hu *et al.* (2010) ou Martinez-Carballo *et al.* (2007) dans des déchets d'élevage. De plus, l'enrofloxacin par exemple n'est utilisé qu'en médecine vétérinaire.

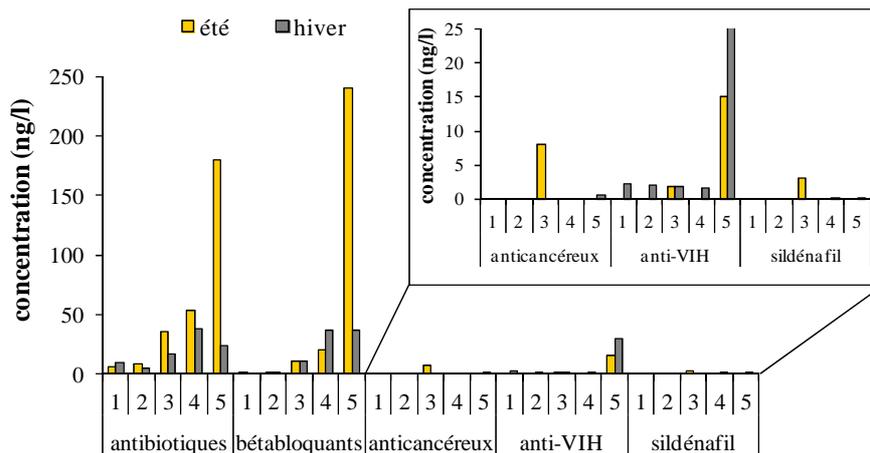


Figure 37 : Présence et niveau de contamination des antibiotiques, β -bloquants, anticancéreux, anti-VIH et sildénafil le long d'un continuum agricole, en été et en hiver.

La contamination des eaux de surface est faible (total < 100 ng/L sauf point 5 en été, 435 ng/L). Cependant, elle est plus forte en été qu'en hiver en particulier au niveau du point 5 en raison de la plus faible dilution du rejet de STEP dans la rivière en été (Figure 38). Contrairement au continuum hospitalier, une augmentation globale de la contamination est observée le long du continuum agricole. Celle-ci est certainement due à l'influence croissante de paramètres externes comme les zones agricoles et les rejets de STEP.

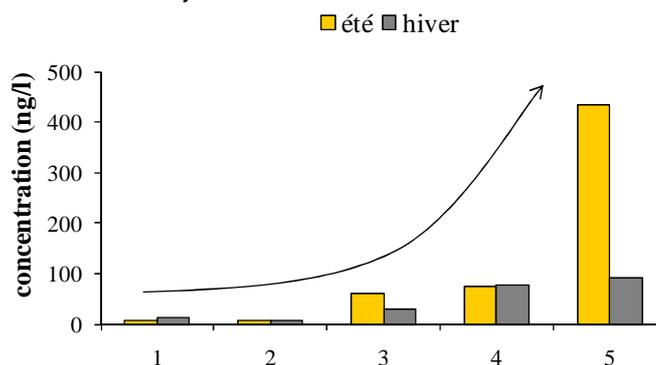


Figure 38 : Concentration totale ($\Sigma 78$) en molécules pharmaceutiques le long du continuum agricole, comparaison été/hiver.

III-2-2-1 Etude des autres classes thérapeutiques

Comme pour le continuum hospitalier, au cours de ce projet « FLASH », 21 molécules appartenant à 5 autres classes thérapeutiques (analgésiques et AINS, antiépileptiques et antidépresseurs, bronchodilatateurs, hypolipémiants et stimulants) ont été analysées.

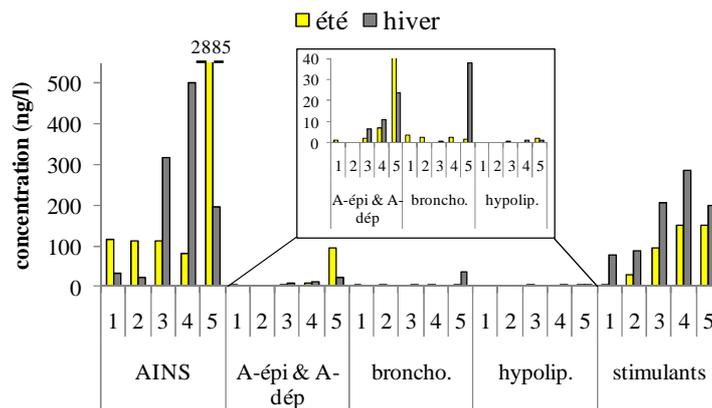


Figure 39 : Présence et niveau de contamination des analgésiques et AINS (AINS), des antiépileptiques et antidépresseurs (A-épi. & A-dép.), des bronchodilatateurs (broncho.), des hypolipémiants (hypolip.) et des stimulants, en été et en hiver le long d'un continuum agricole.

Comme pour le continuum hospitalier, les analgésiques et AINS ainsi que les stimulants sont les plus abondants et les plus présents le long du continuum agricole (Figure 39). Comme pour les autres classes thérapeutiques étudiées dans la partie précédente, le point numéro 5 est le plus contaminé et révèle l'impact du rejet de la STEP sur la contamination de la rivière, en particulier avec les analgésiques et AINS. Les niveaux de contamination des eaux de surface par ces classes thérapeutiques sont plus élevés qu'avec les 5 autres classes étudiées (cf. I.3.2.1). En effet, les concentrations des analgésiques et AINS varient entre 23 et 2 885 ng/L et celles des stimulants entre 2 et 285 ng/L alors que celles des antibiotiques et des β -bloquants varient respectivement entre 5 et 180 ng/L et 0 et 240 ng/L. L'évolution globale de la contamination le long du continuum sera donc influencée par les tendances de ces classes thérapeutiques. Pour cette raison, elle ne sera pas détaillée dans ce paragraphe et l'évolution globale pour l'ensemble des 10 classes sera présentée ci-dessous.

III-2-2-1 Bilan toutes classes thérapeutiques confondues

En additionnant les concentrations mesurées pour l'ensemble des 99 composés analysés, la Figure 40 a été obtenue. Au niveau des points 1 et 2, les moins impactés par les activités anthropiques, les concentrations estivales et hivernales sont équivalentes et sont faibles (< 150 ng/L). Au niveau des points 3 et 4, les concentrations hivernales sont un peu plus élevées que les concentrations estivales et sont comprises entre 266 ng/L et 874 ng/L. Ces concentrations sont donc plus importantes que celles des points 1 et 2. Enfin, au niveau du point 5, les concentrations mesurées sont plus fortes en été (3571 ng/L) qu'en hiver (548 ng/L). En été, la concentration en molécules pharmaceutiques au niveau du point 5 (3571 ng/L) est supérieure à celle du point 4 (319 ng/L). En hiver, la concentration au niveau du point 5 (548 ng/L) est équivalente à celle du point 3 (562 ng/L) et est un peu plus faible qu'au niveau du point 4 (874 ng/L). En conclusion, une augmentation de la contamination a été observée le long du continuum agricole.

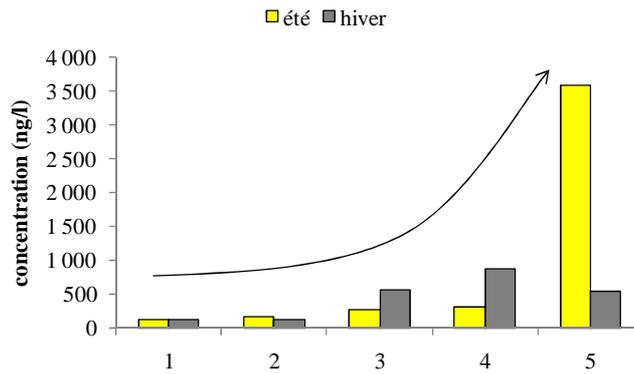


Figure 40 : Concentration totale ($\Sigma 99$) en molécules pharmaceutiques le long du continuum agricole, comparaison été/hiver.

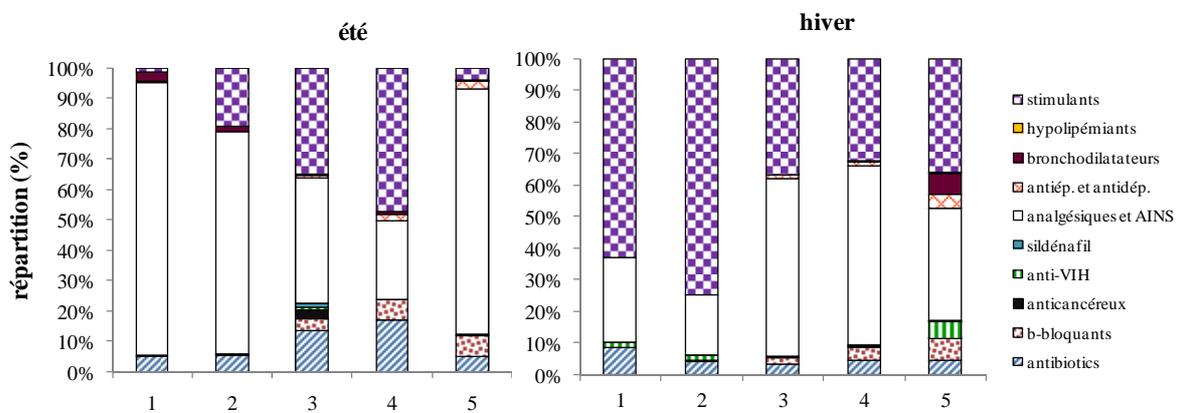


Figure 41 : Contribution des 10 classes thérapeutiques étudiées à la contamination totale des eaux le long du continuum agricole.

Comme pour le continuum hospitalier, la contribution de chacune des 10 classes thérapeutiques à la contamination des eaux a été étudiée (Figure 41). En été, ce sont principalement les analgésiques et les AINS qui contribuent à la contamination des eaux mais les stimulants, les antibiotiques et les β -bloquants dans une moindre mesure sont également présents. En hiver, au niveau des points 1 et 2, ce sont les stimulants qui contribuent le plus à la contamination des eaux alors qu'au niveau des points 3 et 4, ce sont les analgésiques et les AINS. Au niveau du point 5, 7 des 10 classes thérapeutiques participent à la contamination de l'eau or les anti-VIH et les bronchodilatateurs par exemple n'apparaissent pas en amont de ce point ce qui met en évidence l'impact du rejet de la STEP sur la contamination.

Apports monodisciplinaires

Volet parasitologie

**Caractérisation de la pathogénicité pour l'homme de
Cryptosporidium sp et des souches d'*E. coli* isolées de Seine**

(Parasitologie, CHU Rouen)

III-3 Caractérisation de la pathogénicité pour l'homme de *Cryptosporidium* sp et des souches d'*E. coli* isolées de Seine (Parasitologie, CHU Rouen)

Nous avons montré que les eaux de l'estuaire étaient fortement impactées par *Cryptosporidium* spp. puisque de 2002 à 2006, 86% des échantillons d'eau prélevés au cours de 11 campagnes longitudinales contenaient des oocystes de *Cryptosporidium* spp. à des concentrations allant de 3 à 33 oocystes /10 L, avec des variations saisonnières marquées. Après filtration de 20 litres d'eau sur cartouche de filtration (porosité de 1 µm), les oocystes filtrés ont été purifiés par séparation immuno-magnétique, identifiés et comptés par immunofluorescence directe à l'aide d'anticorps monoclonaux (spécifiques du genre parasite) couplée à la cytométrie en flux. Parce que l'immunofluorescence détecte les oocystes de la plupart des espèces de *Cryptosporidium*, cette méthodologie permet de fournir une évaluation quantitative du nombre de parasites présents dans les échantillons environnementaux, en revanche, elle ne permet pas d'identifier les espèces ou les génotypes présents dans l'eau, de rendre compte de leur distribution spatiale et temporelle et donc des sources de contamination, données nécessaires pour une évaluation efficace et la mise en œuvre de mesures afin de réduire la contamination des eaux de surface par *Cryptosporidium* et le risque pour la santé humaine. C'est pour cette raison que les échantillons d'eau de Seine prélevés et analysés au cours de campagnes de prélèvements (6 campagnes réalisées en 2005-2006) à différentes saisons, ont été rétrospectivement analysés par des techniques de biologie moléculaire afin de détecter la présence d'ADN de *Cryptosporidium* et d'éventuellement en cas de positivité de déterminer le ou les espèces parasites présentes. Après extraction de l'ADN, une région hypervariable du gène codant pour l'ARN ribosomal 18S est amplifiée par PCR nichée. Les produits de PCR sont clonés et 10 clones recombinants ont été sélectionnés pour séquençage. Soixante échantillons ont été analysés et un génotypage a pu être réalisé pour 23 isolats.

Le nombre d'oocystes de *Cryptosporidium* sp. par prélèvement ayant été déterminé par cytométrie en flux, on peut estimer le seuil de sensibilité de la détection des oocystes par la technique de PCR à 5 oocystes par prélèvement. La PCR s'est révélée négative pour des échantillons dans lesquels le nombre d'oocystes était estimé à 3. Néanmoins, l'amplification de l'ADN de *Cryptosporidium* sp. s'est parfois révélée infructueuse pour des prélèvements contenant de 8 à 34 oocystes.

Quelle que soit la saison et le site, seules 2 espèces, *C. hominis* et *C. parvum*, sont identifiées (Figure 42). Ces espèces sont globalement impliquées dans plus de 95% des cryptosporidioses humaines quelle que soit la zone géographique étudiée mais il est à noter qu'au CHU de Rouen entre 2007 et 2009, sur 20 cas de cryptosporidiose diagnostiqués chez des enfants immunocompétents n'ayant pas quitté la Seine Maritime, 16 enfants étaient infectés par *C. parvum* et 4 par *C. hominis*, aucune autre espèce n'ayant été détectée. Concernant les isolats retrouvés en Seine, l'analyse des séquences obtenues pour *C. parvum* révèle que l'ARN ribosomal 18S était de type A le plus fréquemment retrouvé chez les bovins. Le clonage de l'ADN amplifié montre l'homogénéité en terme d'espèce pour chaque isolat et même si le faible nombre d'oocystes doit faire relativiser cette homogénéité, ces résultats sont en faveur d'une source unique de contamination par *Cryptosporidium* spp. à un moment donné et pour un site donné. *Cryptosporidium hominis* est une espèce purement anthroponotique alors que *C. parvum* est généralement considéré comme un parasite à la fois des ruminants, prédominant notamment chez les veaux âgés de moins de 3 semaines, et de l'Homme. La présence concomitante de ces 2 espèces à Poses et à Honfleur en février 2005 (période de haut débit) et en novembre 2005 ainsi qu'à Poses et à Rouen en mars 2006 (bas débit) tend à montrer que les oocystes isolés à Rouen et à Honfleur sont issus d'une contamination locale et ne sont probablement pas des oocystes transportés par le fleuve à partir de Poses. La présence de *C. hominis* à Honfleur est le reflet d'une contamination d'origine humaine due soit directement aux rejets de STEP (Risle à Pont-Audemer), soit indirectement par remise en suspension des sédiments de la zone d'Honfleur. Ces résultats supportent la théorie que les animaux d'élevage et l'Homme sont les deux sources majeures de contamination des eaux de l'estuaire.

C. parvum est l'unique espèce retrouvée chez les veaux âgés de moins de 3 semaines et ceci jusqu'à la période de sevrage où il semble qu'ils guérissent de leur infection. La prévalence de *C. parvum* diminue avec le vieillissement des veaux et les espèces que l'on isole chez les veaux plus âgés et les bovins adultes sont *C. bovis*, *C. andersoni* et *C. ryanae*, 3 espèces que nous n'avons pas retrouvées bien que le clonage associé au séquençage des gènes amplifiés par PCR le permettait. Il est probable que les oocystes appartenant à ces espèces soient minoritaires dans l'environnement et que le nombre limité de prélèvements et d'oocystes disponibles pour l'étude génotypique n'aient pas permis de les identifier. Il peut être avancé également que, leur taille différant de celle de *C. parvum* et/ou *C. hominis*, leur devenir dans l'environnement, en terme de sédimentation ou de rétention par les végétaux, ne soit pas le même que celui des 2 espèces identifiées. Probablement pour les mêmes raisons, nous ne retrouvons pas de génotype d'animaux domestiques (*C. felis* ou *C. canis*). Un certain nombre de facteurs peuvent influencer sur les résultats obtenus dans l'estuaire de Seine. L'échantillonnage limité en terme de fréquence et en terme de quantité d'eau collectée et filtrée peut expliquer l'absence d'autres espèces ou génotypes probablement présents dans le bassin versant mais en faible quantité. Par ailleurs, les parasites provenant de sites en amont des sites de prélèvement peuvent avoir été progressivement dilués, entraînant une baisse des concentrations de parasites. Au total, il semble que l'homme représente une source significative de parasite au niveau des sites étudiés probablement par l'intermédiaire des rejets d'eaux usées urbaines traitées. Nos données soutiennent la théorie selon laquelle les humains et les animaux de ferme sont deux sources majeures de contamination des eaux de surface par les oocystes de *Cryptosporidium*.

L'analyse des génotypes retrouvés montre qu'il s'agit de parasite pouvant potentiellement parasiter l'homme, toutefois, l'évaluation du danger lié au caractère viable et infectant des parasites retrouvés dans l'environnement n'a pas pu être étudiée du fait de l'absence de technique validée disponible. Les seules méthodologies disponibles actuellement sont celles utilisant des modèles animaux et décrits par notre laboratoire mais, du fait de la dose infectante dans ces modèles, leur utilisation est limitée quand un faible nombre d'oocystes est isolé. En collaboration avec un laboratoire bas normand, dans le cadre d'un autre projet de recherche, notre équipe a mis au point et est en train d'évaluer une technique de biologie moléculaire (RT PCR) afin d'étudier la viabilité et le potentiel infectant des oocystes de *Cryptosporidium*. Nous pourrions donc appliquer cette technique dès qu'elle sera validée.

C'est la première étude de surveillance réalisée dans l'eau de la Seine s'intéressant à la caractérisation moléculaire de *Cryptosporidium*. Nos données soulignent la complexité associée aux événements aboutissant à la contamination d'un bassin versant par *Cryptosporidium* et les défis associés à la capture et la comptabilité des variations dynamiques spatiales et temporelles de ce parasite par des méthodes d'échantillonnage. Notre étude souligne que la caractérisation génotypique des cryptosporidies isolées dans l'estuaire de Seine, et les informations sur la source de la contamination qui en découlent, est nécessaire pour une évaluation efficace des risques et la sélection des pratiques de gestion afin de réduire la contamination des eaux de surface par *Cryptosporidium* et le risque de cryptosporidiose.

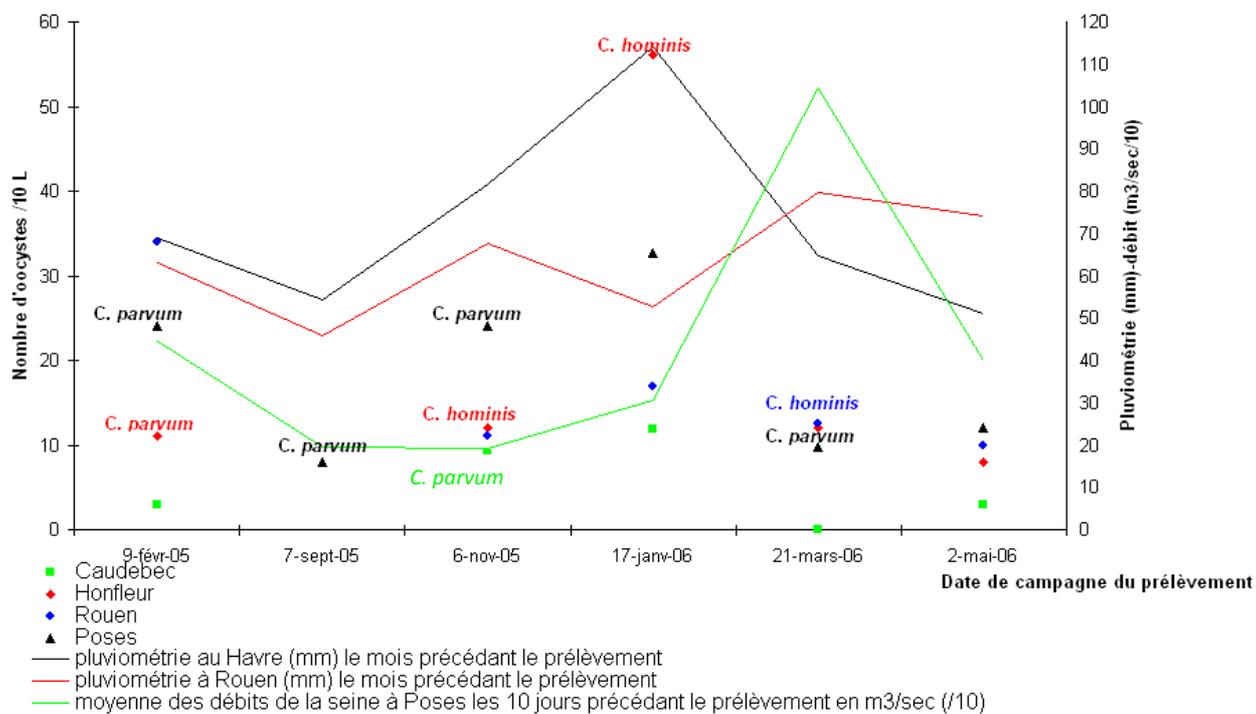
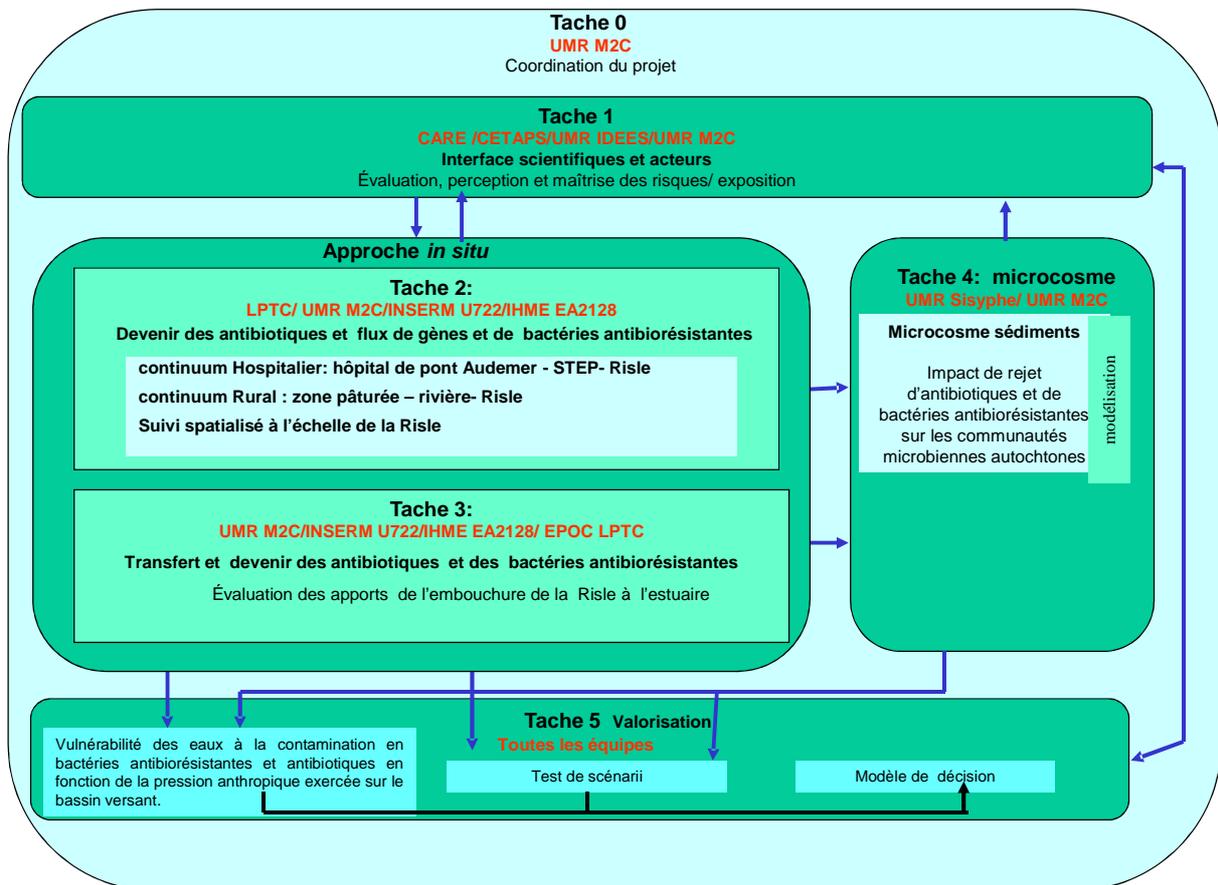


Figure 42 : Concentrations et identification des espèces des oocystes de *Cryptosporidium* sp. isolés en Seine. Relations avec les facteurs fluviaux (débit du fleuve à Poses) et climatiques (pluviométrie le mois précédant le prélèvement).

Approche multidisciplinaire intégrative du projet FLASH

Devenir des antibiotiques, FLux de gènes et de bactéries Antibiorésistantes dans les Systèmes Hydriques de surfaces



III-4 Devenir des antibiotiques, bactéries antibiorésistantes et des souches pathogènes dans des hydrosystèmes de surface (Microbiologie, UMR M2C, INSERM U722, IHME EA 2128)

III-4-1 Contamination en antibiotiques et bactéries antibiorésistantes, présence de souches pathogènes le long d'un continuum hospitalier

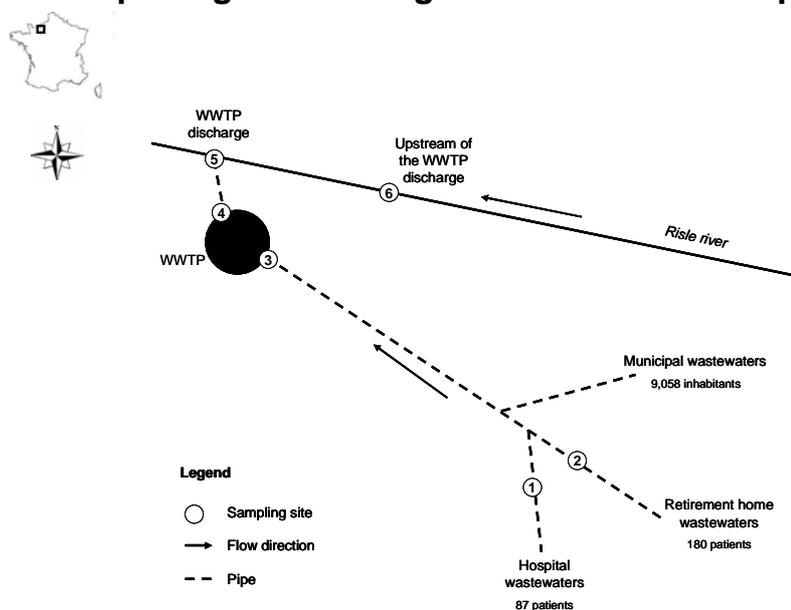


Figure 43 : Diagramme du continuum « Centre de soin – Station d'épuration – Rivière »

Le suivi spatialisé de la contamination des eaux par les antibiotiques et les bactéries fécales (*Escherichia coli*, *Enterococcus*) antibiorésistantes, en relation avec les prescriptions antibiotiques, a été mené le long d'un continuum « Centre de soins - Station d'épuration - Milieu récepteur (Figure 43). La pression démographique le long de ce continuum a été caractérisée et les campagnes ont été menées pour deux périodes contrastées sur le plan épidémiologique, une période hivernale « haut niveau épidémiologique » et estivale « bas niveau épidémiologique » comme en témoignent les prescriptions en médecine de ville (Tableau 7, Annexe 2).

	Hôpital		Maison Retraite		Effluent brut STEP		Effluent traité STEP		Rivière	
	Juin09	Déc. 09	Juin 09	Déc.	Juin	Déc.	Juin	Déc.	Juin	Déc.
Site	1		2		3		4		5	
Densité population	41	87	180		9058 habitants / 221 patients		9058 habitants / 267 patients		Rejet STEP	
Temps de résidence moyen des patients	4 à 28 jours		10 ans		n.p		n.p		n.p	
Echantillonnage	Ponct.	Moy. 24h	Ponct	Moy. 21h	Moy. 24h		Moy. 24h		Ponct.	Moy. 16h
Débit	1 m ³ .h ⁻¹		1 m ³ .h ⁻¹		2500 m ³ .j ⁻¹	4400 m ³ .j ⁻¹	2500 m ³ .j ⁻¹	4400 m ³ .j ⁻¹	6.9 m ³ .s ⁻¹	10.7 m ³ .s ⁻¹
<i>Escherichia coli</i> (UFC.100mL ⁻¹)	3,1±2,5.10 ⁴	8,3±3,5.10 ⁴	<5	1,9±0,3.10 ⁶	7,1±3,7.10 ⁷	3,5±2,1.10 ⁶	4,6±1,3.10 ⁴	6,7±0,4.10 ⁴	3,0±0,3.10 ³	2,6±0,6.10 ³
<i>Enterococcus</i> (UFC.100mL ⁻¹)	-	6,5±0,1.10 ⁶	-	2,6±1,6.10 ⁵	-	7,0±0,4.10 ⁵	-	1,4±0,2.10 ⁴	-	3,7 ± 1,0.10 ²

n.p : non pertinent ; ++, ponct : échantillon d'1 litre prélevé ponctuellement. - : Non recherché.

Tableau 7 : Contamination des eaux en *Escherichia coli* et *Enterococcus* le long du continuum hospitalier : centre de soins - station d'épuration – rivière.

◆ Contamination des eaux du continuum hospitalier en molécules antibiotiques

Parmi les 34 molécules d'antibiotiques recherchées par la méthode d'extraction en phase solide (SPE) suivie d'une chromatographie en phase liquide couplée à un spectromètre de masse en tandem (LC-MS-MS) développée au laboratoire EPOC, seules 15 molécules ont été détectées (Annexe 3).

(A)

Antibiotique	Effluent hospitalier				Effluent maison de retraite			
	Consommation ¹ (g)	Concentration ($\mu\text{g.L}^{-1}$)	Résistance (n/N)		Consommation ¹ (g)	Concentration ($\mu\text{g.L}^{-1}$)	Résistance (n/N)	
			<i>E. coli</i>	<i>Enterococcus</i>			<i>E. coli</i>	<i>Enterococcus</i>
Quinolones / Fluoroquinolones	176	142	4/50	49/49 ²	13	59	21/50	36/48
Sulfamides	3.3	0.02	1/50	-	0	0.006	12/50	-
Tétracyclines	1.0	1.0	8/50	0/49	0	ND	19/50	9/48
Pénicillines	1947	0.8	5/50	49/49	175	0.68	19/50	42/48
Céphalosporines	422	160	1/50	-	51	ND	3/50	-
Macrolides	274	8	-	48/49	54	21	-	41/48

¹: Consommation un mois avant l'échantillonnage, n: Nombre de souches antibio-résistantes, N: Nombre total de souches testées, ND: Non Détecté

² Résistance de haut niveau

(B)

Antibiotiques	Prescriptions (g)	Effluent brut STEP				Effluent traité STEP				Rivière	
		Concentration ($\mu\text{g.L}^{-1}$)	Résistance (n/N)		Concentration ($\mu\text{g.L}^{-1}$)	Résistance (n/N)		Concentration ($\mu\text{g.L}^{-1}$)	Résistance (n/N)		
			<i>E. coli</i>	<i>Enterococcus</i>		<i>E. coli</i>	<i>Enterococcus</i>		<i>E. coli</i>	<i>Enterococcus</i>	
Quinolones / Fluoroquinolones	2255	0.4	3/49	7/47 ^b	0.2	2/49	7/46	0.001	2/50	0/46	
Sulfamides	902	0.9	8/49	-	0.7	4/49	-	0.005	3/50	-	
Tétracyclines	1562	0.1	17/49	13/47	0.01	10/49	12/46	ND	9/50	12/50	
Pénicillines	259816	0.02	11/49	9/47	ND	5/49	9/46	0.005	8/50	2/46	
Céphalosporines	3444	0.6	3/49	-	0.04	1/49	-	ND	1/50	-	
Macrolides	nd	3.4	-	28/47	1.6	-	31/46	0.008	-	30/50	

n: Nombre de souches résistantes N: Nombre total de souches testées ND: Non Détecté, nd non disponible^b Résistance de haut niveau

Tableau 8 : Relation entre la prescription, la contamination en antibiotiques et l'antibiorésistance des souches d'*E. coli* et *Enterococcus* dans les eaux le long du continuum hospitalier: centre de soins - station d'épuration – rivière. (A) Effluents hospitaliers, (B) continuum station d'épuration - rivière

Alors que les pénicillines (amoxicilline) sont les antibiotiques les plus prescrits à l'hôpital et dans les pharmacies de la ville, les antibiotiques majoritairement retrouvés dans les effluents de l'hôpital sont les molécules les plus persistantes dans les eaux: les quinolones /fluoroquinolones (ofloxacin : $68 \mu\text{g.L}^{-1}$; acide pipemidique $59 \mu\text{g.L}^{-1}$), et les macrolides, auxquelles s'ajoutent les céphalosporines ($160 \mu\text{g.L}^{-1}$) (Annexe 2 et Tableau 8). A l'entrée de la station d'épuration, tous les antibiotiques prescrits à l'hôpital et dans les pharmacies de la ville sont retrouvés dans l'effluent brut, mais les concentrations observées sont beaucoup plus faibles (de l'ordre du ng.L^{-1}) et diminuent encore dans le milieu récepteur ou seules les quinolones, les sulfamides et les macrolides sont détectées à des concentrations de l'ordre du ng.L^{-1} . Ces valeurs diminuent en décembre alors que le niveau de prescription est légèrement plus élevé, ces résultats s'expliquant par une dilution plus importante liée aux facteurs hydrologiques (débits, pluviométrie ; Annexes 2 et 3). La contamination des eaux en antibiotiques est dépendante des quantités prescrites mais surtout de la stabilité de ces molécules dans le milieu aquatique. Quel que soit l'antibiotique, les concentrations observées le long du continuum sont très inférieures aux concentrations minimales inhibitrices responsables de la sélection de bactéries

antibiorésistantes qui sont de l'ordre de 0.032 µg.mL⁻¹ à 256 µg.mL⁻¹ et restent inférieures aux concentrations subinhibitrices, (0,9x CMI à 0,25x CMI) pour lesquelles il a été décrit un effet mutagène (Davies et al, 2006 ; Fajardo et al, 2008 ; Kohanski et al, 2010).

◆ Evolution de la population d'*Escherichia coli* (*E. coli*) et de la diversité spécifique des *Enterococcus* dans les eaux

En parallèle à cette contamination en antibiotique, la densité en bactéries fécales diminue le long du continuum : les apports hospitaliers en *Escherichia coli* (*E. coli*) et *Enterococcus*, s'ajoutent à ceux des rejets urbains dans les effluents bruts de la station d'épuration, où un abattement de plus de 99% est observé pour *E. coli*, et de 90% pour les entérocoques (Tableau 7). Au sein de ces populations bactériennes la proportion de souches résistantes aux antibiotiques évolue le long du continuum.

Une étude de la diversité basée sur la distribution des phylogroupes A, B1, B2, D au sein des populations d'*E. coli*, et sur la diversité en espèce des *Enterococcus* a été menée le long du continuum (Tableau 9). A l'exclusion d'un résultat atypique observé dans les effluents de l'hôpital en décembre 2009, la proportion relative des phylogroupes A et B1 (A/B1) diminue le long du continuum démontrant une modification de la structure des populations d'*E. coli* circulant dans les eaux. Ces résultats s'expliquent par la disparition préférentielle des *E. coli* d'origine humaine appartenant au phylogroupe A, au profit de souches appartenant au phylogroupe B1 (thèse M. Ratajczak, Ratajczak et al, 2010). De même, une analyse de la diversité de l'espèce *Enterococcus faecium* majoritairement isolée dans les eaux a été effectuée par typage moléculaire (multilocus sequence typing, MLST), et par l'analyse d'une séquence marqueur présente chez les souches épidémiques hospitalières « CC17 ». Il a ainsi été observé que l'occurrence du complexe « CC17 » maximale chez les souches d'*Enterococcus faecium* isolées des effluents hospitaliers, diminue le long du continuum au profit d'une sous population d'*Enterococcus faecium* probablement mieux adaptée à l'environnement aquatique (Tableau 9).

(A)	<i>Escherichia coli</i>		<i>Enterococcus faecium</i>		
	Site	Ratio A/B1	% de résistance à au moins un antibiotique	Complexe Clonal 17 (n/N)	% de résistance à l'ampicilline
	Effluent Hospitalier	3/45*	16.0	13/13	100
	Effluent Maison Retraite	30/3	82.0	15/15	87,5
	Effluent brut STEP	30/9	44.9	2/14	19,1
	Effluent traité STEP	32/8	24.5	4/14	19
	Rivière	28/15	26.0	3/12	4

* : Résultat non expliqué n : Nombre de souches appartenant au complexe clonal 17, N : Nombre total de souches testé

(B)	<i>Escherichia coli</i>	
	Site	% de résistance à au moins un antibiotique
	Effluent Hospitalier	32/1
	Effluent Maison Retraite*	-
	Effluent brut STEP	28/10
	Effluent traité STEP	30/14
	Rivière	25/12

* dénombrement inférieur à la limite de détection

Tableau 9 : Evolution de la diversité des populations d'*Escherichia coli* et d'*Enterococcus faecium* le long du continuum hospitalier. (A) Décembre 2009, (B) Juin 2009.

◆ Recherche de souches d'*E. coli* entéropathogènes :

Au-delà de la résistance aux antibiotiques, au sein de la population d'*E. coli*, il existe des souches d'*E. coli* pathogènes intra intestinales, impliquées dans des gastroentérites dont la sévérité est dépendante du pathovar. Le risque de pathogénicité intra-intestinale chez les souches d'*E. coli* isolées des eaux de Seine a été évalué par une détection moléculaire de dix gènes impliqués dans les différents pathotypes de *E. coli* par l'équipe d'E. Denamur (INSERM U722). Il a été réalisé une recherche de gènes caractéristiques des différents pathovars intraintestinaux d'*E. coli*: (ETEC : enterotoxinogen *E. coli*, EPEC : enteropathogen *E. coli*, EIEC : enteroinvasive *E. coli*, STEC/EHEC : Shiga toxin producing/enterhaemorrhagic *E. coli*, EAEC : enteroaggregative *E. coli*, DAEC : diffuseaggregative *E. coli*) chez 831 souches provenant des différentes collectes. Les gènes testés avec leur présence dans les différents pathotypes sont listés ci-dessous :

- *afa/draD*, *afa* (afimbrial adhesin) operon, D: Invasin, DAEC
- *ipaH* (invasion plasmid antigen H), EIEC and Shigella
- *aatA* (antiaggregation protein transporter operon), EAEC
- *aaiC* (AggR activated island), EAEC
- *eltB* (LT), Heat labile toxin, ETEC
- *estA* (ST), Heat-stable toxin, ETEC
- *stx1* (Shiga toxin), STEC
- *stx2* (Shiga toxin), STEC
- *eae* (*E. coli* attaching and effacing), dans le Locus of Enterocyte Effacement (LEE) island
- *bfpA* (bundle-forming pilus),
- *eae* + *bfpA* = EPEC typique
- *eae* only = EPEC atypique (aEPEC)
- *eae* + *stx* = EHEC

Sur les 194 souches du continuum « maison de retraite/ hôpital- sortie de step – Risle », la recherche moléculaire des gènes impliqués dans la virulence s'est avéré négative, démontrant l'absence de souches d'*E. coli* entéropathogènes dans les eaux.

Au sein de la population d'entérocoques, appartenant majoritairement à l'espèce *Enterococcus faecium*, la proportion de souches résistantes à l'ampicilline et à la ciproflaxine est maximale dans les effluents de l'Hôpital (100%) et de la maison de retraite (respectivement 87,6%, 75%), diminue dans les effluents traités de la station d'épuration (19% et 17%) jusque 4% et 5% dans les eaux de la Risle. Au contraire, la proportion de souches résistantes à la tétracycline très faible dans les effluents du centre hospitalier augmente le long du continuum pour atteindre 26% à la sortie de la STEP et 24% dans la rivière. La proportion de souches sensible à l'érythromycine est supérieure à 70% tout au long du continuum mais seules les souches hospitalières présentent un haut niveau de résistance. La recherche des supports génétiques correspondant effectuée sur l'espèce majoritaire *E. faecium*, montre que toutes les souches sont résistantes à l'érythromycine, mais que la prévalence du gène *ermB* est de 75% dans les souches hospitalières (75%) et de seulement 6,7% chez les souches isolées de la Risle (Tableau 10). Des mécanismes de résistance aux macrolides, différents de la méthylase ErmB ou de la pompe à efflux Mef A sont majoritairement retrouvés dans les souches isolées des eaux de STEP ou de rivières (tableau H4-2). Dans cette étude, l'occurrence de souches *Enterococcus faecium* présentant un haut niveau de résistance à la gentamycine est faible, sauf dans les effluents de la maison de retraite, et aucune souche résistante à la vancomycine ou à la linezolid n'a été isolée, ce qui peut s'expliquer par le faible nombre de lits du centre hospitalier (Tableau 8).

Au centre de soin, bien que les prescriptions en antibiotiques soient plus élevées à l'hôpital, les pourcentages de souches d'*E. coli* résistantes à au moins un antibiotique (16%) et de souches multirésistantes (de 3 à 8 résistances, 10%) sont inférieurs à ceux observés dans les rejets de la maison de retraite, respectivement 82% et 38%. Ces résultats s'expliquent car le temps de résidence, en moyenne 10 ans à la maison de retraite, permet d'observer l'effet à long terme des prescriptions en antibiotiques (tableaux H2 et H4). Si les phénotypes de résistances les plus fréquents chez les souches d'*E. coli* isolées dans les rejets de la maison de retraite

correspondent aux antibiotiques qui y sont majoritairement prescrits, quinolones/fluoroquinolones (42%), et pénicillines (38%), une proportion importante de souches d' *E. coli* sont résistantes aux sulfamides (24%), tetracyclines (24%) alors que ces antibiotiques ne sont pas prescrits (Tableau 8). L'analyse du profil phénotypique montre que 30% (15/50) des souches d'*E. coli* isolées des effluents de la maison de retraite sont résistantes à la fois à l'antibiotique prescrit (amoxicilline) et à au moins un antibiotique non prescrit (sulfaméthoxazole, tetracycline, acide nalidixique). Ces propriétés de multirésistances s'expliquent par la présence de cassettes contenues dans les intégrons de classe 1, détectées dans le génome de 12/15 de ces souches. Ainsi, si pour chaque antibiotique prescrit on retrouve le phénotype de résistance correspondant chez les souches d'*E. coli* rejetées dans les eaux les phénotypes de résistance observée peuvent s'expliquer par des gènes associés présent sur un même support génétique, notamment les intégrons (Tableau 10).

(A)

	% of <i>E. coli</i> resistant to at least one antibiotic	% of multiple ^b antibiotic-resistant <i>E. coli</i>							% of class 1 integrons	% of class 2 integrons
		R3	R4	R5	R6	R7	R8	% MAR		
hospital effluent	16.0	0.0	2.0	0.0	2.0	4.0	2.0	10.0	6.0	0.0
retirement home effluent	82.0***	6.0	6.0	8.0	16.0	0.0	2.0	38.0	36.0***	0.0
WWTP influent	44.9	2.0	6.1	0.0	10.2	2.0	2.0	22.3	16.4	0.0
WWTP effluent	24.5	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0	4.1	14.1	8.2	2.0
river (WWTP discharge)	26.0***	4.0	2.0	2.0	4.0	2.0	0.0	14.0	8.0***	0.0
inputs upstream from WWTP discharge	22.2	2.2	2.2	6.7	0.0	0.0	0.0	11.1	4.4	2.2

^aR3 to R9: Resistances from three to nine antibiotics. %MAR: Percentage of multiple antibiotic resistant *E. coli*. χ^2 test, p -value <0.001. ^bMultiple antibiotic-resistance of *E. coli* is defined by at least three resistances to antibiotics. ^c $\alpha = 0.05$.

(B)

Site	% d'isolats résistants à l'érythromycine	% d'isolats possédant le gène de résistance			
		<i>erm</i> (B)	<i>mef</i> (A)	<i>erm</i> (B)+ <i>mef</i> (A)	autres
Hôpital	72	75	0	25	0
Maison de retraite	87	85,7	4,8	0	9,5
Effluent brut de STEP	77	12,5	18,8	25	43,7 ^a
Effluent traité de STEP	80	15,8	47,4	10,5	26,3 ^b
Rivière	72	6,7	6,7	0	86,7 ^c

^a $P < 0.0001$ vs hôpital et maison de retraite ; ^b $P < 0.0001$ vs hôpital; $P = 0.028$ vs maison de retraite ; $P = 0.053$ vs WWTP effluent brut ; ^c $P < 0.0001$ vs hôpital, maison de retraite, effluent brut et traite de STEP.

Tableau 10 : Antibiorésistance des souches d' *E. coli* et *Enterococcus faecium* et supports génétiques le long du continuum hospitalier. (A) Multirésistance aux antibiotiques et présence d'Intégrons de classe 1 et 2 chez les souches d' *E. coli* isolées, (B) Résistance à l'érythromycine et supports génétiques correspondant chez les souches d' *Enterococcus faecium*

◆ Conclusions et perspectives

La contamination, en molécules antibiotiques dans les eaux résulte à la fois de la prescription médicale (type de molécule et période épidémique), de la persistance dans les eaux des antibiotiques et/ou de leurs métabolites, des facteurs hydrologiques (débits). A effet thérapeutique équivalent il pourrait être préconisé de prescrire des molécules qui se dégradent rapidement en milieu aquatique.

La contamination chimique diminue le long du continuum, des rejets hospitaliers jusqu'à la Risle, toutefois les concentrations (de l'ordre du ng.L^{-1}) ne sont suffisantes pour exercer une pression de sélection responsable de l'émergence de souches antibiorésistantes.

L'émergence d'*E. coli* et d'*Enterococcus* antibiorésistantes résulte de la pression de sélection exercée lors des traitements médicamenteux chez l'homme. Leur occurrence dans les

eaux diminue le long du continuum : les souches hospitalières porteuses de supports génétiques spécifiques (intégrons, gène *erm*) diminuent le long du continuum au profit de souches mieux adaptées à l'environnement.

Dans les eaux il n'existe pas de relation simple entre les phénotypes de résistances des souches d '*E. coli* et d'*Enterococcus* isolées dans les eaux, la contamination en antibiotique du milieu et les prescriptions.

Le volet contamination des eaux par les antibiotiques doit pouvoir être extrapolé à d'autres molécules médicamenteuses aux modalités de prescriptions et aux propriétés de persistance dans les eaux équivalentes.

Ces travaux ont donné lieu à la rédaction de deux publications : Oberlé et al, 2012 (joint en annexe) et Leclercq et al (à soumettre).

III-4-2 Contamination en antibiotiques et bactéries antibiorésistantes, présence de souches pathogènes le long d'un continuum agricole

◆ Présentation du continuum agricole et stratégie d'échantillonnage

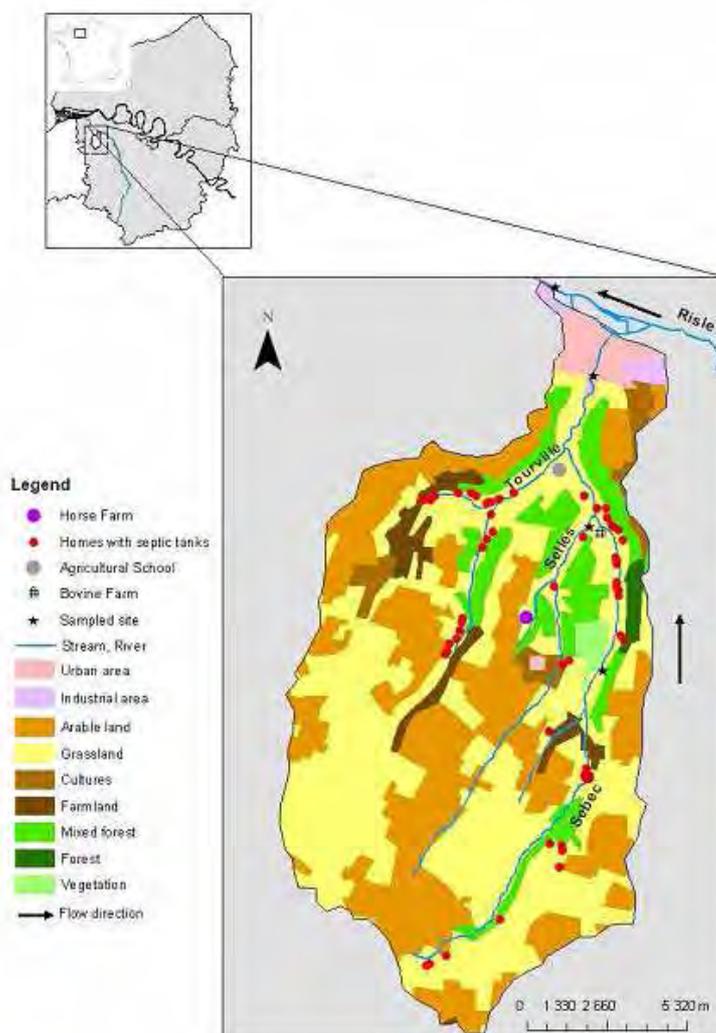


Figure 44 : Cartographie de l'usage des sols du bassin versant de la Tourville.

Le continuum agricole correspond à un réseau hydrographique composé de cours d'eau d'ordre 1 (Selles, Sébec), 2 (Tourville) et 4 (Risle), pour lequel la pression anthropique croissante exercée sur le bassin versant a été caractérisée (Figure 44). La partie amont est dominée par des zones forestières avec des animaux sauvages dont une importante population de sangliers, et un usage agricole des sols qui a été évaluée à 719 bovins dont 450 ± 10 situés à proximité du site échantillonné (commune de la Selles), 200 (sebec), 1332^1 bovins (commune de Tourville) pendant la période de notre projet. Sur le site de la Selles la participation active de l'exploitant agricole qui a mis à disposition son cahier d'élevage nous a permis d'étudier la relation entre les prescriptions d'antibiotiques à usage vétérinaire, et la contamination en antibiotiques et en bactéries antibiorésistantes des eaux. Les pratiques de cet exploitant s'inscrivent dans une démarche d'agriculture raisonnée, avec une volonté de limiter les prescriptions médicamenteuses. La pression démographique évolue de quelques habitations à un établissement agricole (500 personnes par an) qui possède un système de fosse septique

¹ Effectif cumulé à l'échelle du bassin versant

défectueux, située à l'amont du site de la Tourville. A l'aval, l'activité agricole diminue (57 bovins) au profit de l'urbanisation de la zone (9058 habitants) avec des habitations du centre-ville non raccordées au réseau d'assainissement collectif. Au niveau du site 4 (Risle), les eaux du continuum se mélangent avec les eaux de la Risle amont. Il est à noter la présence d'un centre équestre (20 ± 10 chevaux) situé à 1,5 km à l'amont du site de la Selles, avec un dénivelé de 50m.

Les 4 sites d'échantillonnage sont représentés sur la Figure 45. Le site amont (1, Le Sébec) correspond à un site le moins impacté par des activités urbaines ou agricoles (zone forestière, absence de pâturages et de cultures). Le second site (2, ruisseau de Selles) reçoit les eaux de ruissellement d'une parcelle agricole pilote pâturée par 450±10 bovins (usages d'antibiotiques et de vermifuges). Le troisième site (3, La Tourville) est impacté par les eaux de ruissellement et les rejets de quelques habitations non raccordées au réseau unitaire de l'amont de ce bassin versant agricole. A l'aval, les eaux du quatrième site (4, La Risle), situé à la confluence de la Tourville et de la Risle, se mélangent à la Risle amont.

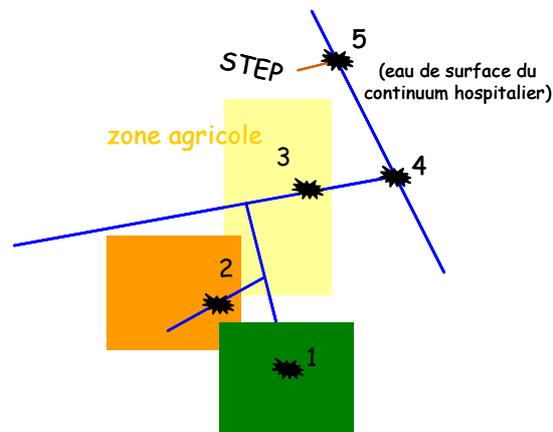


Figure 45 : Représentation du continuum agricole et des sites de prélèvement (1 : Sébec, 2 : Selles, 3 : La Tourville, 4 : La Risle, le point 5 correspond à l'eau de surface échantillonnée dans le continuum hospitalier).

Le bassin versant étudié est sous l'influence d'un climat océanique et cumule environ 750 mm de pluie au cours d'une année hydrologique (Figure 46), qui impacte fortement le débit de La Risle. Afin d'étudier la relation entre la contamination des eaux en antibiotiques et en bactéries antibio-résistantes, pour deux périodes contrastées dans la pratique agricole et épidémiologie humaine et vétérinaire, Pour ces deux campagnes, il était nécessaire de nous assurer que l'apport de masses d'eau par ruissellement soit identique. Les deux campagnes du continuum agricole ont donc été effectuées dans des conditions hydrologiques équivalentes : événements pluvieux de faible intensité. La campagne hivernale (24/11/2009), correspond à une période de stabulation et prescription vétérinaire élevée, la campagne estivale (08/06/2010) à une période de pâturage et d'épidémiologie faible. La consommation en antibiotiques à usage vétérinaire des 452 bovins de la parcelle agricole du site 2 est présentée dans le Tableau 11.

Usages	antibiotique (mg)	
	Octobre 2009- Novembre 2009 ^a	Mai 2010-Juin 2010 ^b
Fluoroquinolones		
Enrofloxacin	5720	-
Marbofloxacin	1020	-
β- lactamines		
Penicillines G	1795	570
Cefquinone	750	-
Aminosides		
Streptomycine	2820	1000
Tetracycline		
Tetracycline	2000	4000

Tableau 11 : Prescription en antibiotiques des 452 bovins de la parcelle pilote, agriculture raisonnée, du site de la Selles (site 2), 1 mois avant la date des campagnes : ^a 28 / 452, ^b 2/463 bovins traités.

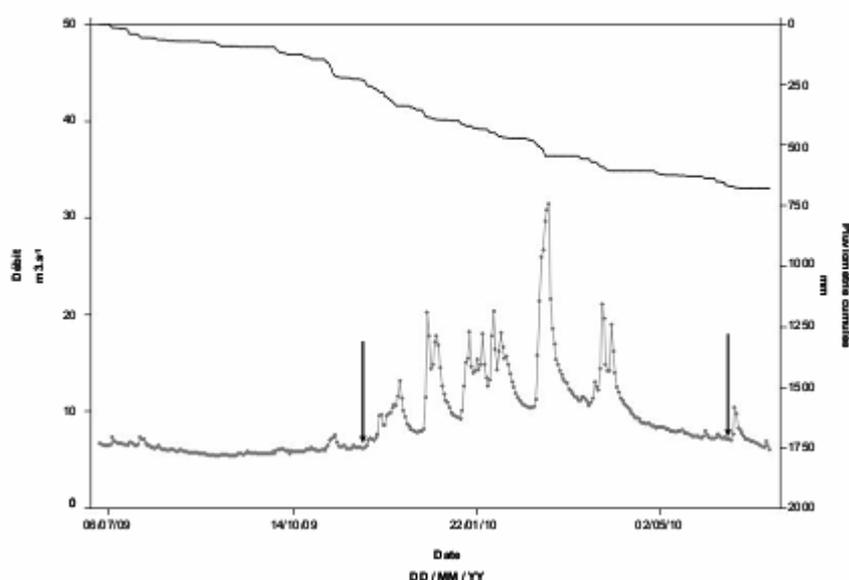


Figure 46 : Débit (—) de la Risle et pluviométrie cumulée (—) sur le bassin versant au cours d'une année hydrologique. Dates des campagnes de prélèvement (flèches noires).

Sur le site de la Selles (2) une analyse plus précise de la pluviométrie et de la conductivité montre que la campagne hivernale a été réalisée au début d'un évènement de ruissellement qui s'accompagne d'une baisse de conductivité consécutive à un apport d'eau faiblement minéralisée (16 mm de pluie) (Figure 46). En période estivale, l'augmentation du débit de la Risle consécutive à une pluviométrie² supérieure à 12 mm, n'est percevable qu'après la date de prélèvement (Figure 47). Ainsi les deux campagnes, sont positionnées hors période d'orage. Cependant il y a ruissellement sur les versants au voisinage immédiat du ruisseau, où est situé l'échantillonneur du site 3. Dans ces deux conditions, la pluviométrie n'est pas suffisante pour que les eaux de ruissellement soient impactées par des apports du centre équestre.

² Aucune donnée de conductivité n'a pu être acquise (disfonctionnement sondes)

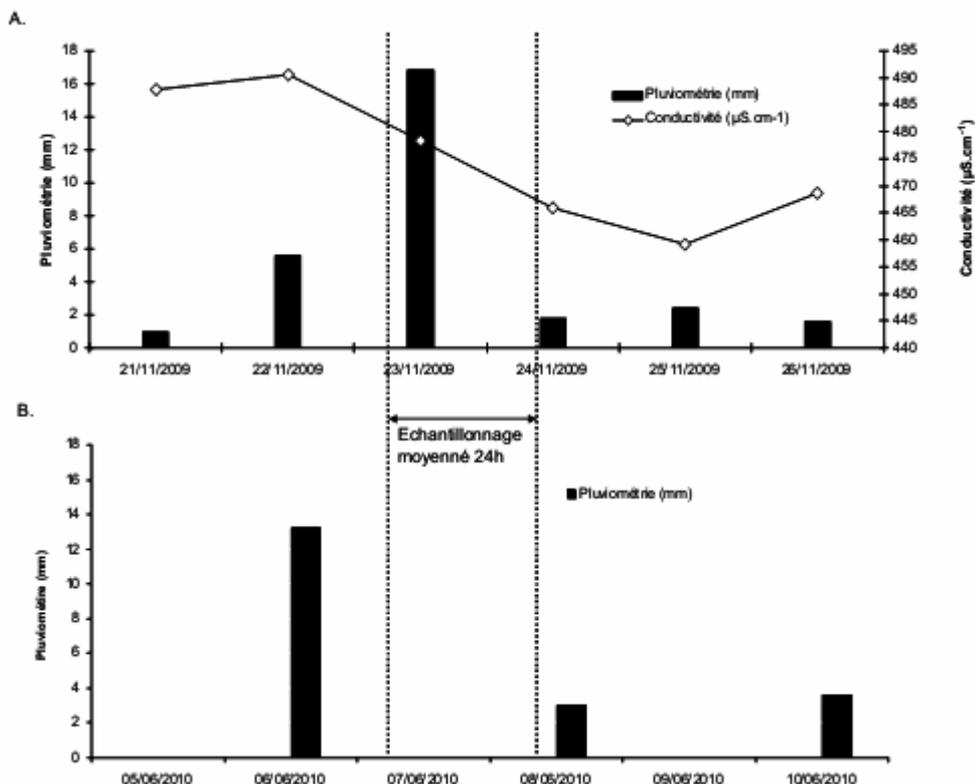


Figure 47 : Mesures de la pluviométrie journalière et de la conductivité pour le cours d'eau Selles lors de la période hivernale (A) et estivale (B).

◆ **Evolution comparée de la contamination des eaux en résidus médicamenteux d'origine humaine et animale**

Les analyses ont été menées sur les différents échantillons et pour l'ensemble des composés appartenant aux différentes classes (antibiotiques, anticancéreux, antiviraux, bêtabloquants, ...). Les résultats obtenus sont résumés, les rejets de la STEP Pont-Audemer échantillonnés lors de la campagne du continuum hospitalier, sont utilisés ici comme référence de source de contamination (Figure 48).

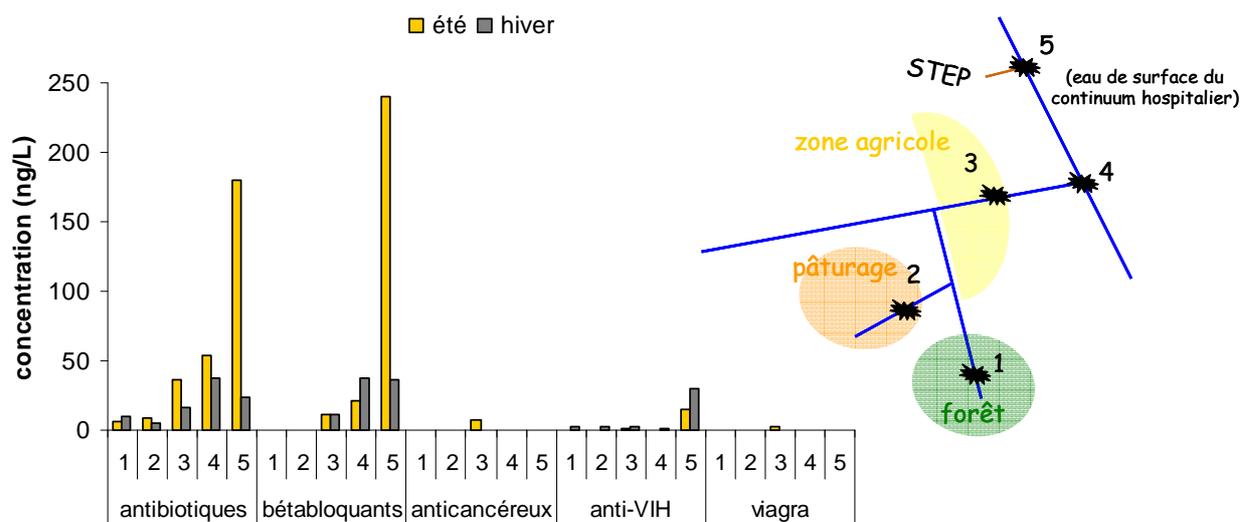


Figure 48 : contamination des eaux en antibiotiques, bêtabloquants, anticancéreux, anti-VIH et viagra le long d'un continuum agricole, en période estivale et hivernale.

Le long du continuum agricole, les antibiotiques et les bêtabloquants sont les composés d'origine humaine les plus fréquents et les plus abondants. Dans les eaux prélevées sur les sites amont 1 (Sebec) et 2 (Selles), l'absence de résidus médicamenteux d'origine humaine et la présence de faibles concentrations en antibiotiques témoignent d'un usage agricole (Figure 48, Annexe 4). On observe une augmentation globale de la contamination le long du continuum agricole, due et à la diversité des rejets auxquels s'ajoute l'effet cumulatif de la contamination par les molécules les plus persistantes, comme les bêta-bloquants. Le rejet de la STEP est le plus contaminé en particulier par les anti-VIH. On note peu de différences entre été et hiver (Figure 49) et les différences observées sur les rejets de STEP s'expliquent en été par l'analyse d'un échantillon ponctuel, avec un débit de la STEP de $5\text{m}^3.\text{s}^{-1}$, alors qu'en hiver l'analyse a été effectuée sur un échantillon moyenné 24 h avec un débit de la STEP de $10\text{m}^3.\text{s}^{-1}$, engendrant une plus forte dilution.

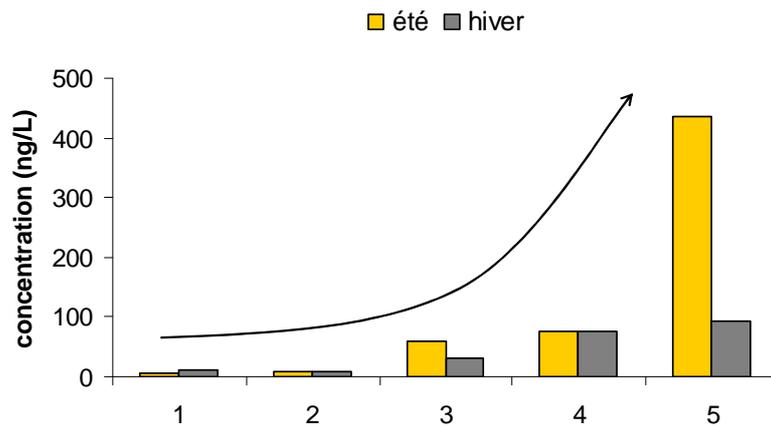


Figure 49: Concentration totale ($\Sigma 78$) en substances pharmaceutiques le long du continuum agricole, comparaison été/hiver

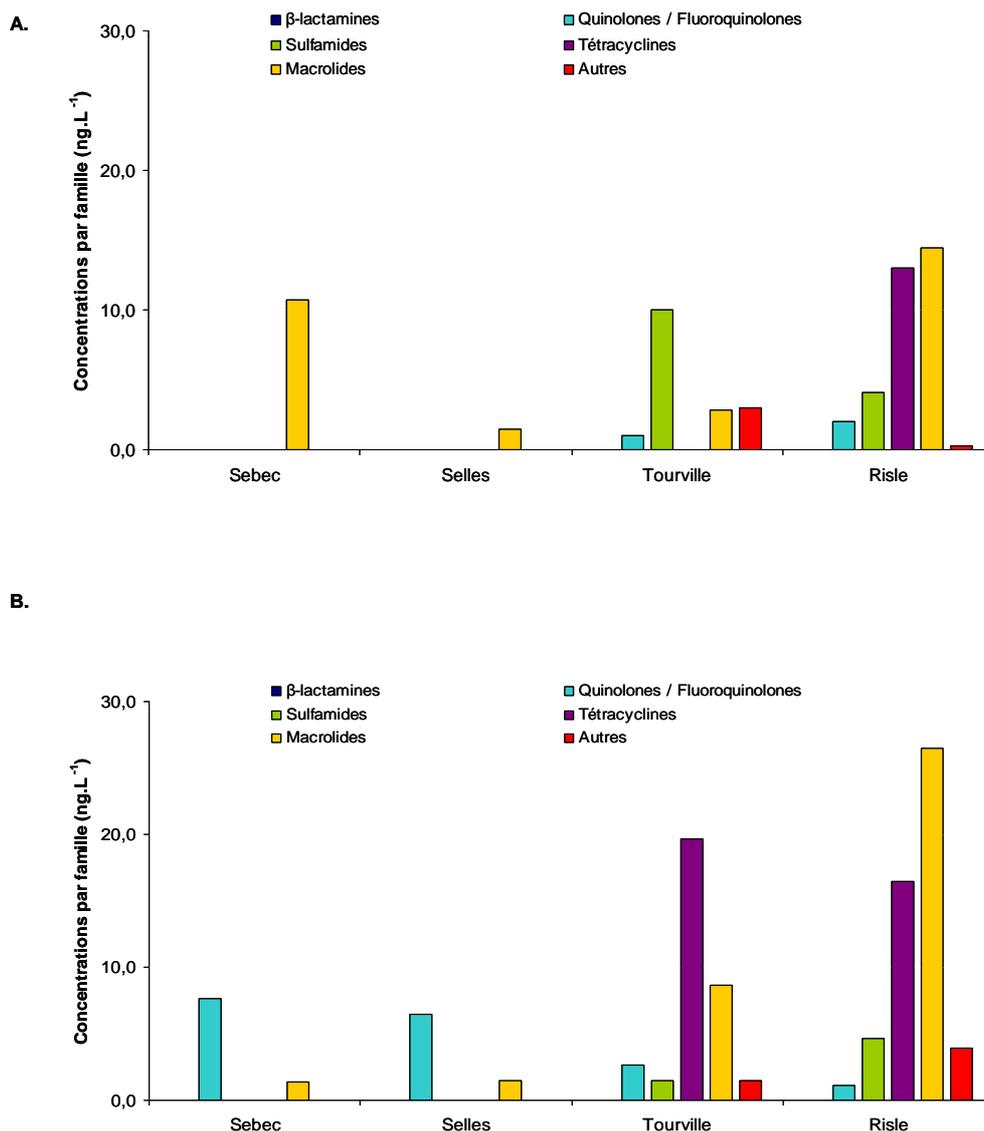


Figure 50 : Concentrations des différentes familles d'antibiotiques mesurées dans les eaux le long du réseau hydrographique en hiver (A) et été (B).

Pour les deux campagnes, le nombre d'antibiotiques détectés et leurs concentrations augmentent de l'amont (1 ng.L^{-1}) vers l'aval (22 ng.L^{-1}) avec le niveau d'anthropisation du bassin versant (Figure 50, Annexe 4). Comme dans les eaux du continuum hospitalier, les quinolones/fluoroquinolones, sulfamides et macrolides sont majoritairement retrouvés dans les eaux du continuum agricole en raison de leur persistance dans ces environnements (Figure 50). Pour les deux périodes, il n'existe pas de relation entre les prescriptions de l'exploitation agricole pilote et la contamination des eaux sur le site de la Selles : les antibiotiques présents dans l'eau ne correspondent pas aux prescriptions du cheptel. Lors de la période hivernale, la stabulation des bovins, et le stockage du fumier sur des sites étanches, expliquent ce résultat. En période estivale, la faible prescription d'antibiotiques ne permet pas de détecter ces molécules dans les eaux alors que les bovins sont en pâturage. Toutefois, une faible contamination (ng.L^{-1}) par des molécules les plus persistantes non prescrites dans l'exploitation est observée (quinolones, macrolides), probablement lié à des rejets de proximité (habitation).

◆ **Evolution de la population d'*Escherichia coli* et de la diversité spécifique des *Enterococcus* dans les eaux**

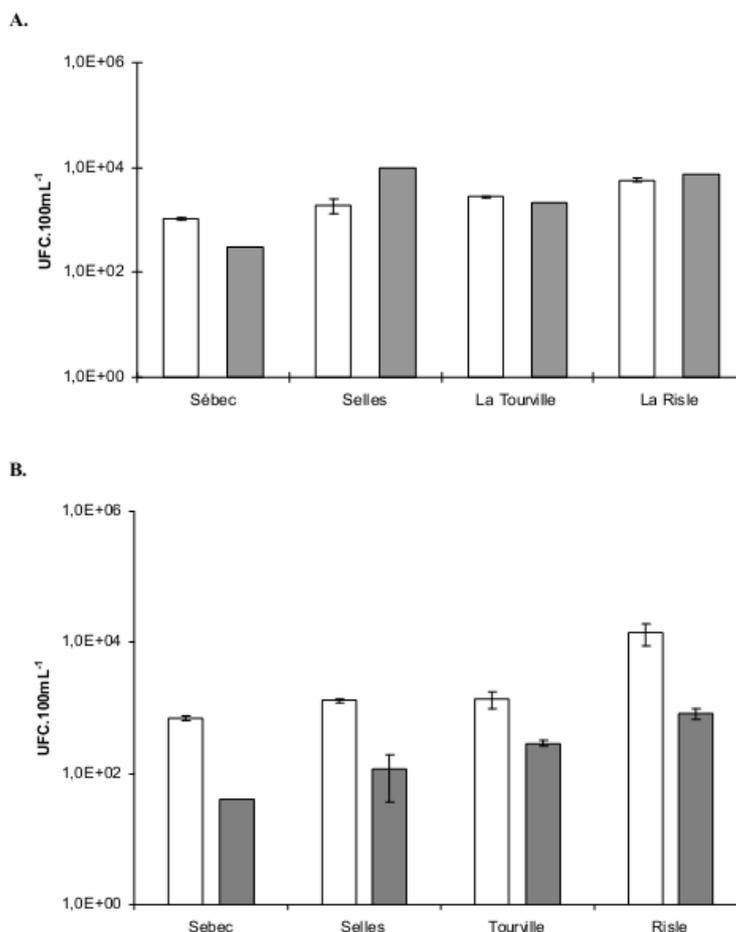


Figure 51 : Densités en *E. coli* (□) et entérocoques (■) dans les eaux, le long du continuum agricole : (A) période hivernale avec stabulation des bovins et (B) période estivale et pâturage.

En parallèle à cette contamination des eaux par des molécules antibiotiques, l'abondance en bactéries indicatrices de contamination fécale n'évolue pas significativement le long du continuum, à l'exception de la Risle en période estivale (Figure 51). Lors de cette campagne, la densité en *E. coli* est 10 fois plus élevée que celle des entérocoques indiquant un apport récent d'eau de ruissellement de zones pâturées. A ce niveau la contamination s'ajoute à celle de la Risle amont expliquant l'augmentation d'un demi-log en densité d'*E. coli*³ (Figure 51B). L'abondance en *E. coli* dans le tractus digestif des hommes et des animaux, étant 100 fois plus élevée que celle des entérocoques, et ce genre bactérien persistant plus longtemps dans les eaux, le rapport *E.coli*/ *Enterococcus* est un indicateur de l'âge de la contamination. Un rapport élevé indique une contamination récente (période estivale), un rapport proche ou inférieur à 1 une contamination passée (Selles période hivernale).

Hôte	Structure des populations d' <i>E. coli</i> (%)			
	A	B1	B2	D
Humain ¹	61,0	12,5	10,5	16,0
Bovin ²	27,4	58,3	2,8	11,5
Sanglier ³	2,5	10,1	38,0	49,4

¹ Duriez *et al*, 2001, ² Walk *et al*, 2007, ³ E. Denamur (communication personnelle)

Tableau 12 : Structure des populations d'*E. coli* chez l'homme, le bovin et le sanglier

³ Données seine aval 3 : 2·10² UFC .100mL⁻¹ en été ; 6·10² 100mL⁻¹ en hiver ;

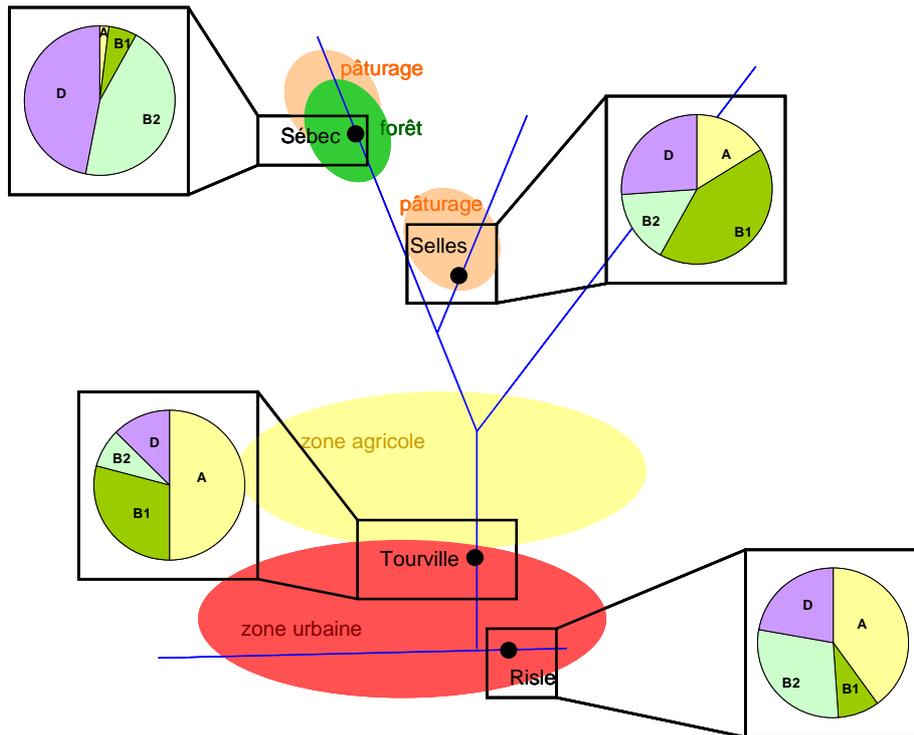
Période	Structure de la population d' <i>E. coli</i> (n/N)				Marqueurs de <i>Bacteroidales</i> (copies de gènes 16S pour 100mL)	
	A	B1	B2	D	HF 183	Rum-2-BAc
Hiver, stabulation des bovins	8/50	21/50	8/50	13/50	nd	5.1x10 ⁴
Eté, pâturage des bovins	15/52	28/52	1/52	8/52	< 3 10 ^{3 a}	4.7x10 ⁵

n : Nombre de souches appartenant au groupe phylogénétique, N : Nombre total de souches testées, nd aucune amplification, ^a détection moléculaire mais nombre de copies inférieur à la limite de quantification

Tableau 13 : Relation entre la structure des populations d'*E. coli* et la quantification des marqueurs humain (HF183) et ruminants (Rum-2-Bac) de *Bacteroidales* dans les eaux du site amont la Selles (2).

L'étude de la structure des populations d'*E. coli* sur la base de la distribution des 4 groupes phylogénétiques A, B1, B2 et D (Clermont et al, 00), montre que les populations présentes dans les eaux sont différentes le long du continuum (Figure 52). Pour les deux campagnes, les souches d' *E. coli* isolées du site amont, (Selles), à proximité de l'exploitation de 450 bovins, appartiennent principalement au groupe phylogénétique B1, groupe majoritaire chez les bovins (Tenailon *et al*, 2010), y compris en période hivernale comme le montre l'absence du marqueur *Bacteroidales* humain (Tableau 12 et Tableau 13). Les apports en bactéries fécales d'origine bovine s'expliquent par l'effet des eaux de ruissellement sur les bouses résiduelles qui sont restées sur les aires de pâturage, qui s'additionnent probablement à des bactéries fécales provenant d'animaux sauvages. Ainsi, la présence plus importante de souches d'*E. coli* appartenant aux groupes phylogénétiques B2 et D dans les eaux du Sébec témoignerait d'une contamination fécale par des sangliers (E. Denamur, communication personnelle). Lors de la période hivernale et de stabulation des bovins, la proportion de souches d'*E. coli* appartenant au groupe phylogénétique A, majoritaire chez les populations d'*E. coli* du tractus digestif de l'Homme, augmente de l'amont vers l'aval du réseau hydrographique. En période estivale, on observe sur tous les sites du continuum un enrichissement en souches d'*E. coli* du groupe phylogénétique B1, qui s'explique par une contamination plus importante des eaux de ruissellement des zones pâturées par les bovins. Ainsi les changements dans la structure des populations d'*E. coli* dans les eaux le long du continuum reflètent l'importance relative de la pression anthropique liée aux usages agricoles et à la pression démographique, exercée sur le bassin versant (Figure 52).

A.



B.

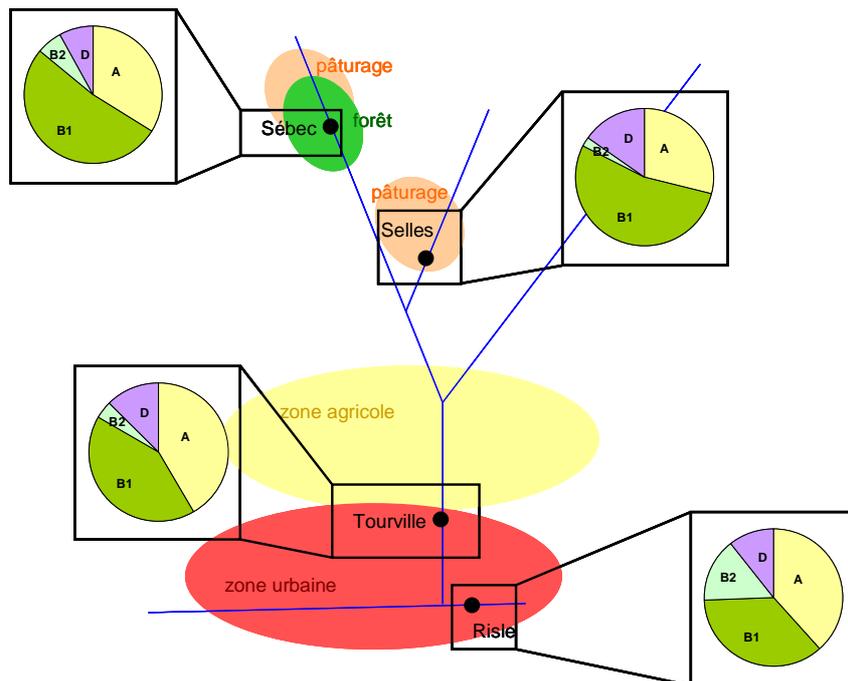


Figure 52: Evolution de la structure des populations d'*E. coli* le long du continuum agricole en périodes hivernale (A) et estivale (B)

Lors de la campagne estivale, le dénombrement des Entérocoques confirme les résultats obtenus avec *E.coli*. En effet, la spéciation des entérocoques circulant dans les eaux évolue le long du continuum avec un enrichissement en *E. faecalis* de l'amont (Sébec, Selles) vers l'aval (Tourville, Risle) lié aux apports d'origine humaine qui augmente avec l'urbanisation, sans exclure la possibilité d'apports d'origine animale. Les espèces *E. hirae* (37%) et *E.villorum* (6%) sont spécifiquement retrouvées dans les eaux de la Selles. Ces espèces sont considérées

comme environnementales, non liées à des apports humains ou animaux. La présence d'autres espèces *E. avium*, *E.gallinarum*, *E. casseliflavus* qui sont plus rarement isolées chez l'Homme que *E. faecalis* et *E. faecium* suggère aussi un apport d' *Enterococcus* spécifiquement d'origine environnementale. L'espèce *E. casseliflavus* qui produit un pigment jaune a été rapportée comme plus résistante aux effets de la lumière solaire et l'espèce *E. hirae* comme étant capable de se multiplier en conditions basses de température (Figure 53) Cet effet de la lumière expliquerait probablement l'abondance moins importante des entérocoques observée dans les eaux en période estivale notamment à l'amont du continuum (Figure 51) où la rivière est moins profonde et plus exposée à la lumière solaire.

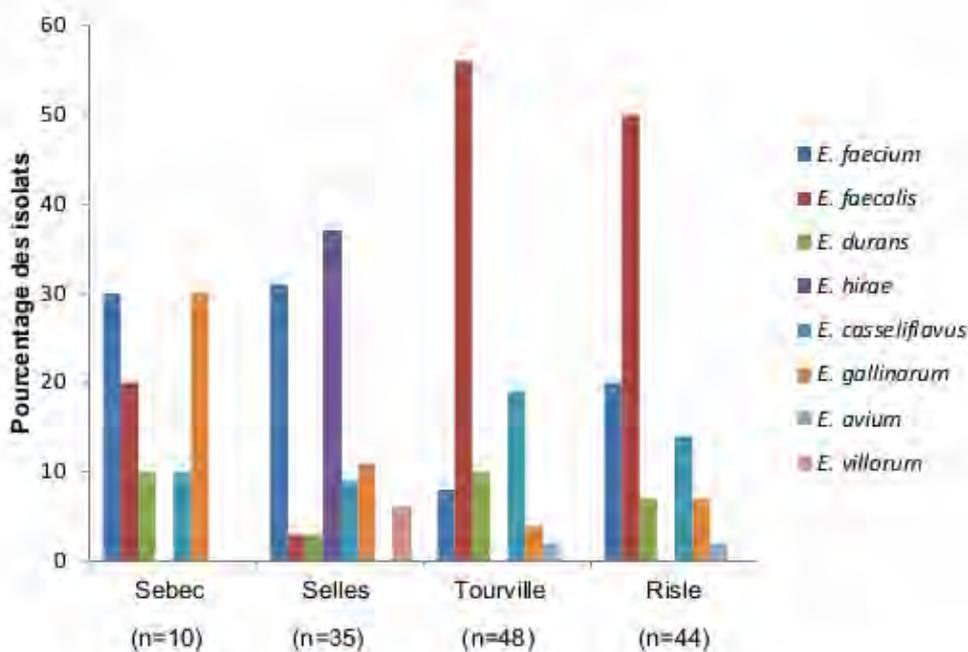


Figure 53 : Spéciation des entérocoques (exprimé en pourcentage des isolats) le long du continuum agricole. (n : nombre de souches étudiées), période estivale.

◆ **Recherche de souches d'*E.coli* entéropathogènes :**

Les 293 souches isolées le long du continuum agricole, lors de ces deux campagnes ont été analysées. La détection moléculaire de dix gènes impliqués dans les différents pathotypes a montré la présence de souches d'*E.coli* pathogène pour l'homme (STEC) à l'amont du réseau agricole sur les sites impactés par les activités agricoles dont deux souches productrices de shigatoxine (Tableau 14). Il est à noter que ces 2 STEC sont du même clone et ont été isolés à des périodes différentes au même endroit, en aval d'une exploitation agricole. Une caractérisation par « Multilocus Sequence Typing » et identification de leur O-type à des fins épidémiologique a permis de conclure que ce clone est présent dans le troupeau.

Sites	Nombre de souches analysées	Pathotypes d' <i>E. coli</i>
Selles	99	1 STEC + 1 STEC
Tourville	96	1 aEPEC
Risle	93	1 EAEC, 1 DAEC, 1 aEPEC + 1 EPEC

Tableau 14 : *E. coli* entéropathogène : (EPEC), les *E. coli* entérotoxigéniques à adhésion diffuse (DAEC), les *E. coli* entéro-hémorragiques (EHEC), les *E. coli* entéroagréatives (EAEC). *E.coli* productrice de shiga toxine.

◆ **Evolution de la contamination en *Escherichia coli* et *Enterococcus* antibiotorésistante et flux de gènes correspondant**

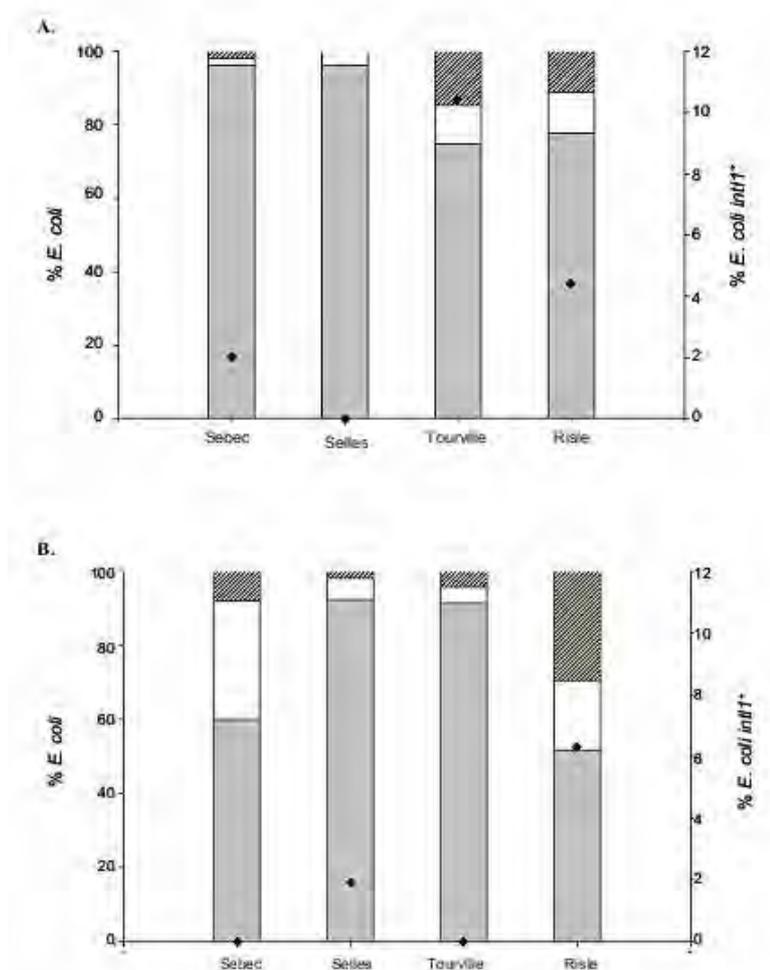


Figure 54: Pourcentage d'isolats d'*E. coli* sensibles (□), résistants à un ou deux antibiotiques (□), multi-résistants aux antibiotiques (▨), et portant le gène de l'intégrase de classe 1 *intI1* (●) dans les eaux du continuum agricole (A) : en période hivernale et la stabulation, (B) période estivales et pâturage des bovins.

Le long du continuum, la proportion de souches d'*E. coli* multi-résistante à plus de 3 antibiotiques augmente le long du gradient d'urbanisation pour les deux campagnes, avec un effet plus important en été sur le site aval (Risle). Le pourcentage de souches portant des intégrons de classe 1 augmente le long du continuum et s'explique principalement par la contribution de souches d'origine humaine (Oberlé et al, 2012, Koczura et al, 2011). Ainsi, la diminution importante en été (de 11% à 0%) (Figure 54), sur le site de Tourville, exutoire de la zone agricole, est due à un apport de souches d'origine bovine en période de pâturage.

A l'amont, dans les eaux de la Selles (site 2), les isolats d'*E. coli* sont rarement résistants aux antibiotiques en raison de la faible prescription de l'exploitation pilote, toutefois sur ce site des souches entéropathogènes ont été isolées. Sur le second site amont (site 1, Sebec), la présence de 40% de souches résistantes à au moins 1 ou deux antibiotiques est probablement lié aux prescriptions vétérinaires des bovins en pâturage, dans des exploitations qui ne s'inscrivent pas dans une politique d'agriculture raisonnée. A l'aval sur le site 4 « Risle », les apports en bactéries antibiotorésistantes des eaux du continuum s'additionne à une contamination majoritairement d'origine humaine des eaux de la Risle amont, dont le bassin versant est plus urbanisé.

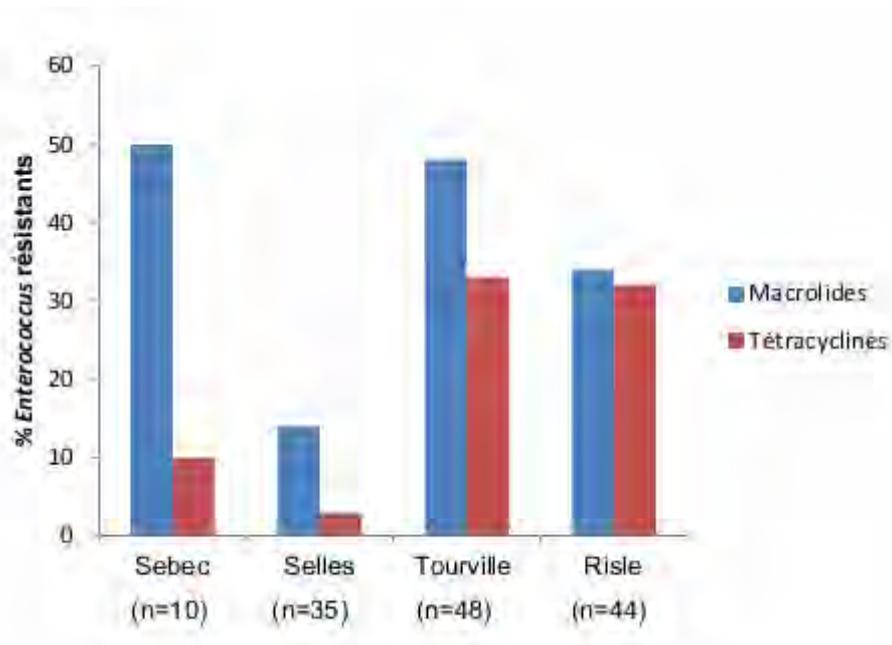


Figure 55 : Pourcentages d'isolats d'*Enterococcus* résistants aux macrolides et tétracyclines le long du continuum agricole. (n, nombre de souches étudiées). Campagne estivale.

(A)

	Gènes de résistance aux macrolides		
	<i>erm</i>	<i>mef</i>	autre mécanisme
Sebec (n=5)	0	3	2
Selles (n=5)	1	2	3
Tourville (n=20)	0	3	17
Risle (n=15)	0	1	14

(B)

	Gène de résistance à la tétracycline	
	<i>tetM</i>	autre mécanisme
Sebec (n=1)	1	
Selles (n=1)	1	
Tourville (n=14)	11	3
Risle (n=13)	8	5

Tableau 15: Détection moléculaire de gènes de résistances chez les souches d'*Enterococcus* résistants aux (A) macrolides (*erm*, *mef*) et à la (B) tétracycline (*tetM*) isolées dans les eaux du continuum agricole en période estivale (n désigne le nombre de souches testées).

Le long du continuum au sein de la population d'entérocoques, le pourcentage de souches résistantes aux macrolides et tétracyclines augmente avec à nouveau un pourcentage plus élevé sur le site du Sébec, qu'il faudra le confirmer avec un effectif plus important de souches (Figure 55). La détection moléculaire des gènes correspondant montre que sur les deux sites amont (Sébec, Selles), la résistance aux macrolides des souches d'*Enterococcus* est codée par le gène *mef*, alors que des gènes différents expliquent ce phénotype chez les souches isolées des sites aval. La résistance à la tétracycline, évoluent différemment avec une augmentation de l'amont vers l'aval de souches portant le gène *tetM* qui s'expliquerait par une contribution plus importante d'Entérocoques d'origine humaine (*E. faecalis*, Tableau 15).

◆ Conclusions Perspectives

Le long du continuum l'évolution quantitative et qualitative de la contamination des eaux par les molécules médicamenteuses, notamment les antibiotiques, reflète le gradient d'anthropisation, plus précisément les contributions respectives croissantes de la pression exercée par les exploitations bovines et la densité humaine de l'amont vers l'aval.

Comme dans les eaux du continuum hospitalier, les antibiotiques les plus fréquemment retrouvés sont les molécules les plus persistantes mais les concentrations en antibiotiques sont trop faibles pour exercer une pression de sélection sur les microorganismes.

Il doit ainsi être possible d'extrapoler les données acquises sur la contamination des eaux par les antibiotiques à d'autres résidus médicamenteux aux comportements équivalents une fois rejetés dans les eaux (hydrophobicité, persistance).

En parallèle à cette contamination chimique, pour des niveaux équivalents d'abondance en bactéries fécales, la structure des population d' *E.coli* et la diversité au sein des populations d'*Enterococcus*, est aussi dépendante, et donc informative, de l'origine humaine ou animale de la contamination.

Au sein de ces populations, la proportion de bactéries antibiorésistantes et le flux de gènes correspondant, semblent dépendre des pratiques d'élevages, une pratique d'agriculture raisonnée générant moins de bactéries antibiorésistantes dans les eaux.

Dans la perspective d'extrapoler cette étude à d'autres bassins versants, afin d'établir des bilans voire de modéliser, il est désormais possible de définir les facteurs déterminant la contamination en antibiotiques et en bactéries antibiorésistantes des eaux. Au-delà de la pluviométrie, l'usage du bassin versant et les prescriptions vétérinaire ou humaine, cette étude démontrent l'importance d'autres facteurs: (i) la dégradation des molécules dans les organismes et/ou la persistance des molécules dans les environnements aquatiques, (ii) les périodes de stabulations versus pâturage (iii) les pratiques agricoles.

En perspective, ce travail s'enrichirait de données équivalentes acquises en période d'orage, et d'une comparaison avec des sites aux pratiques agricoles différentes.

Ces travaux ont fait l'objet d'une publication en cours de rédaction (Oberlé et al, en cours)

III-4-3 Devenir des populations d'*E. coli* antibiorésistantes le long du transect « Risle- embouchure- estuaire ».

◆ **Objectif et contexte**

Dans la zone de l'embouchure de l'estuaire, où la qualité microbiologique des eaux influence celle des moules de baie de Seine, il existe une contamination en bactéries fécales notamment en bactéries antibiorésistantes des eaux en provenance de la Risle (Touron et al, 07 ; Laroche et al, 09). Cet affluent de la Seine, débouche dans le bouchon vaseux de l'estuaire, une zone extrêmement turbide avec un mélange eau douce - eau salée. L'ensemble des eaux provenant du bassin versant de la Risle sont rejetées dans cet affluent dont le fonctionnement aval, complexe peut être apparenté à celui d'un estuaire annexe, participant à la dynamique de l'estuaire de Seine. Dans les environnements, le devenir des populations d'*E. coli* est dépendante de leur aptitude à surmonter les stress abiotiques (salinité, oligotrophie, température) et la prédation par les protozoaires. Une fois rejetées dans les eaux, les bactéries fécales perdent progressivement leur cultivabilité puis entrent dans un état physiologique spécifique, état viable non cultivable avant la mort cellulaire. L'adhésion aux particules organiques ou organo-minérales est aussi un facteur déterminant sur la dynamique spatiale de la contamination ; non seulement en terme de ressource en matière organique, de protection contre la prédation, mais également car elle influe sur la vitesse de chute. En estuaire, la dynamique des bactéries fécales dans la colonne d'eau sera étroitement liée à la dynamique hydro sédimentaire notamment aux processus de dépôt/érosion ; les bactéries associées aux particules se déposant sur les vasières. Une fois piégées dans les sédiments, elles perdent leur cultivabilité tout en libérant leur contenu génétique susceptible d'être alors transféré aux communautés autochtones avant qu'il ne disparaisse (Berthe et al, 08 ; voir partie III-6-1-2 de ce projet et le projet Rhapsodis). L'objectif de cette étude, qui est complémentaire avec le projet FLUMES, est de suivre la dynamique de contamination de la population d'*E. coli* antibiorésistantes et identifier les zones de dépôt de ces bactéries, le long du transect STEP « Pont-Audemer - Risle- Embouchure de l'estuaire » dans une zone soumise à la dynamique de marée.

◆ **Stratégie d'échantillonnage**

Les campagnes de prélèvements ont été effectuées le long du transect « STEP Pont Audemer – Risle – Embouchure », afin (i) d'évaluer le devenir des bactéries dans un hydrosystème où la dynamique sédimentaire est prédominante mais également (ii) évaluer l'impact des rejets de la Risle sur l'estuaire. Cette étude a été menée en collaboration avec les hydrosédimentologues et les équipes de microbiologie (INSERM U722, UMR M2C). Deux campagnes ont été menées : Zootrans 1 (02/09) réalisée en période de faible pluviométrie (10 mm) avec un débit $<600 \text{ m}^3 \cdot \text{s}^{-1}$ et Zootrans 2 (08/10) consécutive à une période pluvieuse (30 mm d'eau sur les 3 jours précédents la campagne) en période d'étiage ($230 \text{ m}^3 \cdot \text{s}^{-1}$). Les prélèvements de l'embouchure ont été effectués sur des bateaux de l'INSU dans le cadre des missions coordonnées par Sami Souissi. Lors de la campagne Zootrans 2, les prélèvements ont été effectués avec un suivi de la masse d'eau des rejets de STEP jusqu'à l'embouchure, avec en parallèle un prélèvement dans les des vasières qui sont des zones de dépôt des particules et de leurs contaminants associés. Ceci a été réalisé afin de localiser les zones susceptibles d'être contaminées par des souches d'*E. coli* antibiorésistantes (Figure 56). Les deux campagnes ont été effectuées en fin de jusant afin d'être dans des conditions permettant de suivre le panache de la Risle jusque dans l'embouchure de l'estuaire.



Figure 56 : Stratégie d'échantillonnage des campagnes Zootrans : (●) points de prélèvements ; ▲, station d'épuration ; (■) barrage de Pont-Audemer.

◆ **Dynamique de contamination en *E. coli* de l'eau et des vasières sur le transect « Step - Risle - Zone de l'embouchure » : antibiorésistance et structure des populations.**

La contamination des eaux en *E. coli* diminue d'un Log à 3,5 km à l'aval du rejet de la station d'épuration puis se stabilise sur une distance de 5 km. L'absence de décroissance sur cette section s'explique probablement par un équilibre entre les apports diffus et/ou les 2 rejets de STEP's situées à l'aval (Figure 56), et le taux de disparition des *E. coli* cultivables (Tableau 16). Lors de la campagne hivernale (Février 09, niveau épidémiologique élevé, bovins en stabulation et pluviométrie faible), la concentration en *E. coli* dans les effluents de STEP's est plus faible d'un log, comparée à celle de la campagne d'Août 2010 (période de pâturage et consécutive à une période de forte pluviométrie).

Si dans les eaux de surface, le niveau de contamination est équivalent pour les deux campagnes, l'analyse de la structure des populations montre que la population d'*E. coli* ne provient pas du même réservoir. La diminution de la proportion d'*E. coli* du groupe phylogénétique A, en parallèle à l'augmentation des souches du groupe phylogénétique B1, indique un apport de bactéries fécales d'origine bovine. Lors de cette campagne, la pluviométrie et l'activité de pâturage estivale du bassin versant expliqueraient un apport d'eaux de ruissellement enrichies en *E. coli* du phylogroupe B1 majoritaire chez les bovins, et dont certains type épidémiologiques se maintiennent plus longtemps dans les environnements aquatiques (Ratajczak, 2010).

La proportion de souches d'*E. coli* antibiorésistantes circulant dans les eaux est plus importante en période hivernale, correspondant à une période épidémique plus élevée et une contamination en *E. coli* d'origine humaine plus importante. Pour les deux campagnes, le niveau de contamination en souches antibiorésistantes n'évolue pas significativement le long du transect 'Risle – Honfleur'. En revanche, dans les eaux de l'estuaire de Seine, une différence importante est observée entre les deux prélèvements. En Février 2010 (concentration en MES élevée en surface), la structure des populations et l'augmentation de la proportion de souches antibiorésistantes suggèrent un apport d'origine humaine à ce niveau de l'estuaire, confirmant les résultats déjà obtenus dans le cadre du projet Seine Aval 3. En Août 2010, on observe une diminution de la proportion de souches antibiorésistantes (faible concentration en MES).

Lors de la campagne estivale, en parallèle à un suivi des masses d'eau, une analyse des sédiments des vasières où se déposent les particules facilement décantables, a montré que la vasière positionnée à 3,5 km était contaminée par des *E. coli* antibiorésistantes cultivables.

Sites	Date Echantillon	MES mg/L	E. coli (UFC/100mL) (UFC/g)	% Antibio-résistance ¹	A/B1	Phylogroupes d' <i>E. coli</i>			
						A	B1	B2	D
Sortie de STEP (Pont Audemer) PK = 1	02/09 surface	-	2,6 10 ³	26,0	2,1	60% (30/50)	28% (14/50)	8% (4/50)	4% (2/50)
	08/10 surface	13,4	1,2±0,1 10 ⁴	28,6	3,1	64%*** (31/49)	20%*** (10/49)	16% (8/49)	0% (0/49)
La Risle (Foulbec) pK= 3,5	02/09 surface	370	7,0 10 ²	26,0	1,8	36%* (18/50)	20% (10/50)	24%*** (12/50)	20% (10/50)
	08/10 surface	313	1,3 ±0,3 10 ³	29,1	0,7	29% (14/48)	40% (19/48)	12% (6/48)	19% (9/48)
Vasière pK = 3,5	08/10 sédiment	-	4,0 10 ²	20,8	0,17	10,4% (5/48)	60,4% (29/48)	14,6% (7/48)	14,6% (7/48)
La Risle Embouchure pK= 7	02/09 surface	1110	2,0 10 ²	19,6	1,15	50% (23/46)	43%*** (20/46)	3%** (1/46)	4%* (2/46)
	08/10 surface	457	1,1±0,4 10 ²	26,0	0,34	18% (9/50)	52% (26/50)	10% (5/50)	20% (10/50)
	08/10 fond	767	1,0 10 ²	22,0	0,67	28% (14/50)	42% (21/50)	26% (13/50)	4% (2/50)
Vasière pK = 7	08/10 sédiment	-	< 5	-	-	-	-	-	-
Honfleur Embouchure estuaire de seine	02/09 surface	740	1,5 10 ²	38,2	3,5	62%* (21/34)	18% (6/34)	6% (2/34)	15% (5/34)
	08/10 surface	99	1,6 ±0,9 10 ²	10,0	0,2	13% (9/67)	63% (42/67)	18% (12/67)	6% (4/67)
	08/10 fond	1435	1,2 10 ²	26,0	0,17	10,9% (5/46)	65,2 (30/46)	19,6% (9/46)	4,3% (2/46)

¹ : % de résistance à au moins un antibiotique

Tableau 16 : Dynamique de la contamination de l'eau et des vasières en *E. coli* le long de transect « STEP-Risle- Embouchure de Seine » : antibiorésistance et structure des populations

◆ Evolution du phénotype de résistance d'*E. coli* le long du transect « STEP-Risle- Embouchure »

Une comparaison de la proportion de souches d'*E. coli* résistantes à chacun des 17 antibiotiques testés dans cette étude, en fonction de la période échantillonnée, est présentée dans le Tableau 17. Les résistances majoritaires sont celles à l'amoxicilline, la ticarcilline, la tétracycline, le chloramphénicol, la kanamycine et aux Triméthoprime + sulfaméthoxazole. Les souches résistantes à la streptomycine sont majoritairement retrouvées l'été. La proportion de bactéries antibiorésistantes diminue le long du transect, sauf pour les résistances à la tétracycline et au chloramphénicol (majoritairement à usage vétérinaire) qui augmentent dans l'embouchure en période hivernale. Ces résultats s'expliquent car les profils de résistance correspondent majoritairement à des souches d'origine humaine qui résistent moins longtemps dans les milieux aquatiques (Ratajczak, 2010), associé à un apport probable au niveau de l'embouchure (STEP de Tancarville, déversoir d'orage ?). En été, la proportion des souches antibiorésistantes est beaucoup plus faible et s'explique d'une part par une prescription humaine moins importante (période épidémiologique plus faible), et d'autre part par un apport de souches *E. coli* B1 d'origine bovine non résistantes, par les eaux de ruissellement.

Antibiotiques	STEP		Risle		Embouchure		Honfleur	
	^a Total (N=50)	^b Total (N=49)	^a Total (N=50)	^b Total (N=48)	^a Total (N=46)	^b Total (N=50)	^a Total (N=34)	^b Total (N=50)
Pénicillines								
Amoxicilline	28	14,3	10	14,6	15	6,0	12	6,0
Amoxicilline +ac	8	2,0	10	4,2	2	0,0	6	0,0
Ticarcilline	20	14,3	8	10,4	11	6,0	12	6,0
Ticarcilline +Ac	2	2,0		0,0	9	0,0	12	0,0
Céphalosporines								
Céfalotine	4	0,0	0	6,3	0	0,0	3	0,0
Ceftazidine	0	0,0	0	0,0	0	0,0	0	0,0
Céfotaxime	0	0,0	0	2,1	0	0,0	3	0,0
Carbapénème								
Imipénème	0	0,0	0	0,0	0	0,0	0	0,0
Quinolones & fluoroquinolones								
Ciprofloxacine	4	8,2	0	4,2	2	0,0	0	2,0
Acide nalidixique	4	12,2		6,3	7	0,0	0	0,0
Tétracyclines								
Tetracycline	32	18,4	46	16,7	24	6,0	56	8,0
Phénicolés								
Chloramphénicol	16	12,2	22	10,4	7	4,0	35	4,0
Sulfamides								
Triméthoprime + sulfaméthoxazole	10	8,2	6	4,2	9	6,0	9	6,0
Aminosides								
Gentamicine	0	4,1	0	2,1	2	0,0	0	0,0
Amikacine	0	-	0	-	0	-	0	-
Kanamycine	12	6,1	0	2,1	2	0,0	0	0,0
Streptomycine	0	16,3	10	10,4	9	8,0	0	11,1

Tableau 17 : Proportion d'*E. coli* résistantes à chaque antibiotique. ^a période hivernale (Février 2009) et ^b période estivale et pâturage après une période pluvieuse (Août 2010).

◆ Evolution de la proportion de l'antibiorésistance des souches d'*E. coli* le long du continuum « Risle – Embouchure » en fonction de leur attachement aux particules

Le Tableau 18 montre l'évolution de la proportion des souches résistantes à chaque antibiotique en fonction de leur attachement aux particules, et donc de leur vitesse de chute. Trois classes de particules ont été séparées après décantation de 30 minutes en ampoule à décanter: (i) la fraction décantable de 3 minutes essentiellement composée de particules minérales ; (ii) la fraction décantée après 30 min, constituée de particules de 20 à 50 µm, souvent minérales, de floccs de 80 à 100 µm et de nombreuses diatomées de 30 à 40 µm et (iii) la fraction non décantée après 30 min qui est constituée de petites particules dispersées de 5 à 10 µm avec de la matière organique et des microflocs de 15 µm (Figure 57).

La proportion de bactéries antibiorésistantes majoritairement retrouvées le long du transect (Tableau 17), associées à chaque classe de particules, a été évaluée dans des échantillons d'eaux prélevés le long du continuum pour les deux campagnes. Le Tableau 18 montre que la distribution des bactéries antibiorésistantes, en fonction de leur attachement aux particules et donc de leur vitesse de chute, évolue le long du continuum et différemment pour les deux campagnes. Ce phénomène est remarquable sur le site de Honfleur, lorsque les eaux sont

turbides (740 mg.L⁻¹, période hivernale) où on observe une redistribution des bactéries antibiorésistantes en faveur des 3 classes de particules. En étiage avec une faible concentration en MES (99 mg.L⁻¹), seules les *E. coli* associées aux particules non décantables restent en surface. Les souches associées aux deux autres fractions ont décanté, expliquant alors le pourcentage plus important de bactéries résistantes aux antibiotiques en profondeur (26% vs 10%, Tableau 16).

La concordance entre le gradient de concentration en MES (surface – fond) et celui des bactéries antibiorésistantes suggèrent que la dynamique des *E. coli* dans la colonne d'eau accompagne la dynamique particulaire en s'associant probablement de façon passive aux particules.

Antibiotiques	Risle				Embouchure				Honfleur			
	Total (N=48)	Nd	I	D	Total (N=50)	Nd	I	D	Total (N=50)	Nd	I	D
Amoxicilline ^b	14,6	13,3	13,3	18,0	6,0	0,0 ^a	0,0 ^a	11,1 ^a	6,0	12,5 ^a	0,0 ^a	0,0 ^a
Amoxicilline ^c	10	10	16	nd	15	20	29	24	12	17	22	20
Ticarcilline ^b	10,4	4,1	11,1	18,0	6,0	0,0 ^a	0,0 ^a	11,1 ^a	6,0	12,5 ^a	0,0 ^a	0,0 ^a
ticarcilline ^c	8	10	24	nd	11	20	23	18	12	17	13	20
Tétracycline ^b	16,7	6,1	6,7	18,0	6,0	0,0 ^a	0,0 ^a	11,1 ^a	8,0	25,0 ^a	0,0 ^a	0,0 ^a
Tetracycline ^c	46	38	19	0	24	25	35	39	56	25	11	20
Chloramphénicol ^b	10,4	2,0	4,4	10,0	4,0	0,0 ^a	0,0 ^a	0,0 ^a	4,0	0,0 ^a	0,0 ^a	0,0 ^a
Chloramphénicol ^c	22	18	5	0	7	10	15	27	35	18	5	0
Triméthoprime + sulfaméthoxazole ^b	4,2	0,0	6,7	18,0	6,0	0,0 ^a	0,0 ^a	0,0 ^a	6,0	12,5 ^a	0,0 ^a	0,0 ^a
Triméthoprime + sulfaméthoxazole ^c	6	0	8	0	9	0	15	12	9	8	17	20
Streptomycine ^b	10,4	2,0	13,3	18,0	8,0	0,0 ^a	0,0 ^a	11,1 ^a	11,1	12,5 ^a	0,0 ^a	0,0 ^a

Tableau 18: Pourcentage d'*E. coli* résistantes à plusieurs antibiotiques en fonction de leur association aux particules lors de la campagne de Aout 2010. % d'*E. coli* résistantes dans la fraction totale, **Nd** : % d'*E. coli* résistantes associées à la fraction non décantable, **I** : % d'*E. coli* résistantes associées à la fraction décantable 30 min, **D** : % d'*E. coli* résistantes associées à la fraction décantable 3 min ^a : % calculé sur un faible nombre de souches (0<N<9) ; ^b période estivale et pâturage après une période pluvieuse (Août 2010) et ^c période hivernale (Février 2009).

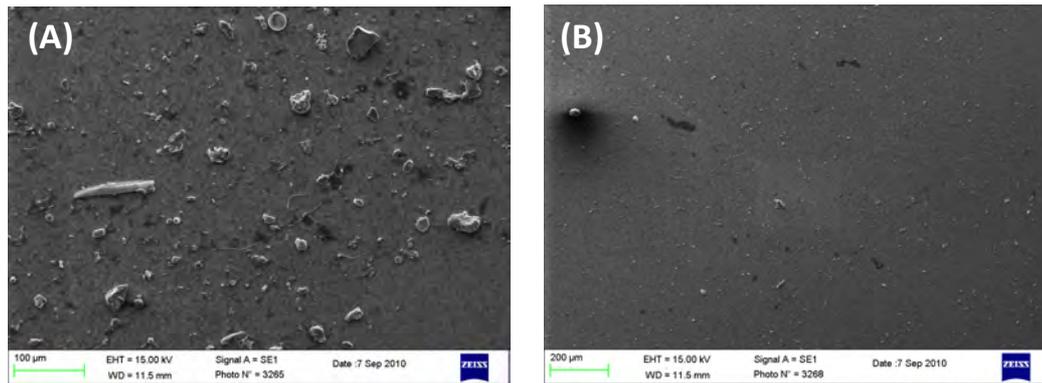


Figure 57 : Exemple du fractionnement réalisé sur Foulbec : (A) la fraction décantée après 30min est constituée de particules de 20 à 50 µm, souvent minérales, de floccs de 80 à 100 µm et de nombreuses diatomées de 30 à 40 µm ; (B) la fraction non décantée après 30 mn est constituée de petites particules dispersées de 5 à 10 µm avec de la matière organique et des microflocs de 15 µm.

◆ **Conclusions et perspectives**

La proportion de souches d'*E. coli* antibiorésistantes circulant dans les eaux n'évolue pas significativement le long du transect 'Risle – Honfleur'. Le phénotype de résistance et la structure des populations d'*E. coli* montrent qu'en période hivernale, la contamination d'origine humaine est majoritaire, alors qu'en période estivale un évènement pluvieux génère un apport conséquent de bactéries fécales d'origine bovine. Une fois rejetées dans les eaux, les bactéries antibiorésistantes s'associent aux trois classes de particules, et accompagnent la dynamique sédimentaire, une partie d'entre elles décantant sur les vasières. Dans les eaux où la concentration pondérale en MES est élevée, la zone du bouchon vaseux, on observe une corrélation entre la répartition des bactéries dans la colonne d'eau et la dynamique des matières en suspension ; les bactéries associées aux particules décantables se concentrant dans le fond en période de jusant.

En perspective, il serait intéressant de quantifier la contribution pondérale respective de ces trois classes de particules dans les échantillons d'eaux afin de modéliser le transfert des *E. coli*, dont les *E. coli* antibiorésistantes dans l'estuaire, et de définir de façon prédictive la zone et plus précisément les vasières vulnérables à une contamination en bactéries fécales. De même, il serait intéressant de rechercher les gènes de résistance aux antibiotiques dans les vasières pour lesquelles aucune *E. coli* cultivable n'a été détectée, afin d'étendre cette notion de vulnérabilité à une contamination par un apport de gènes codant pour des résistances aux antibiotiques, mais aussi des facteurs de virulence, susceptibles d'être transférés aux communautés autochtones.

Enfin, l'étude des modalités d'attachement bactéries – particules en fonction de la turbidité, notamment dans un flocculateur (projet FLUMES, flocculateur FLOC SIM), permettrait de mieux comprendre leur rôle mais aussi l'impact de la dynamique sédimentaire, deux facteurs déterminants pour leurs conditions de survie en milieu estuarien.

III-4-4 Contamination en antibiotiques et bactéries antibiorésistantes, présence de souches pathogènes en estuaire de Seine

◆ Contamination microbiologique et en antibiotiques des eaux de l'estuaire de Seine. Rappels des travaux antérieurs

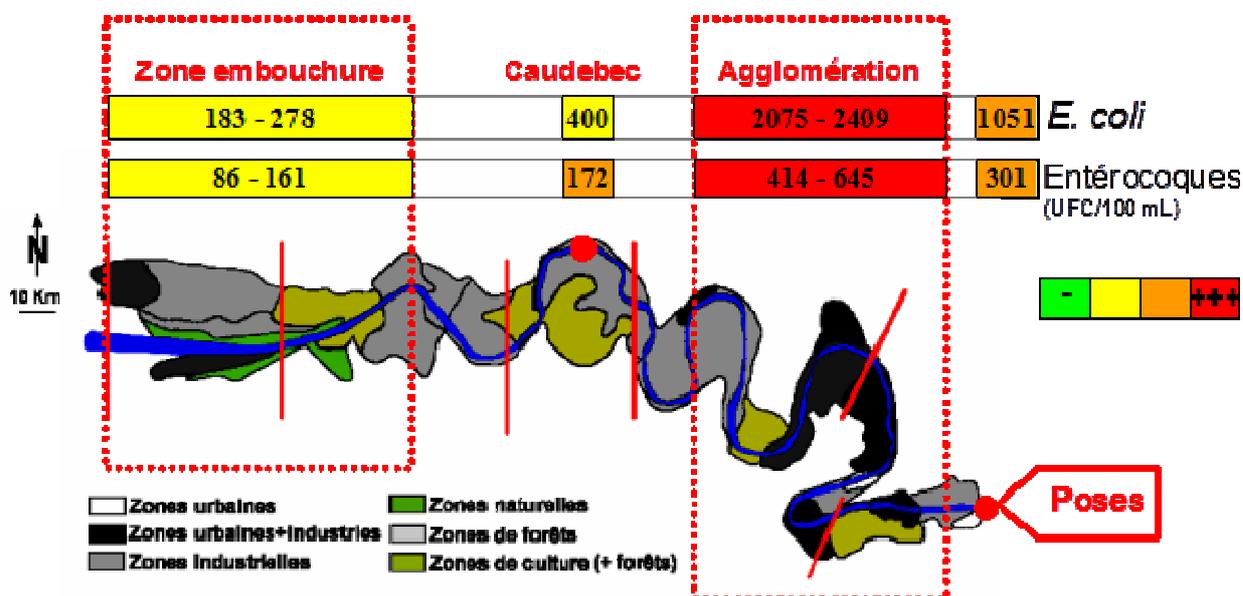
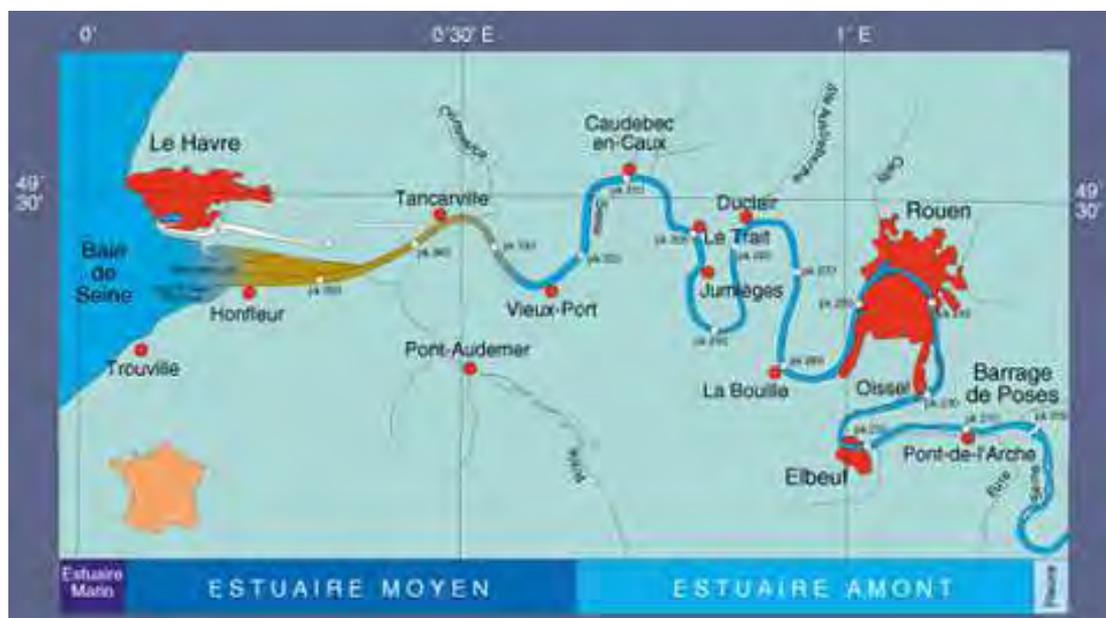


Figure 58 : L'estuaire de Seine (modifié d'après Lafite et al, 2003) et qualité microbiologique des eaux de l'estuaire de Seine. Moyenne géométrique des densités en bactéries indicatrices de la contamination fécale (*E. coli* et *Enterococcus*) dans les eaux de l'estuaire de Seine (bilan Seine Aval 3 ; Touron et al, 07).

Depuis 1995, l'étude de la dynamique des coliformes fécaux/thermotolérants dans les eaux de l'estuaire de Seine a montré que cette contamination était élevée, et qu'elle variait en fonction des zones et du débit (Touron et al, 07 ; Georges et al, 01 ; Garcia Armisen et al, 05). La qualité

microbiologique des eaux de l'estuaire, évaluée en fonction de l'abondance en *E. coli* et en *Enterococcus*, est « médiocre » d'après la directive européenne (2006/7/CE). Dans la phase précédente du programme Seine – Aval (SA3), l'exploitation des données acquises par le SNS (1997-2004) et celles du laboratoire ex LMDF/M2C (2000-2005) a permis de qualifier trois zones de l'estuaire en fonction du danger microbiologique, sur la base de l'abondance des flores indicatrices de contamination fécale et de la présence de *Salmonella* (Figure 58; Touron et al, 2007). Au-delà de ce danger microbiologique, il a été observé une contamination des eaux de l'estuaire par une population d'*E. coli* résistantes aux antibiotiques (Tableau 19; Touron et al, 07 ; Laroche et al, 09).

Station	kp (km)	MES (mg. L ⁻¹)		<i>Enterococcus</i> ^b			<i>Escherichia coli</i> ^c		
		7/2011	min - max	7/2011	min – max ^a	Moy Géom (%) ^e	7/2011	min– max ^a	Moy Géom (%) ^e
Poses	202	14	3,5 – 86,1	<5	< 1 – 23 000	217 (54,2)	40	34 - 54130	835 (54,5)
Rouen	243	7	3,7 – 67,2	300	36 – 9 300	570 (57,1)	2600	292 - 23690	2194 (95,7)
Le Croisset	246,6	10	0,6 – 112,9	840	57 – 23 000	635 (59,1)	3500	350 - 26700	2247 (96,3)
Les docks	251,3	16,8	4,9 – 87,2	150	36 – 9 300	522 (77,3)	610	160 - 16620	2183 (95,5)
Bouille	259,7	38	0,8 – 405,0	120	15 – 4 300	266 (65,2)	63	293 - 6520	1195 (82,1)
Caudebec	310,5	56,7	1,4 – 769,4	87	7 – 2 300	111 (36,4)	83	38 - 1126	181 (22,7)
Tancarville	337	127	32 – 3419,2	50	10 – 2 300	110 (33,3)	61	36 - 2472	154 (15,2)
Berville sur Mer	346	260	28,0– 3293,5	230	23 - 600	86 (na)	300	na	na
Honfleur	355,8	44	101,1 – 3419,2	39	3 – 11 454	171 (54,2)	21	36 - 4300	338 (28,1)

Moy. Geom. : moyenne géométrique ; ^a Abondances en UFC.100 ml⁻¹ ; ^b Dénombrements prenant en compte la méthode MPN et la méthode miniaturisée ; ^c *E. coli*: (données SNS, 2000-2005) ; na: non analysé ; ^e pourcentage de campagnes pour lesquelles l'abondances en *E. coli* et Enterocoques est supérieure aux valeurs de la directive européenne (2006/7/EC) : respectivement 185 et 500 UFC.100 mL⁻¹.

Tableau 19 : Comparaison de la qualité microbiologique des eaux de l'estuaire de Seine lors de la campagne de prélèvement de juillet 2011 (bas débit 136 m³.s⁻¹) avec les valeurs obtenues sur la période 2000-2005.

L'étude des profils de résistances aux antibiotiques (seize antibiotiques testés) des souches d'*E. coli* isolées entre 2001 et 2006 (7 campagnes longitudinales, 6 stations, 654 souches) a montré, que les eaux de l'estuaire étaient contaminées de façon permanente par des souches d'*E. coli* résistantes à au moins un antibiotique. Pour cette période, la proportion de souches résistantes au sein de la population d'*E. coli* varie de 30,2% à Poses à 56,6% au Croisset, site impacté par les rejets d'effluents traités de la STEP émeraude. Un ordre de grandeur du flux correspondant a été estimé à 3,5 10⁹ *E. coli* résistantes.s⁻¹ dans les eaux de surfaces (à moins 1m de profondeur). La grande majorité de ces souches sont multirésistantes aux antibiotiques (60,5% à 80%) avec une proportion de 11,1% des souches d'*E. coli* (279 souches, Janvier 2006) possédant un intégron. Des intégrons de classe I sont retrouvés chez des souches d'*E. coli* tout le long de l'estuaire, alors que seules des souches isolées dans la zone de l'agglomération rouennaise possèdent des intégrons de classe II. Ces phénotypes de multirésistance aux antibiotiques sont souvent associés à la résistance aux métaux traces (cadmium/mercure). Ces apports d'*E. coli* antibiorésistantes sont a priori principalement d'origine

humaine, via les effluents traités de STEP, sans exclure une origine animale (eaux de ruissellement des zones pâturées). Ainsi l'absence de souches résistantes à l'acide nalidixique et à la ciprofloxacine dans les rejets de STEP et les eaux de Robec suggère une autre origine liée aux ruissellements des sols.

Enfin, une hiérarchisation des sites de l'estuaire (méthode de Ward, distance Euclidienne) en fonction des profils de résistance des souches d'*E. coli* avait montré un cluster où se regroupent les souches isolées des effluents traités de la STEP avec celles isolées dans la zone de l'embouchure suggérant l'existence de rejet de bactéries fécales de même origine dans cette zone.

◆ **Campagne trans Seine: Juillet 2011**

Afin d'extrapoler les données acquises sur le continuum hospitalier et rural, une campagne de prélèvement commune aux microbiologistes et aux chimistes a été effectuée en Juillet 2011 (condition de bas débit $136 \text{ m}^3 \cdot \text{s}^{-1}$). Cette campagne a été coordonnée avec les hydro-sédimentologues du laboratoire M2C, les prélèvements à 1 mètre sous la surface se sont fait en zodiac et en suivant l'onde de marée de Honfleur à Rouen (prélèvement autour de l'étale de Basse Mer suivant le protocole su SNS) ; le prélèvement du site Poses a été fait de façon indépendante la veille. Ces conditions de prélèvement permettent de comparer les données obtenues avec celles acquises lors des campagnes SNS coordonnées par A. Ficht, (Touron et al, 07). Ainsi, d'après la directive européenne (2006/7/EC) la qualité microbiologique des eaux de l'estuaire de Seine en juillet 2011 est bonne à l'exception de la zone de l'agglomération rouennaise et le site de Berville sur Mer. Sur ce dernier site le rapport *E. coli*/*Enterococcus* <1 témoigne d'une contamination qui n'est pas récente et qui s'explique très probablement par la concentration plus élevée en matières en suspension qui indique que le prélèvement a été effectué dans la zone du bouchon vaseux.

◆ **Contamination des eaux de l'estuaire en molécules antibiotiques et extrapolation des données acquises sur les continuums hospitaliers et agricoles**

Les analyses chimiques ont été effectuées sur les eaux prélevés le long de l'estuaire et pour deux types de sources de contamination : la STEP Emeraude (550 000 éq habitants, traitement primaire, boues activées, nitrification et dénitrification), la STEP d'Elbeuf (100 000 éq habitants, traitement primaire et boues activées) et le Robec, affluent présentant une contamination élevée en *E. coli* dont des *E. coli* antibiorésistantes (Touron et al, 07 ; programme SA3).

Trente-neuf composés appartenant aux différentes classes d'antibiotiques ont été recherchés (Tableau 20 et Tableau 21). Les résultats montrent que les effluents traités de STEP et les eaux du Robec sont des sources de contamination en molécules antibiotiques (près de 20 molécules différentes avec des concentrations maximales de $482 \text{ ng} \cdot \text{L}^{-1}$ pour la clarithromycine). Les eaux du Robec sont plus spécifiquement contaminées en β -lactamines, céfotaxime et ciprofloxacine suggérant une contamination d'origine humaine non hospitalière et proche (probablement des rejets directs d'une structure collective). Dans les eaux de l'estuaire, seuls 9 antibiotiques sont retrouvés, à de faibles concentrations de l'ordre du $\text{ng} \cdot \text{L}^{-1}$. La contamination en antibiotiques des rejets de la STEP est rapidement diluée dans les eaux de l'estuaire, au moins d'un facteur 10 selon les molécules comme le montrent les concentrations mesurées dans la zone de l'agglomération rouennaise notamment sur le site du Croisset le plus proche des rejets. A l'exception de la sulfaméthoxazole, cette dilution se poursuit pour tous les antibiotiques le long de l'estuaire avec une nouvelle augmentation au niveau de Caudebec, puis à nouveau une dilution dans la zone de l'embouchure. Il serait intéressant de connaître les propriétés d'adsorption aux particules de cet antibiotique afin de savoir si l'augmentation observée sur le site de Berville sur Mer est liée à l'augmentation des MES à ce niveau de l'estuaire (zone du bouchon vaseux).

Comme pour les continuums hospitaliers et agricoles de la Risle, les molécules majoritairement retrouvées sont celles qui sont les plus stables dans l'environnement aquatique : les fluoroquinolones, les sulfamides et les macrolides.

Etonnamment, le nombre de molécules détectées (9/39) est inférieur à celui mesuré dans les eaux du continuum hospitalier (15/41) et du continuum agricole (13/41), et les concentrations ne sont pas significativement plus élevées, alors que nous sommes en période de bas débit. Ces résultats peuvent s'expliquer par un phénomène de dilution plus important en estuaire de Seine. Les antibiotiques retrouvés, correspondent à ceux utilisés en médecine humaine et hospitalière et sont donc communs à ceux retrouvés dans le continuum hospitalier de la Risle, à l'exception de 4 antibiotiques absents dans les eaux de l'estuaire: l'amoxicilline et la céfotaxime. Ces molécules instables en milieu aqueux sont probablement éliminées avant leurs rejets dans les eaux de l'estuaire, notamment lors des traitements de STEP ; la ciproflaxine et le norfloxacine, fluoroquinolones prescrits en médecine humaine (près de 14, 5% des prescriptions) ne seraient plus dosables malgré leur persistance dans le milieu aqueux. Un abattement des concentrations en norfloxacine et ciproflaxine de 80% a été observé lors du traitement des eaux usées en STEP (boues activées, Chang et al, 2010). Les fluoroquinolones s'adsorbent aux boues activées qui semblent alors constituer un réservoir important de ces molécules (Jia et al, 2012). Tous les macrolides présents dans les eaux de Seine sont aussi retrouvés le long du continuum agricole à l'exception de l'azithromycine et la josamycine. Seule la fluméquine est spécifiquement retrouvée dans les eaux de Seine.

Antibiotique	Limite détection (ng.L ⁻¹)	Limite quantification (ng.L ⁻¹)	Poses	Rouen	Le croisset	Les docks	La bouille	Caudebec	Tancarville	Berville	Honfleur
β-lactamines											
Amoxicilline	100	300	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Ampicilline	40	100	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Pénicilline G	4x10 ⁻¹	2x10 ⁻¹	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Pénicilline V	7x10 ⁻¹	2x10 ⁻¹	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Oxacilline	5x10 ⁻¹	2x10 ⁻¹	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Cloxacilline	5x10 ⁻¹	2x10 ⁻¹	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Dicloxacilline	2	5x10 ⁻¹	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Céfalexine	6x10 ⁻¹	20	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Céfotaxime	2x10 ⁻¹	7x10 ⁻³	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Céfpodoxime	100	300	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Ceftiofur	2x10 ⁻¹	6x10 ⁻¹	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Cefuroxime	3x10 ⁻¹	8x10 ⁻¹	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Quinolones / Fluoroquinolones											
Ciprofloxacine	5x10 ⁻¹	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Enrofloxacin	2x10 ⁻¹	5x10 ⁻¹	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Marbofloxacine	1x10 ⁻¹	3x10 ⁻¹	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Norfloxacine	4x10 ⁻¹	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Ofloxacine	1x10 ⁻¹	3x10 ⁻¹	3	2	2	2	1	-	1	1	1
Acide pipémédique	4x10 ⁻¹	2x10 ⁻¹	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Acide oxilinique	1x10 ⁻¹	1x10 ⁻¹	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Fluméquine	1x10 ⁻¹	2x10 ⁻¹	9	9	9	8	13	7	3	6	-
Tétracyclines											
Tétracycline	3x10 ⁻¹	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Oxytétracycline	4x10 ⁻¹	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Chlortétracycline	6	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Doxycycline	4x10 ⁻¹	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Sulfamides											
Sulfadiazine	1x10 ⁻¹	3x10 ⁻¹	-	-	-	-	-	-	-	3	1
Sulfadiméthoxine	1x10 ⁻¹	1x10 ⁻¹	1	0	1	0	0	-	0	-	-
Sulfamérazine	1x10 ⁻¹	4x10 ⁻¹	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Sulfaméthazine	1x10 ⁻¹	2x10 ⁻¹	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Sulfaméthizole	1x10 ⁻¹	4x10 ⁻¹	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Sulfaméthoxazole	3x10 ⁻¹	1	24	5	24	16	21	51	22	56	12
Sulfanilamide	20	70	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Sulfapyridine	1x10 ⁻¹	3x10 ⁻¹	12	-	6	5	5	16	7	14	2
Sulfathiazole	2x10 ⁻¹	5x10 ⁻¹	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Macrolides											
Azithromycine	NR	NR	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Clarithromycine	NR	NR	8	9	11	7	11	1	0	1	2
Erythromycine	NR	NR	20	19	24	18	20	9	2	4	3
Josamycine	NR	NR	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Roxithromycine	NR	NR	2	3	4	2	3	1	-	0	-
Spiramycine	NR	NR	5	2	3	2	2	1	0	1	1
Tylosine	NR	NR	-	-	-	-	-	-	-	-	-

(-) antibiotique non détecté, (NR) Non Réalisé

Tableau 20: Contamination en antibiotiques des eaux le long de l'estuaire de Seine (Juillet 2011)

Antibiotique	Limite détection (ng.L ⁻¹)	Limite quantification (ng.L ⁻¹)	Le Robec	STEP Elbeuf	STEP Emeraude
β-lactamines					
Amoxicilline			235	-	41
Ampicilline			-	-	-
Pénicilline G			-	-	-
Pénicilline V			-	-	-
Oxacilline			12	-	-
Cloxacilline			40	-	-
Dicloxacilline			-	-	-
Céphalosporines					
Céfalexine			-	-	-
Céfotaxime			368	31	12
Cefpodoxime			-	-	-
Ceftiofur			-	-	-
Cefuroxime			-	-	-
Quinolones / Fluoroquinolones					
Ciprofloxacin			114	130	265
Enrofloxacin			-	-	-
Marbofloxacin			-	-	-
Norfloxacin			-	22	165
Ofloxacin			62	77	86
Acide pipémédique			-	-	148
Acide oxilinique			-	-	-
Fluméquine			-	161	138
Tétracyclines					
Tétracycline			-	-	9
Oxytétracycline			-	-	-
Chlortétracycline			-	-	-
Doxycycline			-	-	17
Sulfamides					
Sulfadiazine			-	342	2
Sulfadiméthoxine			-	129	0
Sulfamérazine			-	-	-
Sulfaméthazine			-	105	-
Sulfaméthizole			-	10	4
Sulfaméthoxazole			5	276	200
Sulfanilamide			-	137	67
Sulfapyridine			-	235	396
Sulfathiazole			-	-	-
Macrolides					
Azithromycine			-	208	248
Clarithromycine			3	89	482
Erythromycine			3	126	295
Josamycine			-	11	21
Roxithromycine			-	73	239
Spiramycine			-	39	50

- : antibiotique non détecté

Tableau 21: Contamination en antibiotiques des effluents traités de station d'épuration et des eaux du Robec (Juillet 2011).

◆ **Epidémiologie et structure des populations d'*E. coli* en estuaire de Seine : analyse rétrospective des souchiers d'*E. coli* (programme Seine-Aval 3)**

Au-delà de son rôle d'espèce indicatrice de la contamination en bactéries d'origine fécale des milieux aquatiques, l'étude de la structure de la population d'*E. coli* basée sur le typage moléculaire de cette espèce bactérienne peut être informative sur l'origine humaine et animale de la contamination. Les 4 groupes phylogénétiques d'*E. coli* sont retrouvés dans la Seine avec une prédominance de A puis de B1. A la lumière des données de la littérature sur la répartition de ces 4 groupes chez l'homme et les mammifères, et des résultats obtenus sur des échantillons d'origine hospitalière et bovine, il peut être déduit que l'origine des souches dans la Seine est mixte : humaine (forte proportion de A) et animale (forte proportion de B1, Tableau 22). En période d'étiage (Août 2006), il n'existe pas de différence dans la structure des populations d'*E. coli* le long de l'estuaire. Ainsi la contamination serait essentiellement due à des apports issus d'une contamination humaine auxquels se surajoute une contamination animale probablement due aux ruissellements (Tableau 23). Ces résultats sont cohérents avec les résultats obtenus sur la distribution des sérotypes de *Salmonella* isolées de l'estuaire de Seine (programme SA3 ; Tournon et al. 2005).

Les résultats présentés dans le Tableau 23 montrent qu'en période de haut débit la proportion de génotype B2 dans la population d '*E. coli* présente des différences significatives, probablement dues aux apports des rejets de STEP d'Achères (6 millions d'habitants), avec une augmentation des génotypes B2 liée à une contamination fécale d'origine humaine (Tableau 24). Toutefois il n'a pas été trouvé de souches d'*E. coli* de génotype O81 (spécifiquement humain) ; ce qui peut s'expliquer par la taille trop faible de l'échantillon et qui est cohérent avec les données bibliographiques (7% de O81 parmi les B2, il aurait donc fallu isoler plus de 100 souches par site).

	% des génotypes dans la population d' <i>E. coli</i>			
	A	B1	D	B2
Seine *	47	26	13	15
Hommes **	61	12,5	16	10,5
Mammifères ***	30	35	20	10

* moyenne des % sur la campagne d'Août 2006, ** population française Duriez et al 2001, *** Escobar-Paramo et al 2006.

Tableau 22 : Comparaison de la structure des populations d'*E. coli* isolées de Seine avec celle des hommes et animaux.

(A)

		Génotypes des souches d'<i>E. coli</i>			
	Nbre de souches	A n (%)	B1 n (%)	B2 n (%)	D n (%)
Poses ¹	N=12	3 (nc)	1 (nc)	6 (nc)	2 (nc)
Rouen	N=55	50,91%	25,45%	12,73%	10,91%
Le Croisset	N=21	66,67%	9,52%	14,29%	9,52%
La Bouille	N=34	50,00%	11,76%	23,53% **	14,71%
Caudebec	N=52	63,46%	25,00%	0,00% **	11,54%
Embouchure	N=86	59,30%	17,44%	12,79%	10,47%

(B)

		Génotypes des souches d'<i>E. coli</i>			
	Nbre de souches	A n (%)	B1 n (%)	B2 n (%)	D n (%)
Poses	N=30	36,67%	30,00%	10,00%	23,33%
Rouen	N=39	46,15%	17,95%	20,51%	15,38%
Le Croisset	N=42	50,00%	28,57%	11,90%	9,52%
La Bouille	N=48	47,92%	27,08%	8,33%	16,67%
Caudebec	N=15	53,33%	33,33%	6,67%	6,67%
Embouchure	N=38	47,37%	18,42%	18,42%	15,79%

* $\alpha = 0,1$; ** $\alpha = 0,05$; ¹ % non calculé car la taille de l'échantillon est trop faible.

Tableau 23: Structure de la population d'*E. coli* dans les eaux de l'estuaire (campagnes de Janvier 06 (A) et Août 06 (B)).

		Génotype d'<i>E. coli</i> (Poses)			
Campagne	Nombre de souches	A n (%)	B1 n (%)	B2 n (%)	D n (%)
(débits m ³ .s ⁻¹ / MES mg.L ⁻¹)					
01/2006 ¹ (346/5,2)	N=12	3 (nc)	1 (nc)	6 (nc)*	2 (nc)
02/2006 (874/107)	N=44	15 (34,10%)	10 (22,70%)	10 (22,70%)	9 (20,50%)
08/2006 (153/14)	N=30	11 (36,67%)	9 (30,00%)	3 (10,00%) **	7 (23,33%)

* $\alpha = 0,1$; ** $\alpha = 0,05$; ¹ % non calculé car la taille de l'échantillon est trop faible ; n nombre de souches par génotype.

Tableau 24: Structure des populations d'*E. coli* à Poses

◆ Occurrence de bactéries antibiorésistantes et analyse rétrospective des souches d'*E. coli* de Seine Aval 3

Dans le cadre du projet FLASH, l'étude phénotypique et génétique de la collection de souches s'est poursuivie et a donné lieu à une publication (Laroche et al, 2009).

Les profils phénotypiques des souches ont été caractérisés et validés pour l'ensemble de la collection d'*E. coli* (Tableau 25). Dans les conditions hydrologiques des 7 campagnes (bas débits ou débits intermédiaires $< 500 \text{ m}^3 \cdot \text{s}^{-1}$), les profils de résistance aux antibiotiques des souches d'*E. coli* sont indépendants de l'année, de la saison et du site (test du χ^2). Les résistances majoritairement retrouvées sont l'amoxicilline (21,9%) et la ticarcilline (1,9%) utilisées en médecine humaine, la tétracycline (31%) principalement utilisée en médecine vétérinaire. Il est à noter qu'aucune résistance à l'imipénème n'a été observée. Entre 60,5 à 80% des souches sont résistantes à au moins 2 antibiotiques avec des valeurs maximales observées sur les sites proches des rejets de la STEP Emeraude (56,6%) et dans l'embouchure (50,1%). Ces propriétés de multirésistances sont le plus souvent dues à la présence de gènes sur un même support génétiques, notamment les intégrons (Tableau 26, Tableau 27 et E10).

Afin d'évaluer le flux de gènes correspondant, et plus particulièrement les supports génétiques impliqués dans la dissémination de la résistance aux antibiotiques en milieu hospitalier, la caractérisation plus fine des intégrons portés par les souches d'*E. coli* circulant dans les eaux de Seine a été menée en partenariat avec l'équipe d'Antoine Andreumont (CHU Bichat, Paris 7). Les intégrons de résistance sont des éléments génétiques de capture et d'expression de gènes sous forme de cassettes, qui jouent un rôle déterminant dans la dissémination des gènes de résistance aux antibiotiques chez les bactéries à Gram négatif notamment *E. coli*. La présence des intégrons de classe I, II et III (279 souches des 2 campagnes de 2006) a été recherchée par amplification des séquences spécifiques des gènes codant les intégrases correspondantes : *int1*, *int2* et *int3* (Tableau 27). Le pourcentage de souches qui portent un intégron de classe I varie de 2,7% à la Bouille jusqu'à de 14,7% à l'embouchure. Les *E. coli* portant des intégrons de classe II n'ont été isolées que dans la zone de l'agglomération Rouennaise (Rouen et au Croisset). On observe une association des intégrons de classe I et II chez des souches d'*E. coli* isolées à Caudebec et dans la zone de l'embouchure (pK 337-356) (Tableau 27). Aucune souche *E. coli* ne porte un intégron de classe III. La présence des intégrons de classe I est corrélée positivement avec la résistance d'*E. coli* à la Triméthoprime/Sulfaméthoxazole ($r = 0,719$), amoxicilline ($r = 0,503$), Ticarcilline ($r = 0,523$) et Kanamycine ($r = 0,445$) (test de Spearman ; Tableau 27 et Tableau 28).

Proportion de souches d' <i>E. coli</i> antibiotorésistantes % (n/N) ^a								P value ^b
Sites	Poses	Rouen	Le Croisset	La Bouille	Caudebec	Tancarville-Honfleur	WWTP	
Antibiotique	kp 202	kp 243	kp 246,6	kp 260	kp 310	kp 337-356	kp 247	
Penicillines								
Amoxicilline	15,9 (18/113)	28,6 (22/77)	28,8 (30/104)	10,9 (10/92)	14,9 (14/94)	28,2 (49/174)	33,3 (41/123)	<0,0001
Amoxicilline + acide clavulanique	10,6 (12/113)	11,7 (9/77)	15,4 (16/104)	7,6 (7/92)	8,5 (8/94)	9,2 (16/174)	10,6 (13/123)	NS ^d
Ticarcelline	15,5 (14/90)	20,8 (16/77)	15,3 (13/85)	19,6 (18/92)	12,8 (12/94)	21,3 (33/155)	34,2 (26/76)	0,012
Ticarcelline + acide clavulanique	6,7 (6/90)	7,8 (6/77)	3,5 (3/85)	2,2 (2/92)	6,4 (6/94)	5,2 (8/155)	14,5 (11/76)	0,023
Carbapénèmes								
Imipénème	0,0 (0/113)	0,0 (0/77)	0,0 (0/104)	0,0 (0/92)	0,0 (0/94)	0,0 (0/174)	0,0 (0/123)	-
Céphalosporines								
Céfalotine	7,1 (8/113)	7,8 (6/77)	14,4 (15/104)	8,7 (8/92)	13,8 (13/94)	21,3 (37/174)	12,2 (15/123)	0,001
Céftazidime	0,0 (0/113)	0,0 (0/77)	3,8 (4/104)	1,1 (1/92)	0,0 (0/94)	0,6 (1/174)	0,0 (0/123)	0,016
Céfotaxime	0,0 (0/90)	0,0 (0/77)	1,2 (1/85)	1,1 (1/92)	0,0 (0/94)	0,0 (0/155)	0,0 (0/76)	NS ^d
Aminosides								
Gentamicine	0,0 (0/113)	0,0 (0/77)	5,8 (6/104)	2,2 (2/92)	11,7 (11/94)	0,6 (1/174)	1,6 (2/123)	<0,0001
Amikacine	0,0 (0/113)	0,0 (0/77)	1,9 (2/104)	0,0 (0/92)	9,6 (9/94)	0,6 (1/174)	3,3 (4/123)	<0,0001
Kanamycine	9,5 (6/63)	6,5 (5/77)	16,4 (9/55)	6,5 (6/92)	13,8 (13/94)	19,3 (22/114)	15,1 (11/73)	0,010
Phénicols								
Chloramphenicol	7,9 (5/63)	10,4 (8/77)	38,2 (21/55)	8,7 (8/92)	10,6 (10/94)	10,5 (12/114)	17,8 (13/73)	<0,0001
Tétracyclines								
Tétracycline	25,4 (16/63)	22,1 (17/77)	43,6 (24/55)	27,2 (25/92)	31,9 (30/94)	36,0 (41/114)	41,1 (30/73)	0,049
Sulfamides								
Triméthoprim + sulfaméthoxazole	7,9 (5/63)	7,8 (6/77)	9,1 (5/55)	8,7 (8/92)	5,3 (5/94)	17,5 (20/114)	9,6 (7/73)	NS ^d
Quinolones								
Acide nalidixique	0,9 (1/113)	6,5 (5/77)	22,1 (23/104)	8,7 (8/92)	6,4 (6/94)	7,5 (13/174)	3,3 (4/123)	<0,0001
Ciprofloxacine	0,0 (0/113)	3,9 (3/77)	9,6 (10/104)	2,2 (2/92)	7,4 (7/94)	1,7 (3/174)	0,8 (1/123)	<0,0001

^a n nombre de souches résistantes à l'antibiotique testé, N. nombre total de souches testées, ^b les différences significatives entre les sites ont été déterminées par le test du Chi 2 Fischer ($\alpha=5\%$), ^c NS, non significatif (< 0,05)

Tableau 25 : Proportion de souches d'*E. coli* résistantes à chaque antibiotique le long de l'estuaire de Seine (analyse rétrospective des collections d'*E. coli* de la campagne de Janvier 2006).

Stations	pK (km)	Nombre de souches <i>E. coli</i>	% de souches résistantes ^a		% de souches multi- résistantes aux antibiotiques ^b											
			Min-Max	Moy. Geom. ^c	R2	R3	R4	R5	R6	R7	R8	R9	R10	R11	R12	Total
Poses	202	113	16,0-50,0	30,2	3,5	7,1	7,9	0,9	1,7	0	0	0	0	0	0	21,1
Rouen	243	77	36,8-39,6	38,2	5,2	9,1	5,2	7,8	2,6	0	0	0	1,3	0	0	31,2
Le Croisset	246.6	104	24,5-94,7	56,6	7,7	5,7	8,6	9,6	4,8	1,9	0,9	0	0	0	0	39,2
La Bouille	260	92	31,0-68,7	49,6	13,0	5,4	4,3	2,1	1,1	1,1	0	0	0	1,1	0	28,1
Caudebec	310	94	13,3-58,3	35,7	4,2	4,2	6,4	8,4	0	3,2	2,1	0	0	0	1,1	29,6
Tancarville-Honfleur	337 – 356	174	44,2-60,0	50,1	4,6	6,9	7,5	10,9	1,1	0,6	0,6	0	0	0	0	32,2
STEP Emeraude	247	123	46,1-50,0	48,3	13,0	4,9	8,1	8,1	1,6	1,6	0	0	0	0	0	37,3

^a % de souches d'*E. coli* résistantes à au moins 1 antibiotique ; ^b % de souches d'*E. coli* à au moins 2 antibiotiques ; ^c Moy. Geom. Moyenne géométrique ; R2, R3, ..., R12: résistant à 2, 3, ... 12 antibiotiques

Tableau 26 : Proportion de souches d'*E. coli* multirésistantes le long de l'estuaire de Seine (analyse rétrospective des collections d'*E. coli* de la campagne de Janvier 2006).

Stations	Kp (km)	Nbre de souches	% de souches résistantes ^a	% de souches portant les gènes codant les intégrases				Total
				<i>intl 1</i>	<i>intl 2</i>	<i>Intl 1 + 2</i>	<i>intl 3</i>	
Poses	202	16	25,0	6,2	0	0	0	6,2
Rouen	243	58	39,6	8,6	5,2	0	0	13,8
Le Croisset	246.6	22	54,5	9,1	4,5	0	0	13,6
La Bouille	260	35	42,8	2,7	0	0	0	2,7
Caudebec	310	53	45,3	3,8	0	1,9	0	5,7
Tancarville-Honfleur	337–356	95	44,2	14,7	0	1,1	0	15,8
Total		279	43,0	8,9	1,4	0,7	0	11,0

Tableau 27 : Proportion de souches d'*E. coli* portant des intégrons de classe I, II et III le long de l'estuaire de Seine: amplification des séquences de gènes spécifiques de chaque classe intégrons codant les intégrases *intl1*, *intl2*, *intl3* respectivement, (analyse rétrospective des collections d'*E. coli* de la campagne de Janvier 2006).

Nombre d'isolats	Gène <i>intI</i>	Profils de résistances aux antibiotiques		Région variable de l'intégron		
		Nb de résistances	Phénotype	Amplicon (bp)	Gene cassette	Numéro d'accession
1	2	11	AMX, AMC, TIC, TIM, KAN, STR, CHL, TET, SXT, NAL, CIP	<u>6 700</u>	<i>dfrI-satI-aadA1</i>	<u>FJ591049</u>
1	1	9	AMX, TIC, CEF, ANK, KAN, STR, TET, NAL, CIP	900	<i>aadA1</i>	FJ591053
1	2	9	AMX, TIC, KAN, STR, CHL, TET, SXT, NAL, CIP	<u>Non détecté</u>		
1	1,2	8	AMX, TIC, GEN, KAN, STR, CHL, TET, SXT	900; <u>4 700</u>	<i>aadA1; dfrI-satI-aadA1</i>	FJ591054; <u>FJ591055</u>
1	1	7	AMX, TIC, KAN, STR, TET, SXT, NAL	Non détecté		
1	1	7	AMX, TIC, KAN, STR, CHL, TET, SXT	2000	ND	
1	1	6	AMX, AMC, TIC, TIM, CHL, TET	2 000	ND	
12	1	6	AMX, TIC, KAN, STR, TET, SXT	Non détecté		
1	1	6	AMX, TIC, CEF, STR, TET, SXT	Non détecté		
1	1	5	AMX, TIC, STR, TET, SXT	1 500	<i>dfrA17-aadA5</i>	FJ591051
1	1	5	AMX, TIC, STR, TET, SXT	2 000	<i>dfrA5-ereA2</i>	FJ591050
1	1	5	AMX, TIC, CEF, STR, SXT	1 500	<i>dfrA1-aadA1</i>	FJ591052
1	2	5	AMX, TIC, KAN, STR, TET	<u>4 700</u>	<u>ND</u>	
1	1, 2	5	CEF, KAN, STR, CHL, SXT	Non détecté; <u>4 900</u>	<u>ND</u>	
1	1	4	AMX, TIC, STR, SXT	1 500	ND	
1	1	3	AMX, CEF, STR	900	ND	
1	1	3	STR, TET, SXT	1 500	ND	
1	1	2	AMX, TIC	Non détecté		
1	1	2	TET, SXT	2000	ND	
1	2	0		<u>2 600</u>	<u>ND</u>	

Tableau 28 : Souches portant des intégrons et isolées en estuaire de Seine (analyse rétrospective des collections d'*E. coli* de la campagne de Janvier 2006).

◆ **Relation entre la prescription, la contamination en antibiotique et l'occurrence d'*E. coli* antibiorésistantes dans les eaux de l'estuaire de Seine : analyses rétrospectives des données de Seine aval 3 et extrapolation des données obtenues sur les continuums agricoles et hospitalier**

Considérant (i) que la contamination chimique de l'estuaire de Seine en Juillet 2011 ne présente pas ou peu de différences au niveau qualitatif comparée aux résultats obtenus sur le continuum hospitalier (ii) que les prescriptions d'antibiotiques en médecine humaine et vétérinaire, ne présentent de modifications majeures au regard des études menées par l'ANSES⁴ et l'AFFSAPS⁵ (voir document annexe), nous avons considéré que les résultats obtenus sur le continuum agricole et hospitalier sur la relation entre la contamination en antibiotiques des eaux et les profils phénotypiques des populations d' *E. coli* qui y circulent sont extrapolables à ceux obtenus en estuaire de Seine. Nous avons donc utilisé la base de données acquises sur le phénotype de résistance aux antibiotiques de la collection de souches isolées de Seine sur la période 2001-2006 pour mener notre réflexion.

Entre 2006 et la période d'étude du projet FLASH, les prescriptions relatives des différentes familles d'antibiotiques n'ont pas évolué de façon importante à l'exception des

⁴ Rapport de l'ANSES d'octobre 2011 : « Suivi des ventes de médicaments vétérinaires contenant des antibiotiques en France en 2010 : volume et estimation de la consommation des antibiotiques chez les animaux »

⁵ Rapport AFSSAPS, Juin 2011 « 10 ans d'évolution des consommations d'antibiotiques en France »

quinolones dont les prescriptions ont augmenté en médecine humaine et surtout en médecine vétérinaire (+ 57,64% de fluoroquinolones depuis 1999 et 6,13% en 2009, données ANSES). Ce constat explique la similarité des profils phénotypiques de résistance observés chez les populations d'*E. coli* présentes dans les eaux de Seine avec ceux observés dans le continuum hospitalier de la Risle (Tableau 25 et Annexes 5 et 6). Dans les eaux de l'estuaire de Seine, comme pour celles des deux continuums, on observe que la contamination en antibiotiques s'accompagne d'un apport en souches d'*E. coli* antibiorésistantes.

L'analyse des phénotypes des souches d'*E. coli* collectées en 2006 montre que les résistances majoritairement retrouvées chez les bactéries rejetées par les effluents traités des STEP, l'amoxicilline (33%), ticarcilline (34,2%), céfalotine (12,2%), kanamycine (15,1%) tétracyclines (41,1%), sont aussi celles des souches retrouvées dans les eaux de Seine notamment sur les sites impactés par les rejets de la station Emeraude (zone de l'agglomération rouennaise). Sur le site du Croisset, on observe des souches qui résistent aussi à l'acide Nalidixique et au chloramphénicol, probablement apportées par le Robec ou le Cailly à proximité de ce site. En 2005, il avait été montré une proportion importante de souches résistantes au chloramphénicol (14,58%) et à l'acide nalidixique (2,08%) dans les eaux du Robec (programme SA3). Toutefois comme pour les souches isolées du continuum hospitalier de la Risle, il n'existe pas de corrélation entre les antibiotiques présents dans les eaux et les résistances des souches d'*E. coli* dans les eaux. La majeure partie de ces souches sont multirésistantes ; ces propriétés s'expliquant pour partie par la présence d'intégrons.

Les concentrations observées dans les eaux ne sont pas compatibles avec une pression de sélection responsable de l'émergence de souches résistantes suggérant que ces bactéries antibiorésistantes ont été sélectionnées dans les réservoirs humains et animaux soumis à des traitements antibiotiques. Les analyses génétiques sur l'occurrence des intégrons et la structure des populations d'*E. coli* dans les eaux suggèrent une contamination majoritairement d'origine humaine sans exclure pour autant une contribution d'origine agricole.

Ainsi, une proportion importante de souches résistantes à la tétracycline est retrouvée tout au long de l'estuaire, comme pour le continuum hospitalier de la Risle. Ces résultats s'expliquent à la fois par les prescriptions plus importantes de ces antibiotiques en médecine animale mais aussi en médecine de ville, et/ou par la présence de gènes associés sur un même support génétique (Tableau 28) / Annexe 6); Laroche et al, 09, Oberlé et al, 12). De même les souches résistantes à la kanamycine, antibiotiques majoritairement prescrit en médecine vétérinaire (bovins), sont présentes dans les effluents de STEP, à Caudebec et dans la zone de l'embouchure.

◆ Présence de souches pathogènes intra intestinales dans les eaux de l'estuaire de Seine ;

Sur 111 souches testées issues de la collection des campagnes 2006, appartenant aux différents groupes phylogénétiques de l'espèce *E. coli*, une seule souche du groupe B2 était positive pour *afaD* démontrant que sur l'échantillon testé, il n'y avait aucun risque de pathologie intestinale à *E. coli*.

En juillet 2011, une stratégie de prélèvement a été mise en place afin d'avoir un nombre suffisant de souches par site, et la recherche de souches entéropathogènes a été effectuée sur des souches isolées des zones où le danger microbiologique était le plus élevé, d'après les études précédemment menées au sein du programme Seine Aval (Touron et al, 07). Sur les 295 souches testées 4 souches entéropathogènes ont été identifiées sur le site de Poses (2/7) et dans les rejets de la STEP d'Emeraude alors que pour une abondance équivalente en *E. coli*, dont les *E. coli* antibiorésistantes, aucune souche n'a été détectée dans les eaux du Robec (Tableau 29). Ces résultats montrent aussi que le risque lié à la présence de souches d'*E. coli* pathogènes intra intestinales n'est pas forcément corrélée avec l'abondance en *E. coli*, comme le montre les résultats obtenus sur le site de Poses.

Stations	n	Densité UFC.100 mL ⁻¹	InPEC*
Poses	7	4,0 10 ¹	1 aEPEC + 1 DAEC
Rouen	50	2,6 10 ³	
Berville sur Mer	50	3,0 10 ²	
Robec	50	1,6 10 ⁵	
STEP Emeraude	48	2,1 10 ⁴	1 DAEC + 1 DAEC/EAEC

INPEC : *E. coli* pathogènes intra intestinales ; EPEC : *E. coli* entéro-pathogène, DAEC : *E. coli* entérotoxigénique à adhésion diffuse ; n nombre de souches testées.

Tableau 29 : Présence de souches pathogènes intra intestinales dans les eaux de l'estuaire de Seine (analyse rétrospective des collections d'*E. coli* de la campagne de Janvier 2006).

◆ Conclusions et perspectives

La contamination des eaux de Seine en molécules antibiotiques n'est pas très élevée (de l'ordre d'une dizaine de ng pour 9 molécules), comparée à la pression anthropique exercée sur son bassin versant et aux résultats obtenus sur les deux continuums hospitaliers et agricoles. La contamination en antibiotiques des rejets de la STEP est rapidement diluée dans les eaux de l'estuaire. Les molécules les plus stables sont retrouvées (fluoroquinolones, macrolides et sulfamides) et se diluent dans la zone de l'embouchure (de l'ordre du ng) à l'exception de la sulfaméthoxazole.

Les résistances majoritairement retrouvées chez les *E. coli* isolées des eaux de Seine sont l'amoxicilline (33%), ticarcilline (34,2%), céfalotine (12,2%), kanamycine (15,1%) tétracyclines (41,1%) correspondant essentiellement à des prescriptions en médecine humaine à l'exception de la tétracycline et la kanamycine aussi utilisées en médecine vétérinaire. La majeure partie de ces souches sont multirésistantes, ces propriétés s'expliquant pour partie par la présence d'intégrons.

Les concentrations observées dans les eaux ne sont pas compatibles avec une pression de sélection responsable de l'émergence de souches résistantes suggérant que ces bactéries antibiorésistantes ont été sélectionnées dans les réservoirs humains et animaux soumis à des traitements antibiotiques.

Les analyses génétiques sur la structure des populations d'*E. coli* dans les eaux suggèrent une contamination majoritairement d'origine humaine sans exclure pour autant une contribution d'origine agricole avec des apports d'origine humaine à Poses en période de haut débit.

Dans eaux de l'estuaire il a été isolé des souches d'*E. coli* entéro-pathogènes sur le site de Poses, ces souches qui sont aussi présentes dans les effluents traités de STEPs, ne sont pas retrouvées sur les autres sites de l'estuaire.

Au vu des données du rapport de l'Anses, il apparaît important de prendre en compte aussi les apports liés aux prescriptions en médecine vétérinaires destinées aux animaux domestiques (chiens et chats, voir document en annexe).

Il serait également intéressant de connaître les propriétés d'adsorption de certains antibiotiques comme la sulfaméthoxazole, aux particules afin de savoir si l'augmentation observée dans la zone du bouchon vaseux est liée à l'augmentation en MES à ce niveau de l'estuaire (zone du bouchon vaseux).

Exposition et perception du risque

Approche socio-géographique et socio-économique : exposition de l'Homme aux contaminants chimiques et perception du risque

(CETAPS, IDEES, CARE)

III-5 Approche socio-économique: exposition de l'Homme aux contaminants chimiques et perception du risque

III-5-1 Exposition de l'Homme aux contaminants chimiques et microbiologiques : usages récréatifs et activité de pêche (contribution du CETAPS).

◆ Déroulement de l'enquête sur les loisirs dans le bassin versant de la Risle

L'objectif de cette action est de compléter les résultats acquis dans le cadre de la phase 1 du projet FLASH (thèse Barbara Evrard sur les activités de pêche à pied sur les plages du littoral). Il s'agit de réaliser une enquête qualitative et quantitative de terrain en vue d'une part de mesurer et de localiser des pratiques, et d'autre part d'identifier les perceptions dans lesquelles s'inscrivent et que produisent ces expériences. Autrement dit, il s'agit de mesurer et de qualifier des usages et des perceptions de l'environnement, de la nature ou du milieu, en vue de permettre à d'autres scientifiques, à partir de la mesure de ces mises en jeu du corps qui sont autant d'expositions, de mesurer un risque sanitaire. Sur un plan théorique, il s'agit d'engager une réflexion sociologique sur les expériences pratiques du milieu, les constructions de la nature auxquelles elles renvoient, les risques qu'elles impliquent, voire les tensions qu'elles suscitent entre les groupes sociaux.

A partir d'une enquête par questionnaire, l'objectif est de saisir quelle population est exposée au risque en mesurant des fréquentations et de qualifier des perceptions du « milieu » dans le bassin de la Risle en fonction des activités pratiquées.

Le questionnaire a été construit autour de quatre grandes thématiques :

- variables sociologiques classiques (âge, sexe, PCS, niveau d'étude, lieu de résidence et type de résidence)
- radiographie des activités pratiquées dans la vallée de la Risle et des modalités de pratique (recensement des activités, fréquence de pratique, durée, saisonnalité, forme d'encadrement, identification des sites fréquentés)
- représentations du « milieu » (perception de la qualité des eaux / de l'environnement de pratique, représentation des paysages / du milieu, perception des risques)
- identification des pratiques touristiques (lieux fréquentés, formes d'hébergement, durée du séjour)

L'enquête sur les activités nautiques en estuaire de Seine (2008) avait permis d'identifier quelles étaient les activités les plus risquées et les modes d'exposition qu'elles impliquaient. Les pratiquants s'exposant le plus à un risque de contamination sont ceux qui ont un contact prolongé avec l'eau (chutes fréquentent) ou qui l'ingurgitent (boire la tasse). Ces formes d'expositions renvoient fondamentalement aux significations techniques, symboliques et sensibles des activités nautiques pratiquées. Cette enquête montre que ce sont les kayakistes qui s'exposent se font le plus souvent éclabousser et qui tombent le plus souvent à l'eau. La chute et l'immersion font partie intégrante de l'imaginaire et de la pratique de l'activité. Par exemple, l'esquimautage, technique qui consiste à redresser le bateau sans avoir à en sortir (à l'aide de la pagaie), illustre une pratique qui explore le « dessous » et les remous, bref qui met le pratiquant en contact prolongé par immersion (volontaire ou involontaire) avec des eaux dotées d'une « profondeur », et implique des apprentissages de l'immersion (apprendre à la maîtriser et à s'y maîtriser). Dès lors il n'était pas nécessaire de revenir sur la manière dont les pratiquants s'exposent. Notre étude s'est davantage centrée sur l'identification des activités pratiquées sur la Risle et sur la mesure de la fréquence d'exposition pour les activités préalablement identifiées comme risquées.

Quatre types de publics sont visés en fonction de leur modalité de fréquentation de la Risle :

- Ceux qui pratiquent en vallée de façon régulière ou occasionnelle, peu exposés au risque de contamination du fait de leur absence de contact avec l'eau.
- Ceux qui pratiquent directement au contact de l'eau de façon régulière ou occasionnelle et qui, de ce fait, s'expose à un risque de contamination.

La passation du questionnaire s'est déroulée entre juillet et octobre 2010 afin de toucher les occasionnels (particulièrement présents en période estivale) et les réguliers, licenciés dans un club, qui reprennent leur saison sportive en septembre.

◆ **La pêche à pied en embouchure d'estuaire de Seine** **Échantillonnage et représentativité des pêcheurs interrogés**

L'échantillon se compose de 389 interrogés. La population mère des pêcheurs sur ces trois sites, sur l'ensemble des sessions d'enquête est estimée à 450 pêcheurs (soit 389 interrogés auxquels on additionne 59 refus).

L'échantillon

Les pêcheurs sont globalement plus âgés que les seino-marins (52,13 ans \pm 15,25). Ce qui positionne la pêche à pied comme une activité de senior.

C'est une pratique quasi exclusivement masculine (84,1%). Ces résultats confirment ceux de différentes enquêtes menées sur la pêche récréative (AESN, 2004; IFREMER, 2007).

L'échantillon est majoritairement constitué par des retraités (44,7%). De plus, on constate une surreprésentation significative des retraités et des ouvriers par rapport à la population locale.

La répartition des diplômes dans notre échantillon montre une surreprésentation significative des titulaires d'un CAP ou d'un BEP et de ceux qui ont un BEPC. La pêche à pied peut dès lors être considérée comme une activité de loisir « populaire ».

Les risques de l'activité

Les pêcheurs interrogés déclarent pêcher majoritairement des crustacés (58%). 12,3% pêchent des moules et 4,6% des couteaux.

Si l'on s'intéresse à la représentation des risques des pêcheurs, 74,7% mettent en avant ceux qui présentent un danger immédiat, au moment de la pratique, pour leur intégrité physique (tomber ou glisser, de se blesser ou de se faire piéger par la marée).

Pour 12,7% des interrogés l'activité pêche à pied ne présente aucun risque. Et seuls 7,3% d'entre eux identifient un risque sanitaire, lié à une possible intoxication. Lorsqu'un risque est perçu, les conséquences sur la santé ne sont pas, elles, clairement identifiées (attraper un microbe, avoir de la fièvre, des maux de ventre ou des problèmes gastriques).

Comment comprendre cette différence entre le risque de contamination, identifié par les scientifiques, et la représentation d'une absence de risque sanitaire, dominante chez les pêcheurs à pied ?

Le risque des scientifiques, la surdité des pêcheurs

L'identification des risques varie en fonction de la connaissance qu'ont les individus de la situation. A chaque culture correspond de « bons » et de « mauvais » risques. Les entrepreneurs de morale définissent ce qui constitue une menace pour les individus. Ils énoncent de cette façon des principes de précaution voire des interdictions au nom de « l'intérêt général ». Autrement dit les entrepreneurs de morale reconnaissent un danger et le construisent comme un risque identifié. Un risque correspond alors à un problème « équipé » en tant que risque (Gilbert C., 2003).

De risque privé, la santé est devenue l'affaire de tous et est entrée dans le champ des risques collectifs. Les pouvoirs publics sont désormais tenus à l'évaluation des risques sanitaires et à la mise en place de dispositifs de veille, d'alerte, de police et de précaution.

S'opposent alors le droit des personnes de faire ce qu'elles veulent d'elles-mêmes et les enjeux sanitaires qui font de la santé un problème public. Ce sont finalement deux définitions du bien qui s'affrontent, dans la mesure où l'analyse des risques, effectuée par les pouvoirs publics grâce au recours à l'expertise scientifique, ne rencontre pas toujours les risques identifiés par le public (Gilbert C., 2003).

L'absence de risque pour les pêcheurs peut être liée à l'absence de pollution visible. En effet 73,3% d'entre eux considèrent que leur zone de pêche « n'est pas polluée ». Différentes études montrent que les informations officielles ou les recommandations des experts comptent moins que les signes visibles de pollution (Day R. J., 2006 ; Bickerstaff K. et Walker G., 2001 ; Wakefield S. et al, 2001, Sirost O. et al, 2007).

Un autre élément explicatif peut être la méconnaissance de l'interdiction. Pour 94,1% des interrogés, « la pêche est autorisée sur leur zone de pêche ». L'absence de panneaux signalant formellement l'interdiction du ramassage des coquillages leur laisse penser que la pêche y est autorisée. De plus, les interdictions ponctuelles sont affichées sur le site d'Antifer, mais elles ne le sont pas au Havre et à Octeville. Lorsqu'un affichage ponctuel est effectué en période d'alerte sanitaire sur le littoral, les pêcheurs peuvent estimer qu'une fois l'alerte passée la pêche est de nouveau autorisée.

Mais le refus de l'interdiction est aussi l'expression d'un refus des contraintes, ou au moins d'une demande de desserrement de celles-ci, au bénéfice de la responsabilité individuelle et préférant l'incitation à l'obligation (Tabuteau D., 2007). Pour Tabuteau, lorsqu'il y a « trop » d'interdiction, celle-ci devient soit banalisée, soit intolérable, mais les deux cas incitent à un non-respect de la règle.

Ce sont deux conceptions d'une même réalité socionaturelle qui s'opposent et qui mettent en jeu des savoirs « savants » et des savoirs « populaires ». Pour les scientifiques, le ramassage des moules présente un danger, alors que pour les pêcheurs elle est une activité « innocente », sans risque, de loisir où se combine utilitarisme (« manger des produits frais ») et plaisir (« se détendre au contact du milieu marin »). Pour Hobson-West, nous vivons dans un nouvel ordre social, où le système d'expertise scientifique a perdu le monopole de la vérité (Hobson-West P., 2003). La divergence d'analyse entre les scientifiques et le grand public résulte de la différence d'attention qu'ils portent au danger. Plusieurs logiques sont mobilisées. Les scientifiques se concentrent notamment sur la fréquence et la gravité des conséquences de l'exposition au danger. Le grand public se concentre quant à lui sur des connaissances résultant d'expériences vécues, et sur les informations, incomplètes, dont il dispose (Zinn J.O., 2008 ; Krystallis A. et al, 2007).

Or on constate une certaine opacité dans le discours des scientifiques. Les quantités à ingérer présentant des risques pour la santé semblent assez éloignées des pratiques des pêcheurs.

L'ignorance et l'incompréhension de l'interdit, face à un danger qui n'est pas immédiat et dont les pêcheurs ignorent la nature, laisse place à une transgression « en toute bonne foi » de la norme. Les populations exposées ne veulent pas toujours savoir qu'elles le sont, elles ne veulent pas « croire » au risque, car cette représentation va à l'encontre de leurs croyances ou de comportements durablement établis (Appéré G., 2006). Comme le souligne Sirost (Sirost O. et al, 2007) dans une enquête relative à la perception des risques chimiques en estuaire de Seine, entre traditions (baignade, pêche, nautisme) et habitations à proximité, l'appropriation de l'eau rend caduques les mises en garde (politiques, scientifiques, affichages). Malgré les risques identifiés par les scientifiques, la tradition de la pêche à pied et les représentations des risques des usagers rendent sourd aux mises en garde. Les interdictions sont vues comme des précautions prises « à l'usage des touristes » et comme une restriction de leur liberté d'accéder et d'utiliser le littoral comme ils l'entendent.

La stratégie des pêcheurs déviants, lorsqu'ils connaissent la norme, consiste alors à décrédibiliser l'interdiction par voie de constats contradictoires (Geffroy G. et Papinot C., 2005) (« ça n'a aucun sens, c'est fait pour les touristes, c'est fait pour empêcher l'épuisement des ressources »), à puiser dans leur propre expérience des motifs de négation (« je n'ai jamais été malade ») et à justifier leur comportement (« ça fait 50 ans que je pêche ici, c'est une tradition »).

Dans la gestion des risques collectifs, le comportement des individus face au risque n'est pas considéré comme une donnée primordiale (Appéré G., 2006), et les procédures d'interdictions ne s'accompagnent pas nécessairement d'une campagne d'information : c'est aussi l'une des explications possibles du refus de l'interdiction et de la méconnaissance globale du règlement. Appéré et Bonnioux confirment pourtant l'importance de l'information dans le processus de construction du risque sanitaire par les pêcheurs à pied (Appéré G. et Bonnioux F., 2003).

◆ **Contrôlée à Etretat, ignorée à Antifer : une gestion hétérogène de l'espace et socialement différenciée**

Au cours de l'enquête, une alerte sanitaire a été lancée. Elle a fait l'objet de contrôles policiers qui visaient d'une part à dissuader les pêcheurs de moules, d'autres part, à vérifier le contenu des pêches. Dès lors que s'exerce un contrôle du respect de l'interdiction, l'activité est construite comme une déviance.

Le comportement déviant est ici construit par la présence policière, mais celle-ci ne s'exerce par partout de la même façon. La commune d'Etretat, à quelques kilomètres d'Antifer, a fait l'objet d'une surveillance sanitaire pendant la période d'alerte. Site prestigieux, Etretat accueille en période estivale de nombreux touristes. Ici, la sécurité sanitaire s'affiche.

Les trois sites considérés sensibles n'ont, en revanche, fait l'objet d'aucun contrôle. Activité de locaux et d'habitues sur des sites plutôt « confidentiels », car peu connus des touristes, la sécurité sanitaire est ici davantage un risque « domestique » (Martin, 2008), géré individuellement, dans l'entre soi. Certains pêcheurs habitués d'Etretat se sont même rendus exceptionnellement à Antifer pour se soustraire aux contrôles.

Cette action non homogène et différenciée des territoires et des populations par les forces de l'ordre produit deux types de déviance. Une déviance finalement inexistante en période d'alerte à Etretat par l'effet dissuasif de la présence policière. En revanche, l'absence de contrôle sur les trois sites d'enquête fait de cette même pratique une déviance discrète, tolérée, que l'on feint d'ignorer. Le regard est détourné, et aucune sanction n'est appliquée. La pêche à pied se traduit, sur ces sites, par un laisser-faire.

Ni les pêcheurs désertant Etretat, ni les policiers présents sur ces sites ne sont dupes. Chacun sauve la face (Goffman, 1974), et la vie quotidienne se présente ici dans ce qu'elle a de plus absurde, vide de sens, dans la mesure où on se détourne des problèmes plus qu'on ne les traite ou les affrontes. Au final dans ce jeu de « dupes » tout le monde sort à la fois « grandi » et menacé. Les autorités de contrôle font leur travail, mais le problème demeure. Le préfet, lui, se protège puisqu'il interdit et contrôle sans pour autant faire de prévention sur les sites les plus sensibles. Les pêcheurs sont satisfaits de la possibilité de poursuivre leur activité au-delà des interdictions. Et enfin, les scientifiques ont alerté les pouvoirs publics et continuent à percevoir des financements pour l'étude des moules alors que la majorité des pêcheurs ramassent et consomment des crustacés. La sécurité sanitaire est alors vidée de sa substance et perd son sens dans la mesure où les contrôles sont insuffisants et qu'une tolérance s'est établie (Tabuteau, 2007). L'intervention des autorités de contrôle perd de son efficacité. La science, de son côté, perd de sa pertinence et de son utilité sociale. Et le gouvernement perd de sa crédibilité dans les campagnes de prévention des risques.

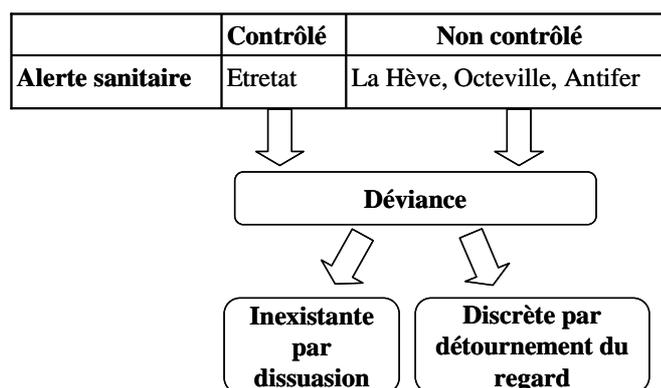


Figure 59 : Processus de construction de la déviance dans l'activité pêche à pied.

◆ **L'affichage de revendications à Antifer**

Contrairement aux sites d'Octeville et de La Hève où la pêche à pied, sans être véritablement cachée, se fait discrète, à Antifer, la transgression de l'interdit s'affiche pour donner à voir des revendications. Opposés à la construction du terminal méthanier, les pratiquants instrumentalisent l'activité à la fois pour marquer leur emprise territoriale, donner à voir leurs revendications et promouvoir un littoral ludique, alternatif. La pêche à pied sert ici de symbole politique vis-à-vis des questions d'aménagement du territoire.

Par la « cueillette », les pêcheurs marquent leur possession et transforment l'espace public en territoire revendiqué socialement (Papinot, 2003) et marqueur des appartenances locales. L'activité se trouve alors instrumentalisée comme mode d'occupation du territoire et emblème de la contestation. Des animations pêche à pied sont ainsi organisées au cours de l'été 2008 et sont l'occasion de rappeler ce qui risque d'être perdu si le projet aboutit.

Par la mise en scène d'une activité traditionnelle, le jeu consiste à faire reconnaître un problème non identifié comme tel par les pouvoirs publics. Les groupes protestataires tentent alors de faire pression sur les décideurs politiques. En mobilisant et en prenant à témoins l'opinion publique et politique locale, les acteurs de la société civile interpellent les gestionnaires et sont à l'origine de la constitution du projet de terminal méthanier en « problème » (Godard, 2003), en réaction à l'échec du débat public.

Ce qui paraît paradoxal dans le cas d'Antifer c'est que la contestation s'exprime dans des espaces et pour des paysages inattendus. Les pêcheurs à pied s'organisent pour résister et défendre un territoire et un paysage qui, loin d'être « naturel », est au contraire industrialisé et artificialisé. De plus, s'ils demandent l'application du « principe de précaution » au regard du risque environnemental, ils ne tiennent pas compte des alertes sanitaires lancées sur le ramassage des moules.

Comprendre le non-respect des interdictions par les pêcheurs suppose de ne pas les réduire à de « simples » agents rationnels, mais de prendre également en compte leurs cultures et leurs enracinements sociaux et spatiaux (Zinn J.O., 2008). L'analyse d'une activité aussi anodine que la pêche à pied contribue ainsi à révéler des « jeux », des stratégies et des mises en scène.

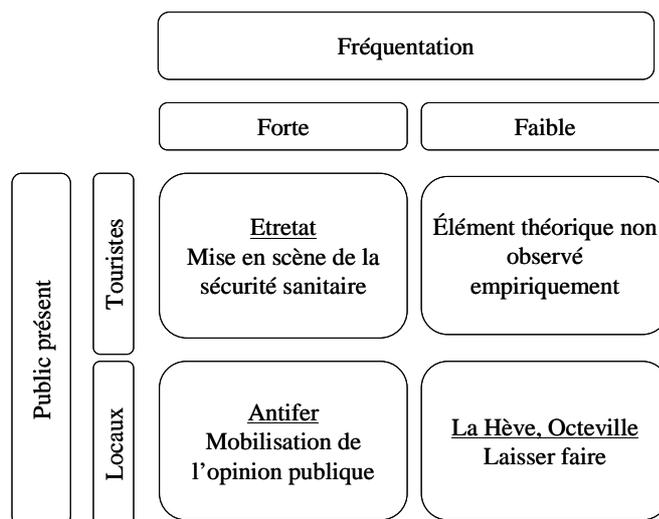


Figure 60: Processus sociaux à l'œuvre dans la mise en scène de l'activité pêche à pied

La déviance apparaît dès lors comme le sous-produit d'une non gestion ou d'une gestion difficile face au poids de la tradition et à la non perméabilité des pêcheurs à une réglementation extérieure. Ce constat conduit de fait à interroger les systèmes de gouvernance locaux en place, puisque parler de gouvernance c'est finalement parler de régulations et d'adaptations de l'action politique.

◆ **Les activités récréatives dans la vallée de la Risle**

Nous ne sommes pas actuellement en mesure de fournir les résultats définitifs de l'enquête sociologique menée sur la Risle. Les données ont été recueillies mais le post-doctorant chargé de l'analyse n'a pas rempli son contrat. Un vacataire est actuellement recruté pour finaliser l'étude.

Echantillonnage et représentativité

Le principe d'échantillonnage retenu visait à toucher différents publics en fonction du type d'expérience vécu sur la Risle en fonction de quatre critères

- expérience de la vallée (partie terrestre)
- expérience du cours d'eau (lit mineur)
- expérience régulière
- expérience occasionnelle

	Expérience régulière	Expérience occasionnelle	Total
Vallée	330	214	544
Cours d'eau	243	299	542
Total	573	513	1086

Tableau 30 : Nombre de questionnaire recueillis sur le bassin versant de la Risle entre juillet et octobre 2010.

La taille de l'échantillon a été déterminée en considérant un risque d'erreur de 3% et un seuil de significativité fixé à $p < .05$ selon la formule :

$$n = \frac{Z^2 * N}{Z^2 + (I^2 * (N - 1))}$$

Où : N = la taille de la population de référence. Le bassin versant de la Risle compte 310 communes et 165 900 habitants en 1999 (moyenne de 535 habitants par communes).

I = la marge d'erreur admise. Ici nous considérons acceptable une marge d'erreur de 3%.

Z = le seuil de significativité choisit, soit $p < .05$.

Dès lors, notre échantillon doit être au moins égal à 1060 personnes interrogées. 1086 questionnaires exploitables ont été recueillis. On peut considérer que les résultats de l'enquête seront fiables et peuvent être généralisés à l'ensemble de la population de référence.

Comme indiqué précédemment, la passation des questionnaires s'est faite sur un large panel de sites. Nous avons déjà précisé les raisons qui ont motivé la passation de questionnaires à cette échelle.



Figure 61 : Lieux de passation des questionnaires à l'échelle du bassin versant de la Risle.

Premiers résultats

La glisse en Risle se pratique principalement sur la rivière même si le canoë-kayak se pratique aussi sur deux des trois bases du bassin versant, la fréquentation y est marginale. A une pratique annuelle de compétitions, associée bien évidemment aux entraînements de 400 licenciés environ en 2009, vient se greffer une pratique estivale intense puisque cinq clubs proposent des descentes de rivières qui en totalisent plus de 5000.

Le club de Pont-Audemer réalise à lui seul environ 50 % des descentes de rivières soit 2600 en 2010. La majorité des descentes s'effectuent sur un linéaire de rivières de moins de 25 kilomètres entre Brionne et Pont-Audemer.

Différentes options de descentes existent : Brionne à Pont-Authou, Pont-Authou à Montfort-sur-Risle, Montfort-sur-Risle à Corneville-sur-Risle, Corneville-sur-Risle à Pont-Audemer, Des ponts-gras (amont de Corneville) à Pont-Audemer, Appeville à Pont-Audemer. Moins connu, il existe aussi des parcours en amont : Saint-Sulpice-sur-Risle à Saint-Martin d'Ecublei, Saint-Sulpice à Rugles, Rugles à Ambenay, Rugles à La Neuve-Lyre et Rugles à La Vieille-Lyre (maximum 800 descentes).

La fréquentation est liée principalement aux conditions météorologiques, les belles journées conduisent les personnes à préférer la mer au kayak ou encore les grosses journées de fréquentations déportent des publics d'un club vers l'autre.

Les clubs de la Risle sont aussi tournés vers la compétition, principalement dans la discipline slalom du kayak. Presque tous les clubs disposent d'au moins un équipement en rivière.

La pêche en Risle est également une activité importante. On ne peut pas parler d'homogénéité dans le public concerné par la pêche, tant par l'origine sociale des pratiquants que par les modes de pêche (plus ou moins dynamique), ou les lieux de pêche (nécessitant un investissement financier varié).

Pour certains, l'objectif est de ramener du poisson, ils sont d'ailleurs appelés par les « puristes », des « viandards », d'autres envisagent la pêche comme un sport presque de combat qui consiste à jouer avec le poisson. Le poisson pêché est globalement consommé, il s'agit principalement de salmonidés et de truites en particulier (arc-en-ciel et fario).

En Risle, il existe une pêche gratuite et une autre payante. Sur le domaine maritime public, par sa gratuité, cette pêche peut être considérée comme alimentaire mais elle ne se limite pas à ce public. On trouve aussi des carpistes ou des pêcheurs à pied à l'embouchure de la Risle dans l'estuaire de Seine. Cette pêche est aussi fonction des marées.

Ce bassin compte aussi un grand nombre d'étangs de pêche (privés ou non), de piscicultures (au nombre de 6, celles qui en produisent plus de 20 tonnes sont considérées au regard de leurs rejets en rivière comme des installations classées), des sociétés de pêche (2 dans l'Orne et 6 dans l'Eure soit 8 dans le bassin versant de la Risle qui vendent à la fois des permis fédéraux et des actions de leurs sociétés permettant l'accès à leur parcours de pêche).

On arrive à un total de 16355 pêcheurs (avec les double-comptes), sachant qu'une seule pisciculture représente 11 000 demi-journées de pêche. Ce chiffre approximatif tient compte de cartes vendues à la journée, les permis, les actions etc. Certains chiffres n'ont pas pu être obtenus : nous sommes donc sur une fourchette basse.

Entre pisciculture et société de pêche, le public diffère entre une pêche que certains comparent à une pratique de « chasse », et une pêche récréative à la truite en pisciculture ou étang, ou encore une pêche sportive à la carpe.

Si des contrôles vétérinaires sont effectués en piscicultures, puisque les poissons sont consommés, un président de société de pêche affirme qu'il n'y a pas eu d'études sur les PCB en Risle. Le risque n'existe pas dans la mesure où il n'a pas été mesuré.

S'il peut exister des conflits entre pêcheurs, sur les territoires de pêche, la non appartenance à une Entente halieutique (comme l'Entente Halieutique du Grand Ouest, EHGO) est pointée par certains comme une limite, la pêche sur la Risle est complexe et payante, et en fonction des tronçons il ne s'agit pas des mêmes AAPPMA (Association Agréée de Pêche et de Protection des Milieux Aquatiques).

Un autre problème a été soulevé, les pêcheurs comme les kayakistes se trouvent, tous deux, être des usagers de l'eau, pour autant les premiers acquittent une taxe : le timbre CPMA (cotisation pêche milieu aquatique) qui est valable sur tout le territoire et qui est reversé à l'ONEMA. Certains pêcheurs voient là une discrimination alors même que les kayakistes présentent une nuisance pour la rivière, les poissons (frayères) et les pêcheurs, ces derniers ne s'acquittent d'aucun droit en faveur du milieu naturel.

III-5-2 Représentation des acteurs (praticiens hospitaliers et exploitants agricoles) du risque sanitaire et environnemental lié à l'usage des antibiotiques (contribution du CARE EA2260)

◆ Premiers enseignements de l'enquête : analyse des statistiques descriptives

L'analyse des caractéristiques des médecins ayant répondu au questionnaire nous montre que ces derniers constituent un échantillon pouvant être considéré comme représentatif de la population cible, à savoir les médecins de la région Haute-Normandie.

L'enquête portant sur des phénomènes de pollution et, en particulier, sur des phénomènes de pollution des eaux, les personnes ont été interrogées sur certains de leurs comportements et sentiments individuels afin de contrôler les analyses ultérieures par ces éléments. Ainsi il apparaît que 80% des personnes interrogées déclarent consommer régulièrement de l'eau du robinet, ce qui semble légèrement supérieur à ce qui est généralement observé. Ainsi une enquête publiée en 2003 et exploitant les résultats de l'enquête alimentaire INCA1 réalisée en 1999⁶, chiffrait à 69% la part des français consommateurs d'eau du robinet. Des études plus récentes de l'OCDE chiffrent à 2/3 la part de la population des pays développés qui consomme régulièrement de l'eau du robinet⁷. Sur le plan de leurs loisirs, la population des médecins semble clairement atypique par rapport à l'ensemble de la population haut-normande puisque 43% des médecins déclarent pratiquer des activités récréatives sur les cours d'eau ou les rivages de la région.

Les questions (15 à 21) portent sur la perception comparative de quatre risques sanitaires et/ou environnementaux, potentiels et/ou avérés, déjà décrits dans la partie consacrée à la méthodologie et désignés par leurs acronymes : POLAIR, MEDEAU, CHIMEAU et ANTIBIO⁸. Pour chaque question et pour chaque risque l'enquêté devait répondre en indiquant un score sur une échelle graduée de 0 à 5. Le tableau suivant présente les scores moyens et entre parenthèse le rang obtenu par chaque risque pour chaque question. Lorsque plusieurs risques sont classés au même rang c'est que le test de comparaison de moyennes n'a pas mis en évidence de différence significative entre les scores moyens obtenus par les différents risques.

⁶ P. Beaudeau, A. Zeghnoun, M. Ledrans, J.-L. Volatier, 2003, « Consommation d'eau du robinet pour la boisson en France métropolitaine : résultats tirés de l'enquête alimentaire INCA1 », *Environnement, Risques & Santé*, Volume 2, Numéro 3.

⁷ <http://www.oecdobserver.org/news/fullstory.php/aid/3221>

⁸ POLAIR : La présence de polluants dans l'air (oxydes de soufre, oxydes d'azote, ozone, monoxyde de carbone, plomb, particules, etc.)

MEDEAU : La présence de résidus de médicaments dans l'eau (antibiotiques, anti-cancéreux, antidépresseurs, bêtabloquants, hormones, etc.)

CHIMEAU : La présence de contaminants chimiques dans l'eau (HAP, PCB, pesticides, métaux lourds, etc.)

ANTIBIO : L'utilisation des antibiotiques en médecine (antibio-résistance, infections nosocomiales, épidémies, etc.)

	POLAIR	MEDEAU	CHIMEAU	ANTIBIO
Quel est votre degré d'inquiétude vis-à-vis de chacun de ces risques ?	2,84 (3)	2,64 (4)	3,09 (1)	3,04 (1)
Avez-vous déjà entendu parler de ces différents risques ?	2,97 (2)	2,44 (4)	2,91 (2)	3,37 (1)
Estimez-vous être bien informé sur ces différents risques ?	1,90 (2)	1,63 (4)	1,83 (2)	2,57 (1)
Comment percevez-vous le degré d'incertitude des scientifiques vis-à-vis de leur connaissance de ces risques ?	2,43 (2)	2,62 (1)	2,49 (2)	2,49 (2)
Comment jugez-vous la gravité des conséquences potentielles de ces risques ?	3,25 (3)	3,14 (4)	3,43 (1)	3,42 (1)
Même sans être en mesure d'établir une relation de causalité certaine, pensez-vous avoir déjà rencontré des patients présentant des symptômes qui pourraient être liés à ces risques ?	2,18 (1)	0,81 (4)	1,07 (3)	1,67 (2)
Avez-vous confiance dans la capacité des pouvoirs publics à prendre les mesures nécessaires pour gérer et maîtriser ces risques ?	1,70 (2)	1,58 (4)	1,68 (2)	2,05 (1)

Ces différents phénomènes suscitent un degré d'inquiétude relativement élevé de la part des médecins et ils estiment qu'ils peuvent être à l'origine de risques ayant des conséquences plutôt graves. S'ils déclarent avoir entendu parler assez souvent de ces différents phénomènes ils se considèrent cependant insuffisamment informés. Ceci semble révéler une inadéquation de l'information transmise à la demande des médecins, dans la mesure où ces phénomènes sont plutôt mentionnés dans des sources d'information destinées au grand public et pas nécessairement dans les supports spécifiquement destinés aux médecins. Ces derniers considèrent par ailleurs que les connaissances scientifiques sur ces phénomènes sont encore relativement incertaines, ce qui peut expliquer leur sentiment de ne pas être suffisamment informés. Enfin, ils semblent n'avoir qu'une confiance très limitée dans la capacité des pouvoirs publics à intervenir de manière efficace pour gérer et maîtriser ces risques.

Il apparaît que les risques MEDEAU et ANTIBIO occupent le plus souvent les places extrêmes du classement établi à partir des réponses des médecins. Le risque MEDEAU est celui qui suscite le moins d'inquiétude, dont les médecins ont le moins entendu parler et sur lequel ils se sentent le moins bien informés. C'est également le risque pour lequel ils considèrent que les conséquences potentielles sont les moins graves, ils ont le moins été confrontés à ses effets potentiels chez leurs patients et ils ont le moins confiance aux pouvoirs publics pour sa gestion. Le risque ANTIBIO possède toutes les caractéristiques opposées (excepté en ce qui concerne la présence de symptômes chez les patients où il n'est cité qu'en deuxième position). Il est à noter que ces deux phénomènes ont des caractéristiques très différentes dans la mesure où l'un est lié à un risque uniquement sanitaire alors que l'autre n'est pour l'instant envisagé que comme un risque environnemental potentiel, l'un a fait l'objet de nombreuses campagnes d'informations auprès des médecins tandis que l'autre peut être considéré comme un risque émergent encore mal identifié et n'ayant pas fait l'objet de campagnes d'information spécifiques. Cependant ces deux phénomènes trouvent leur origine dans la consommation de médicaments et sont donc liés, au moins en partie, aux comportements de prescription des médecins. Le fait que ces deux phénomènes soient jugés de manière symétriques par les médecins semble donc impliquer que, dans ces deux cas, la perception des risques s'appuie sur des déterminants communs.

Les deux autres risques POLAIR et CHIMEAU ont des caractéristiques moins remarquables. Si le risque CHIMEAU semble inquiéter assez fortement les médecins, le risque POLAIR est celui auquel ils sont le plus souvent confrontés à travers les pathologies de leurs patients. Ces deux phénomènes partagent les caractéristiques d'être à la fois des risques

environnementaux et sanitaire dont les médecins ne peuvent pas être considérés comme responsables à travers leurs pratiques professionnelles.

La partie suivante du questionnaire fournit des éléments pour analyser le risque ANTIBIO et la manière dont les médecins généralistes ont modifié leurs comportements, notamment de prescription, à la suite des campagnes d'informations qui ont été menées depuis 2002. Plus de 62% des médecins déclarent avoir diminué leurs prescriptions d'antibiotiques depuis le début des campagnes. Le tableau suivant synthétise les informations concernant les facteurs que les médecins reconnaissent comme ayant influencé leur comportement.

	Rang	Score
Ma préoccupation face au risque d'antibiorésistance pour mes patients	1	3,54
Les recommandations du corps médical	1	3,48
Ma préoccupation face au risque d'antibiorésistance pour la collectivité	1	3,48
Les recommandations des autorités sanitaires	4	2,97
Le changement de comportement de mes patients dans leur demande de prescription	4	2,97

Les réponses semblent montrer que les médecins reçoivent des informations de leur pairs, utilisent ces informations pour élaborer une perception individuelle du risque auquel ils sont confrontés et que c'est essentiellement cette perception du risque qui détermine leur implication dans la gestion de ce risque par une modification de leur pratiques professionnelles.

En complément il était demandé aux médecins d'évaluer les principaux freins à la baisse des prescriptions. Il est à noter que si la question précédente interrogeait le médecin sur les facteurs influençant ses propres pratiques, cette nouvelle question était posée de manière générale et les médecins devaient s'exprimer pour l'ensemble de la profession.

	Rang	Score
Le manque de préoccupation des patients pour les risques liés à la consommation d'antibiotiques	1	3,55
Le manque d'information des patients sur les conséquences de l'utilisation des antibiotiques	2	3,44
La grande efficacité des antibiotiques	3	2,85
Le manque de préoccupation des médecins pour les risques liés à la consommation d'antibiotiques	4	2,34
Le manque de connaissance des médecins sur les bonnes pratiques d'utilisation des antibiotiques	5	1,87
Le manque d'information des médecins sur les conséquences de l'utilisation des antibiotiques	5	1,93

L'examen de ce tableau montre que, du point de vue des médecins, c'est la demande des patients qui est le frein le plus important à la baisse des prescriptions. Les patients ont confiance dans l'efficacité des antibiotiques pour assurer une guérison plus rapide et ne sont en revanche pas informés et/ou préoccupés par les risques liés à une utilisation excessive de ce type de médicaments.

La dernière partie du questionnaire portait plus spécifiquement sur le risque MEDEAU, associé au phénomène de pollution des eaux par les résidus de médicaments. Même s'ils estiment que les connaissances scientifiques sont encore faibles et qu'ils ne manifestent qu'un degré d'inquiétude modéré face à ce risque, 75% des médecins interrogés pensent qu'il est souhaitable que les pouvoirs publics mènent dès à présent des actions en application du principe

de précaution. Lorsqu'ils choisissent de définir les mesures les plus appropriées à mettre en œuvre, on obtient les résultats suivants :

	Rang	Score
Mener des campagnes d'information sur ce risque à destination du grand public	1	3,69
Financer des programmes de recherche visant à améliorer la connaissance de ce risque	1	3,61
Encadrer plus strictement la prescription des médicaments en médecine vétérinaire	3	3,34
Mettre en place un dispositif de veille sanitaire	4	3,19
Mener des campagnes d'information sur ce risque à destination des prescripteurs	4	3,17
Encadrer plus strictement la prescription de médicaments en médecine humaine	6	2,68
Interdire l'utilisation de certains médicaments en médecine vétérinaire	7	2,49
Interdire l'utilisation de certains médicaments en médecine humaine	8	1,85

On remarque que les mesures jugées les plus appropriées ne concernent pas directement les médecins et leurs pratiques. Globalement on constate que la hiérarchie des mesures proposées correspond assez bien à ce qui est recommandé dans la mise en œuvre du principe de précaution : les mesures les moins contraignantes pour les activités économiques et médicales, ainsi que les mesures les moins irréversibles arrivent en tête. Toutes les mesures sauf la dernière obtiennent des scores supérieurs à la moyenne et sont donc jugées plutôt appropriées face au phénomène, ceci nous laisse à penser que le phénomène est, du point de vue des médecins, associé à un risque considéré comme potentiellement important.

Il était ensuite demandé aux médecins si, d'un point de vue individuel, ils étaient prêts à participer à la gestion de ce risque en modifiant leurs pratiques.

	Rang	Score
En prescrivant des médicaments à l'unité pour limiter les quantités de médicaments dans les déchets ménagers	1	3.89
En conseillant à vos patients des pratiques leur permettant de diminuer leur exposition aux dangers éventuels	1	3.83
En informant mieux vos patients sur les règles de bon usage des médicaments au regard de la protection de l'environnement	1	3.74
En vous référant à une base de données des propriétés éco-toxicologiques des médicaments et en privilégiant les produits les moins nocifs pour l'environnement	4	3.45
Pour les antibiotiques, en opérant des substitutions entre différents types de molécules au sein d'une même classe thérapeutique (à efficacité comparable)	5	3.18
En diminuant vos prescriptions de médicaments allopathiques	6	2.87

A la lecture de ce tableau, il apparaît encore une fois que les médecins se déclarent tout à fait prêts à participer lorsque leur rôle est de transmettre de l'information à leurs patients ou d'aider ces derniers à être plus actifs dans la gestion de leur consommation de médicaments. Néanmoins on constate que toutes les mesures proposées obtiennent une note supérieure à la

moyenne, y compris la diminution des prescriptions de médicaments allopathiques. Il est également à noter que l'idée de se référer à une base de données des propriétés environnementales des médicaments est accueillie plutôt favorablement (score 3,45). Rappelons qu'un tel système est actuellement développé dans le système de santé suédois.

◆ **Analyses approfondies des résultats et interprétations**

Les résultats bruts de l'enquête nous donnent des pistes quant à la manière dont les médecins forment leur perception vis-à-vis des risques environnementaux et sanitaires ou dont il convient de les mobiliser pour susciter leur adhésion à des plans de prévention des risques. Cependant ces intuitions doivent être confirmées par des analyses approfondies des résultats obtenus.

C'est l'objet de la suite des travaux menés dans le cadre de la thèse de Nicolas Chrin (débutée en septembre 2010). Plusieurs problématiques ont été retenues pour faire l'objet d'analyses spécifiques plus approfondies, ces analyses sont, selon les cas, plus ou moins avancées. Leurs résultats n'ont pas encore fait l'objet de publication ou de présentation dans des colloques reconnus par la discipline mais certains d'entre eux ont été présentés devant la communauté scientifique à différentes occasions (séminaire régional du GRR SER, « Journées de l'environnement » organisées chaque année par la communauté des économistes de l'environnement).

- *La perception des risques environnementaux et sanitaires par les médecins* : il s'agit d'étudier quels sont les facteurs qui influencent le degré de gravité du risque perçu par les médecins (tel que déclaré dans l'enquête). Il apparaît que les facteurs objectifs individuels caractéristiques des médecins (âge, genre, taille de la patientèle, etc.) n'exercent pas de réel impact sur leur perception des risques. Les principaux facteurs explicatifs identifiés sont liés, d'une part, aux caractéristiques des risques et, d'autre part, au contexte informationnel. Différentes analyses, reposant sur des techniques statistiques différentes (estimations logistiques ordonnées avec ou sans effet aléatoire) conduisent à des résultats similaires :
 - Le fait d'avoir entendu parler d'un risque et le fait d'estimer que les conséquences potentielles de ce risque sont graves influence de manière importante le degré d'inquiétude
 - C'est également le cas du fait d'estimer être bien informé ou d'avoir déjà rencontré des patients présentant des symptômes pouvant être liés au risque. Cependant ces variables influencent différemment la perception des risques de natures différentes. En effet ces variables sont pertinentes dans le cas des risques MEDEAU et ANTIBIO, sur lesquels les médecins ont un pouvoir, une influence, alors qu'elles ne le sont pas pour les risques POLAIR et CHIMEAU dont les causes ne sont pas liées aux pratiques des médecins.
- *L'influence de la perception des risques sur les changements de pratiques des médecins* : Il s'agit d'identifier, d'après leurs déclarations concernant leurs pratiques passées, quels sont les facteurs susceptibles d'influencer, positivement ou négativement, des changements de pratiques en matière de prescription (à partir des réactions suite aux campagnes visant à réduire les prescriptions d'antibiotiques). De manière plus générale cette analyse s'inscrit dans la littérature qui cherche à identifier comment la perception des risques, dans ses différentes dimensions, affecte les décisions prises par les individus. Les analyses statistiques montrent encore une fois que les caractéristiques individuelles objectives des médecins ne sont pas déterminantes dans les changements de pratiques des médecins. En revanche, leur perception des risques associés à ces pratiques (mesuré par leur niveau d'inquiétude) et leur niveau d'information sont des facteurs explicatifs. D'autres variables ont été construites à partir du questionnaire afin de caractériser des « traits latents », ou variables attitudinales, reflétant la manière dont les médecins se positionnent par rapport à l'exercice de leur métier (indépendance/confiance vis-à-vis des pairs, des autorités sanitaires, des autorités médicales). Il apparaît que ces caractéristiques des médecins, inobservables, contribuent à expliquer leurs changements

de pratiques et donc leur perméabilité aux recommandations en matière de maîtrise des risques.

- *La compréhension du principe de précaution.* Le principe de précaution a fait, et fait encore, l'objet de nombreux débats quant à son interprétation et à sa mise en œuvre. Il s'agit ici de voir, d'une part, comment les médecins envisagent la mise en œuvre de mesures de précaution, en particulier comment ils envisagent la notion de « proportionnalité » des mesures. Nos résultats suggèrent que les médecins partagent globalement le point de vue des chercheurs sur le principe de précaution dont la mise en œuvre devrait être graduée, allant des mesures les moins coûteuses celles les plus coûteuses et les plus contraignantes pour les libertés individuelles. Concernant spécifiquement les risques liés à la présence de résidus de médicaments dans l'eau, une analyse a été menée afin d'identifier les facteurs influençant le degré d'adhésion des médecins à la mise en œuvre d'une politique conforme aux exigences du principe de précaution. Encore une fois il apparaît que les caractéristiques individuelles objectives ne constituent pas des éléments d'explication pertinents au contraire du contexte informationnel, de la perception des risques et des attitudes du médecin vis-à-vis de l'exercice de son métier.

Valorisation opérationnelle

**1- Evaluation du risque environnemental
(UMR Sisyphe)**

**2- Evaluation du risque pour la santé humaine
(synthèse sociologie, microbiologie environnementale et
médicale, et hydrologie)**

III-6 Evaluation du risque

III-6-1 Impact environnemental de la contamination en antibiotiques et en bactéries antibiorésistantes

III-6-1-1 Impact des antibiotiques sur l'activité des communautés nitrifiantes et dénitrifiantes des sédiments (expérimentation en réacteurs, UMR Sisyphe)

◆ Contexte et objectif

L'étude de l'impact des antibiotiques sur les processus microbiologique des grands cycles biogéochimiques (azote en particulier) sont d'un enjeu majeur, puisque ces processus sont largement utilisés dans les stations d'épuration pour répondre aux critères de la directive cadre sur l'eau et réduire les rejets d'azote ammoniacal ou nitrique, mais aussi mis à profit lors de la réhabilitation des fonds de rivières, des zones humides, des fonctionnalité des vasières, etc., milieux considérés comme épurateurs. Cette étude sera couplée à une autre question devenue majeure aujourd'hui, celle du développement de l'antibiorésistance, pour lequel le rôle respectif de l'environnement et des organismes traités par des antibiotiques comme réservoir de gènes reste une question ouverte.

◆ Approche méthodologique

Les effets des concentrations naturelles en antibiotiques sur la dénitrification ont été étudiés sur des sédiments prélevés à l'amont et à l'aval d'une Station d'épuration. Des prélèvements de 1 cm de profondeur ont été effectués avec des tubes en plexiglas de 47 mm diamètre. Ces sections constituent les corps des réacteurs, les sédiments y sont ainsi conservés intacts (Laverman et al, 2006). En parallèle, des échantillons ont été prélevés pour une analyse physico-chimique des sédiments (contenu en carbone, azote, humidité,...).

Trois antibiotiques ont été retenus pour étudier les effets des concentrations environnementales sur la dénitrification : la vancomycine, la fluméquine et la sulfaméthoxazole. Les expérimentations ont été effectuées avec des sédiments prélevés en février 2010 pour la vancomycine, juin et novembre 2010 pour les expériences avec la fluméquine et la sulfaméthoxazole.

Un dénombrement des bactériennes autochtones (flore aérobie hétérotrophe et mésophile) des sédiments, résistantes à ces trois antibiotiques (vancomycine, fluméquine et sulfaméthoxazole) a été réalisée sur milieux gélosés (R₂A pendant 10 jours à 20 °C) supplémentés ou non d'un antibiotique respectivement à raison de 4 mg L⁻¹ de vancomycine, 4 mg L⁻¹ de fluméquine ou 64 mg L⁻¹ de sulfaméthoxazole conformément les recommandations du Comité de l'antibiogramme de la Société Française de Microbiologie.

◆ Antibiorésistance *in situ*

Nous avons étudié les résistances des bactéries autochtones à trois antibiotiques (Tableau 31). Les pourcentages de résistance des bactéries autochtones des sédiments, à la vancomycine et sulfaméthoxazole augmentent de 14 à 34% et de 17 à 85% de l'amont à l'aval du rejet respectivement. En revanche, la résistance à la fluméquine est plus faible (65%) dans le sédiment en aval par rapport à ceux d'amont (86%). La fluméquine, par rapport aux deux autres antibiotiques, est en effet d'origine vétérinaire et n'est donc pas présent dans les effluents de la STEP (cf § Discussion).

	Antibiorésistance <i>in situ</i> (%)		
	VA	FLU	SMX
Amont	14	86	17
Aval	34	65	85

VA : Vancomycine ; FLU : Fluméquine ; SMX : Sulfaméthoxazole

Tableau 31 : Antibiorésistance des bactéries autochtones aux antibiotiques étudiés

◆ Effets de la vancomycine, fluméquine et sulfaméthoxazole sur la dénitrification

Taux de réduction du nitrate

La réduction du nitrate dans les sédiments amont et aval et les effets des différentes concentrations de vancomycine sur ces taux sont représentés sur la Figure 62. Les taux de réduction de nitrate montrent une baisse significative par rapport au contrôle pour la concentration la plus élevée de vancomycine (1000 µg/L Mann Whitney, $p < 0,01$). Les concentrations environnementales de sulfaméthoxazole ont un effet léger mais significatif sur la réduction de nitrate ; amont 100 ng/L et aval 1000 ng/L (Mann Whitney, $p < 0,05$).

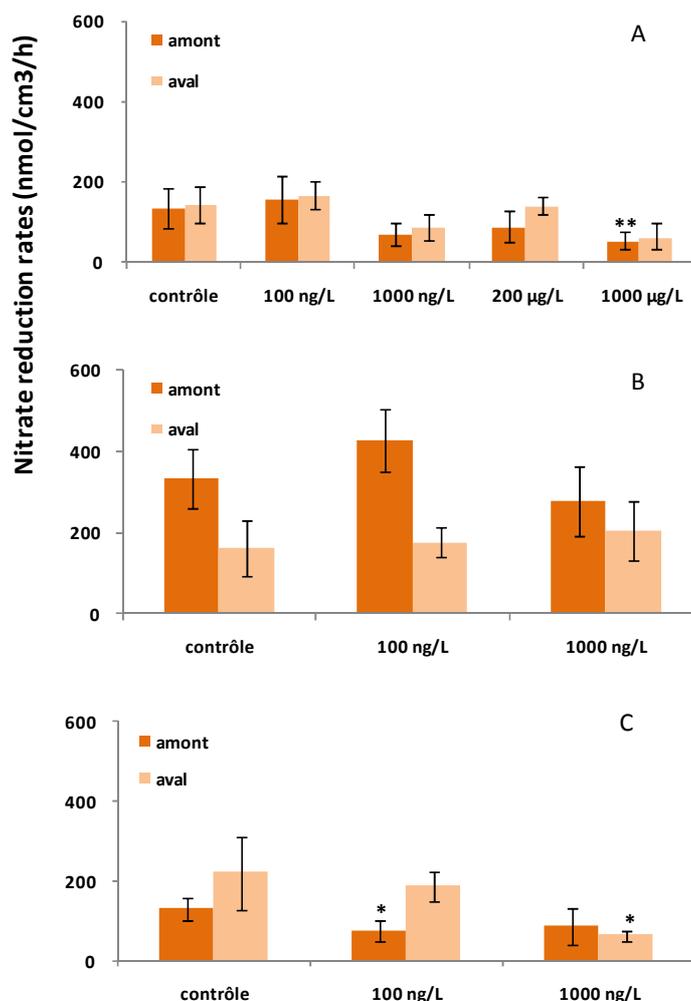


Figure 62 : Taux moyen de réduction du nitrate en $\text{nmol NO}_3^{-1} \text{ cm}^{-3} \text{ h}^{-1}$ des sédiments amont et aval (moyenne de triplicat et la sortie des réacteurs entre 6 et 24 jours). Tous les réacteurs sont alimentés avec 5 mM de nitrate et différentes concentrations de vancomycine, février 2010 (A), fluméquine juin 2010 (B) et sulfaméthoxazole novembre 2010 (C).

Taux de production du nitrite

La dénitrification est la réduction du nitrate en N_2 ou N_2O par l'intermédiaire du nitrite. Nous avons donc déterminé en même temps la production de nitrite, produit intermédiaire de la dénitrification par des sédiments. La Figure 63 montre les effets des mêmes concentrations environnementales en vancomycine, fluméquine et sulfaméthoxazole sur les taux de production du nitrite dans les sédiments en amont et aval. Pour les concentrations environnementales, on n'observe pas d'effet, mais l'utilisation de concentrations de 200 et 1000 µg/L de vancomycine induit une production de nitrite plus élevée comparativement au contrôle (Mann Whitney, $p < 0,05$).

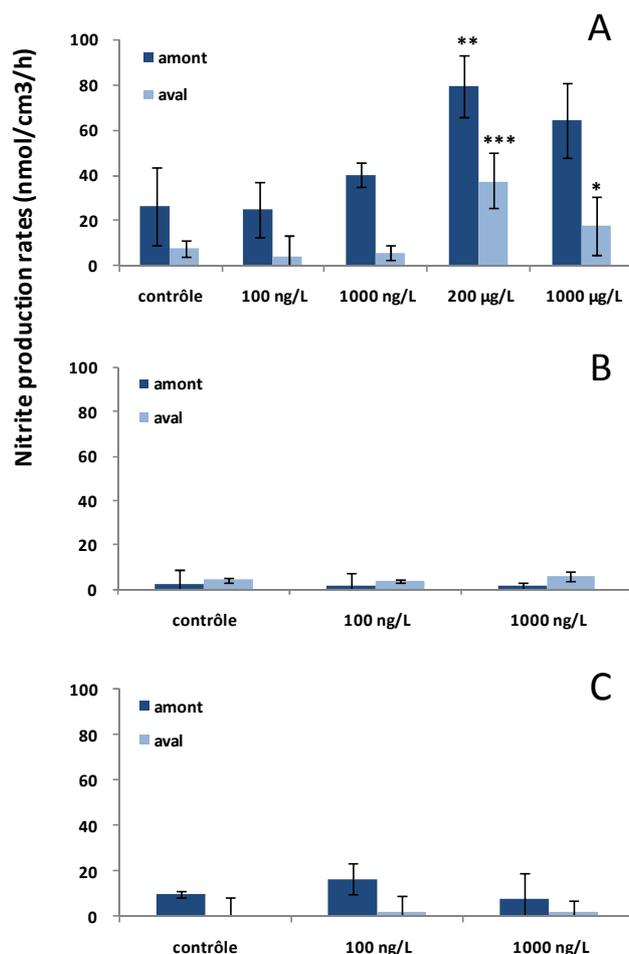


Figure 63 : Taux moyen de production du nitrite en $\text{nmol NO}_2^{-1} \text{ cm}^{-3} \text{ h}^{-1}$ des sédiments amont et aval (moyenne de triplicat et la sortie des réacteurs entre 6 et 24 jours). Tous les réacteurs sont alimentés avec 5 mM de nitrate et différentes concentrations de vancomycine (A), fluméquine (B) et sulfaméthoxazole (C) ; $p < 0,05$ *, $p < 0,01$ **, $p < 0,001$ ***.

◆ Conclusions et perspectives

En général les études faites jusqu'à présent montrent un effet inhibiteur sur les processus biogéochimiques dans le cycle d'azote, mais également dans les autres cycles. Cependant les résultats sont nettement insuffisants pour appréhender le rôle des antibiotiques sur les processus, car des concentrations très élevées, et donc non retrouvées dans l'environnement sont utilisées. De plus, le seul test qui utilisait des concentrations plus basses, observées dans l'environnement (Constanzo et al 2005) ciblait des effets directs, à court terme.

Nous avons déterminé les effets de la vancomycine au cours de 3 semaines, une période pendant laquelle un effet des antibiotiques sur la communauté microbienne et donc les activités est attendu. Nos résultats montrent un effet de la vancomycine sur la production de nitrite, intermédiaire de la dénitrification. La réduction de nitrate ne semble pas affectée sur cette période. Nous prévoyons de tester les effets d'autres molécules antibiotiques sur la dénitrification et ses intermédiaires.

Les résistances des bactéries autochtones cultivables des sédiments en amont et en aval du rejet ont été testées vis-à-vis de 3 antibiotiques : la vancomycine, la fluméquine et le sulfaméthoxazole. Au niveau de la résistance à la vancomycine, on observe des résistances plus importantes dans les sédiments en aval en raison d'une contamination par la vancomycine, d'origine hospitalière. Les mêmes observations ont été faites pour le sulfaméthoxazole. En revanche, la proportion de bactéries autochtones résistante à la fluméquine est plus faible dans le sédiment d'aval qu'à l'amont. Cet effet pourrait être dû à la dilution par le rejet de STEP qui ne contient pas cet antibiotique à usage vétérinaire.

Notre étude montre que la vancomycine et la fluméquine, à de faibles concentrations (100 et 1000 ng L⁻¹), mais qui correspondent aux concentrations observées dans les milieux (Halling-Sorensen et al, 1998; Hirsch et al, 1999; Petrovic et al, 2005; Tamtam et al, 2008) -*et que nous avons donc choisi d'appliquer*-, ne modifient pas significativement les taux de réduction du nitrate dans les sédiments amont et aval du rejet de STEP. Des faibles diminutions, significatives ont été observées en présence de sulfaméthoxazole avec 100 ng L⁻¹ et 1000 ng L⁻¹.

D'après nos recherches bibliographiques, les études destinées à déterminer les effets des antibiotiques sur des processus biogéochimiques et les communautés microbiennes environnementales sont effectuées en présence d'une seule molécule d'antibiotique (Ding et He, 2010). Des travaux sur les effets d'une multi-exposition chronique à des antibiotiques à de faibles concentrations seraient nécessaires pour s'approcher au mieux les conditions environnementales. Ces travaux seront réalisés en collaboration avec l'UMR M2C.

III-6-1-2 Persistance des gènes de résistance aux antibiotiques et des bactéries d'origine fécale (en lien avec le projet Rhapsodis)

◆ Contexte et objectif

Depuis les années 1950 et le début de l'utilisation massive des antibiotiques, les bactéries pathogènes initialement sensibles aux antibiotiques ont très rapidement acquis des mécanismes de résistance, transférés pour certains à partir de bactéries environnementales. Comme exemples, on peut citer l'apparition, puis la large diffusion parmi les entérobactéries retrouvées en pathologie humaine, des gènes de résistance plasmidiques aux quinolones de type *qnr*, dont l'origine probable est une bactérie aquatique (*Shewanella algae* ; Poirel et al, 2005). Un autre exemple de transfert réussi et pérenne de gènes de l'environnement vers les bactéries pathogènes est la mobilisation à partir de différentes espèces de *Kluyvera* (une bactérie de l'environnement très rarement isolée en situation de pathogène) des gènes codant pour les bêta-lactamases à spectre large de type CTX-M aujourd'hui pandémiques et dont les conséquences thérapeutiques sont très lourdes (Poirel et al, 2002). Par la suite, la notion de résistome environnemental a été introduite et désigne les gènes de résistance appartenant à la fois aux communautés bactériennes de l'environnement et les gènes apportés par les bactéries fécales dérivées des activités humaines (Wright, 2007). Ce résistome environnemental pourrait constituer un réservoir de gènes de résistance susceptible d'être rétro-transféré à des bactéries potentiellement pathogènes. Dans les zones anthropisées, les eaux estuariennes sont le milieu récepteur terminal de cette contamination et les vasières sont des zones de décantation des particules fines, où les bactéries fécales et les contaminants chimiques se déposent. Le compartiment sédimentaire pourrait ainsi constituer un résistome environnemental enrichi et les dynamiques qui pourraient y régner, notamment les échanges de gènes de résistance entre bactéries de différents phylums sont encore peu appréhendés.

Dans le cadre du volet sanitaire du projet Rhapsodis et afin d'évaluer le rôle du compartiment sédimentaire, nous avons tout d'abord évalué la persistance de bactéries fécales d'origine allochtones dans les sédiments en recherchant un indicateur de contamination fécale et un pathogène bactérien puis nous avons évalué la persistance de gènes de résistance aux antibiotiques en fonction du contexte épidémiologique.

◆ Persistance de gènes de bactéries fécales dans les sédiments

Les gènes *uidA* d'*E.coli* et *fliC* de *Salmonella* ont été recherchés par amplification PCR (Bej et al, 1991 ; Touron et al, 2005). Le gène *uidA* qui code pour la bêta-glucuronidase présent chez *E. coli* a été détecté au niveau de 5 échantillons sur 29 analysés (Tableau 32). *E. coli* a été notamment détectée dans des dépôts sédimentaires récents (2003,7 et 2002,9) mais également dans ceux correspondant aux années 1976, 1981 et 1985. L'évolution de l'abondance des coliformes thermotolérants au niveau de la Bouille (situé à proximité des rejets de la STEP Emeraude) entre les années 1977 et 1997, indique la présence d'un maxima en 1982 et une diminution significative (1 Log) de ces indicateurs depuis 1995 (Servais et al, 1999) ; pouvant expliquer ainsi la persistance de l'ADN d'*E. coli* dans les sédiments de 1977 à 1985. Ces résultats montrent également que l'ADN d'*E. coli* ne persiste pas dans les sédiments les plus

anciens (antérieurs à 1977). L'étude de la structure de la communauté microbienne par puce à ADN (phylochips) confirme l'absence d'*E. coli* dans les sédiments antérieurs à 1977.

La persistance de l'ADN du pathogène bactérien *Salmonella* dans les sédiments estuariens a été également recherchée par une amplification PCR multiplex nichée. Le gène ciblé est le gène *fliC* codant pour la flagelline (protéine du flagelle). Le gène *fliC* a été détecté au niveau d'un seul échantillon des sédiments de 2003,7 dans lequel le gène *uidA* avait déjà été détecté (Tableau 32). Pour les dépôts sédimentaires antérieurs à 2003, l'ADN de *Salmonella* n'a pas pu être détecté par PCR. A nouveau, ce résultat est confirmé par l'analyse de la diversité bactérienne obtenue par puce phylogénétique sauf pour l'échantillon de 1998,6 pour lequel la bactérie a été identifiée. Ce résultat peut s'expliquer par l'hétérogénéité du sédiment; l'analyse de la diversité ayant été effectuée sur un échantillon d'ADN correspondant à une association de trois extractions indépendantes.

A partir de carottes sédimentaires prélevées en estuaire de Seine (vasière Nord) et correspondant à des dépôts récents de sédiments (carotte de 30 cm), des travaux précédents avaient montré la présence quasi permanente de l'ADN d'*E. coli* et *Salmonella* par PCR (Berthe et al, 2008). Pour des sédiments plus anciens de la carotte Rhapsodis, il a été possible d'identifier *E. coli* jusque dans les années 1985 à 1976 sans toutefois pouvoir détecter *Salmonella*. Bien qu'étant régulièrement impacté par des bactéries d'origine fécale, ces résultats suggèrent que ces sédiments ont dans une certaine mesure une capacité d'autoépuration et que l'ADN de bactéries pathogènes semble disparaître dans les sédiments plus anciens. Ce résultat pourra être confirmé par la recherche de gènes de virulence de différents pathogènes bactériens d'origine fécale.

◆ **Persistance de gènes de résistance aux antibiotiques dans les sédiments estuariens.**

La recherche de gènes de résistance aux antibiotiques a été réalisée en collaboration avec l'équipe du Pr A. Andremont (Hôpital Bichat) sur 27 échantillons couvrant l'ensemble de la carotte sédimentaire. Les gènes de résistance aux antibiotiques ciblés par PCR sont : (a) *bla*CTX-M: codant une beta-lactamase à spectre dit « élargi » (BLSE), en expansion rapide chez les entérobactéries et notamment chez *E. coli*, ainsi que, (b) *bla*TEM: codant une beta-lactamase à spectre dit "étroit" (amorces ciblant également les dérivés de TEM donnant un phénotype de BLSE), résistance très prévalente au sein de diverses espèces mais principalement chez les entérobactéries (c) *tetA*: gène de résistance à la tétracycline fréquemment retrouvé chez les entérobactéries, et (d) *mecA* : résistance à la méthicilline chez les staphylocoques.

Année	Gène <i>uidA</i> d' <i>E.coli</i>	Gène <i>fliC</i> de <i>Salmonella</i>	Gène <i>bla_{CTX-M}</i>	Gène <i>bla_{TEM}</i>	Gène <i>mecA</i>	Gène <i>tetA</i>
2008	-	-	-	NA	-	-
2006,9	-	-	-	NA	-	-
2003,6	+	+	-	NA	-	-
2001,4	-	-	-	NA	-	-
1999,2	-	-	-	NA	-	-
1997,0	-	-	-	NA	-	-
2002,8	+	-	-	+	-	-
1999,9	-	-	-	+	-	-
1998,4	-	-	-	+	-	-
1995,5	-	-	-	+	-	-
1994,4	-	-	-	+	-	-
1992,8	-	-	-	+	-	-
1991,4	-	-	-	+	-	-
1990,3	-	-	-	+	-	-
1989	-	-	-	-	-	-
1987,1	NA	NA	-	-	-	-
1985,7	+	-	-	+	-	-
1984,5	NA	NA	-	+	-	-
1983,3	NA	NA	-	+	-	-
1982,1	NA	NA	-	+	-	-
1980,9	+	-	-	-	-	-
1976,4	+	-	-	+	-	-
1975,8	-	-	-	+	-	-
1974,9	-	-	-	-	-	-
1974,1	-	-	-	+	-	-
1973,2	-	-	-	+	-	-
1972,9	-	-	-	+	-	-
1972,7	-	-	-	-	-	-
1972,1	-	-	-	+	-	-
1971,5	-	-	-	+	-	-
1971,0	-	-	-	+	-	-
1970,4	-	-	-	+	-	-
1970,1	-	-	-	+	-	-

Tableau 32 : Détection des gènes *uidA*, *fliC* et *bla*-TEM, *bla*-CTX-M, *mecA* et *tet(A)* le long de la carotte sédimentaire. (+) et (-) indiquent respectivement la présence (-) et l'absence des gènes recherchés, (NA) indique les échantillons qui n'ont pas été analysés.

Le gène *bla*CTX-M n'a pu être détecté dans aucun des échantillons testés. Les données épidémiologiques montrent cependant depuis 2000, une expansion de souches possédant des BLSE de type CTX-M (*bla*CTX-M) au sein des entérobactéries en milieu hospitalier. Ces résultats peuvent s'interpréter par une faible proportion ou circulation de ces souches dans l'environnement et qui expliquerait leur absence notamment dans les dépôts de sédiments postérieurs aux années 2000. Au contraire, le gène *bla*TEM a été détecté dans la majorité des sédiments entre 1970 et 2002 (Tableau 32). La présence de ce gène depuis les années 1970 pourrait être relative à des apports importants de bactéries fécales résistantes ou au contraire à la présence de ce gène au sein de bactéries autochtones du milieu récepteur. Les données épidémiologiques indiquent l'occurrence de souches d'entérobactéries possédant des BLSE de type TEM/SHV majoritairement entre les années 1990 et 2000 ; cependant le gène *bla*TEM a été détecté dans la quasi-totalité des sédiments déposés depuis 1970. De plus, l'absence de détection d'*E. coli* dans les sédiments les plus anciens semble également privilégier la deuxième hypothèse. Ce résistome environnemental serait alors enrichi en gènes *bla*TEM présent chez des souches autochtones et pose alors le problème d'un rétro transfert de ces gènes de résistance à des souches potentiellement pathogènes. Le séquençage des fragments de gène *bla*TEM amplifié par PCR notamment dans les sédiments de 1970 sera réalisé dans le cadre de la thèse d'Assia Kaci et pourra apporter des éléments de réponse.

Les gènes de résistance à la tétracycline (*tetA*) et à la méthicilline (*mecA*) n'ont pas été détectés dans les mêmes sédiments que ceux analysés dans le Tableau 32. Toutefois ce résultat pourrait être imputable à l'absence de bactéries du genre *Staphylococcus* comme montré par les puces phylogénétiques et semble indiquer leur disparition rapide dans les sédiments (y compris de leur ADN). De plus, les amorces utilisées ont été développées à partir de gènes de résistance

présents chez des souches hospitalières et pourrait ne pas permettre d'amplifier le gène présent chez des souches environnementales. Ces résultats pourraient être complétés d'une approche complémentaire développée par Sommer et al (2009) permettant d'étudier le résistome environnemental par le biais d'une banque d'expression permettant ainsi de s'affranchir du biais lié à la spécificité des amorces PCR.

◆ Conclusions

Les résultats obtenus dans le cadre du projet Rhapsodis suggèrent que les sédiments anciens ont une capacité d'auto épuration et ne semblent pas favorables au maintien de gènes de virulence, de résistance aux antibiotiques issus de bactéries d'origine allochtone. Le contexte semble différent pour les dépôts sédimentaires plus récents puisque ceux-ci semblent favorables au maintien de l'ADN de bactéries d'origine fécale et donc potentiellement des gènes de virulence associés et/ou des gènes de résistance aux antibiotiques. Comme suggéré par Van Elsas et Bailey (2002), ce compartiment pourrait constituer au contraire un environnement favorable aux échanges génétiques par transferts génétiques horizontaux (conjugaison et transformation bactérienne) dans la mesure où les bactéries ne perdent pas leur viabilité.

III-6-1-3 Transfert de gènes de résistance aux antibiotiques entre bactéries allochtones et bactéries autochtones

Travaux effectués dans le cadre de la thèse Emilie Laroche financée à 50% par le programme Seine- aval.

L'objectif est d'évaluer l'impact sur l'écosystème des rejets de bactéries antibiorésistantes notamment en terme de dissémination de gènes entre les bactéries antibiorésistantes allochtones au milieu, et les communautés autochtones des eaux réceptrices. Une caractérisation des gènes de résistance et des supports correspondants a été effectué afin d'évaluer le cas échéant leur fréquence de transfert.

◆ Résultats

L'analyse génétique rétrospective de 9 souches multirésistantes aux antibiotiques isolées de l'estuaire de Seine au cours de l'exercice précédent du programme Seine–Aval, montre que ces souches hébergent des plasmides, éléments génétiques impliqués dans la dissémination des gènes de résistances aux antibiotiques au sein des communauté bactériennes par conjugaison (Tableau 33 et Figure 64). Dans le cadre de ces travaux de thèse, Emilie Laroche a montré qu'une partie de ces plasmides (8/6) étaient transférables avec des fréquences de conjugaison comprises entre $2,2 \cdot 10^{-1}$ et $2,6 \cdot 10^{-8}$ entre souches d' *E. coli*.

Il a aussi été démontré que le transfert d'un plasmide porteur de 7 résistances aux antibiotiques était possible, avec une fréquence de $2,8 \cdot 10^{-3}$, entre une souche d'*E. coli* multirésistante et une souche d'*Aeromonas* autochtone de l'estuaire de Seine. Des expériences de transformation ont démontré des co-transferts possibles de la résistance mercure – streptomycine entre une souche d'*E. coli* et une souche d'*Aeromonas* à une fréquence de 10^{-6} .

L'évaluation de ces fréquences de transfert doit être pondérée par le temps de survie et de maintien de l'ADN dans l'environnement.

Il serait intéressant de reproduire ces conditions en laboratoire, notamment au sein de biofilms ou de flocons dans le réacteur floccsim mis au point dans le cadre du projet FLUMES, ou dans des moules lors d'expérimentation en mésocosme. A l'aide d'une expérimentation en mésocosme, il serait possible de quantifier la bioaccumulation de molécules d'antibiotiques chez la moule bleue *Mytilus edulis*. Ces organismes filtreurs, où se concentrent des bactéries notamment *E. coli*, constitueraient des microenvironnements où la concentration en antibiotiques favoriserait l'émergence potentielle de souches résistantes aux antibiotiques.

III-6-2 Evaluation quantitative du risque de gastroentérites lié à la présence de souches d'*Escherichia coli* entéropathogènes chez les pratiquants de loisirs nautiques

◆ Contexte et objectif :

La démarche d'évaluation du risque microbiologique est une démarche préventive qui permet aux pouvoirs publics ou aux institutionnels concernés d'élaborer une politique de gestion du risque, de disposer d'outil d'aide à la décision afin d'améliorer la qualité des rejets, les réseaux de surveillance ou pour la mise en place des dispositifs réglementaires visant à limiter momentanément ou définitivement des usages des eaux.

La directive européenne (76/160/EEC) impose désormais une évaluation de la qualité microbiologique des eaux qui repose sur le dénombrement de deux espèces bactériennes indicatrices d'une contamination fécale : *Escherichia coli* et *Enterococcus*. Les valeurs seuils en concentration d'indicateurs microbiologiques définies par la norme, résultent d'études épidémiologiques qui ont permis d'estimer le risque lié à l'activité de baignade dans des eaux douces (Kay, 2001) et eaux marines (Wierdenmann, 2004), et une méta analyse des études épidémiologiques sur la période de 1951 à 1995, effectuée par l'InVS. Ces études ont ainsi permis d'établir une relation entre différents niveaux de contamination pour les eaux de baignades et le risque de morbidité digestive. Pour autant aucune étude spécifique aux milieux estuariens, qui intègre les particularités de cet environnement (gradient de salinité, dynamique hydrosédimentaire), n'a été conduite. Le classement et l'état qualitatif des eaux de baignade sont dorénavant les suivants : insuffisante, suffisante, bonne et excellente.

La maîtrise de la qualité de l'eau peut aussi reposer sur une approche prédictive, qui s'appuie sur une démarche quantitative de l'analyse du risque. Cette démarche préconisée par l'OMS (2003), est conduite pour une population au statut immunitaire préalablement défini et pour un agent pathogène donné selon les données présentées Figure 65.

(1) L'analyse du danger : quantification des espèces bactériennes indicatrices de contamination fécale, recherche des microorganismes pathogènes, sources de contamination, devenir dans le milieu (perte de cultivabilité, perte de viabilité, maintien du pouvoir pathogène).

(2) L'évaluation des facteurs d'exposition à ce danger : voies de contamination, identification des vecteurs à l'homme, usage de l'eau (durée, intensité, fréquence). Dans les environnements aquatiques, l'exposition est généralement associée aux risques liés à une utilisation récréative des eaux, ou bien à la consommation de produits de la mer notamment les coquillages filtreurs. En estuaire de Seine, des études de socio-économie sur l'usage des eaux de Seine, devraient permettre d'évaluer les facteurs d'exposition

(3) L'évaluation de la dose-réponse (dose infectieuse) : quantification des effets en fonction du degré d'exposition.

(4) La caractérisation du risque : basée sur la sévérité de ses effets, l'importance de l'exposition d'une population, intégrera la notion de risque acceptable par le public. L'InVS, comme l'agence américaine US-EPA propose d'adopter la valeur de 10^{-4} comme mesure du risque infectieux annuel maximum au-delà duquel des mesures de réduction du risque doivent être mise en œuvre. Toutefois le choix de cette valeur relève d'un débat politique et social et non d'un choix strictement scientifique.

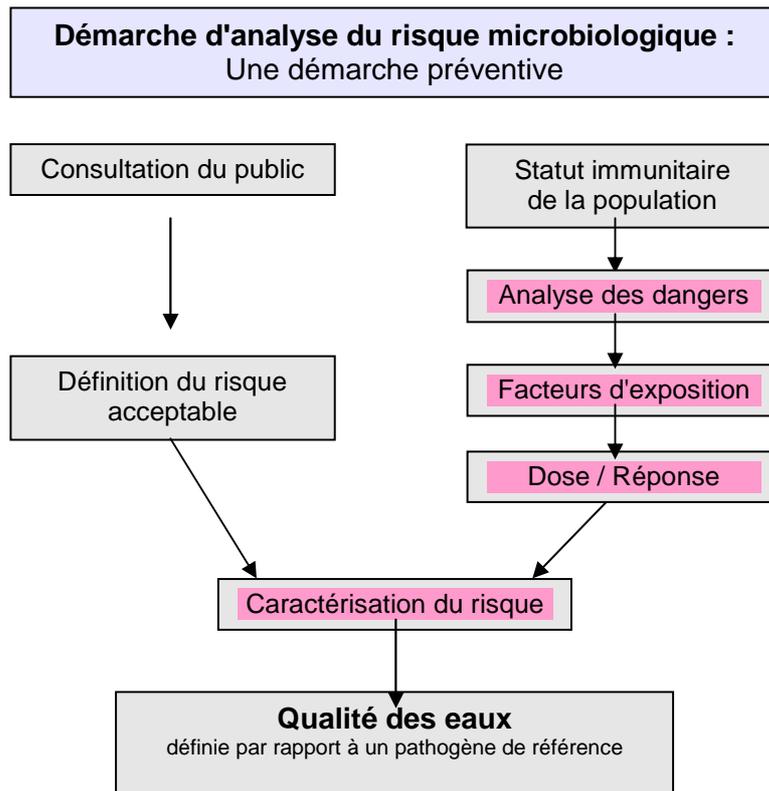


Figure 65 : Démarche quantitative de l'analyse du risque conduite pour une population au statut immunitaire préalablement défini et un agent pathogène donné.

◆ Résultats

Dans le cadre du projet Flash, la synthèse des résultats menée par les microbiologistes environnementaux et hospitaliers, les sociologues et les hydrogéologues nous permettent de faire une estimation quantitative du risque lié à la présence de souche d'*E. coli* entéropathogène dans les eaux. En effet, en parallèle au dénombrement des *Enterococcus* et des *E. coli*, la recherche systématique de gènes caractéristiques des différents pathovars intraintestinaux d'*E. coli* (ETEC : enterotoxinogen *E. coli*, EPEC : enteropathogen *E. coli*, EIEC : enteroinvasive *E. coli*, STEC/EHEC : Shiga toxin producing/enterhaemorrhagic *E. coli*, EAEC : enteroaggregative *E. coli*, DAEC : diffuseaggregative *E. coli*) a été réalisée chez 831 souches provenant des différentes collectes. Cette recherche a été menée pour les eaux des deux continuums hospitaliers et agricoles, et dans les zones de l'estuaire pour lesquelles le danger microbiologique avait été qualifié d'élevé (programme Seine – Aval3). Les études sur l'exposition humaine liée aux activités récréatives menées au sein de ce projet par les sociologues nous permettent aujourd'hui de qualifier l'exposition humaine.

Sur 831 souches il a été mis en évidence 11 souches à pathogénicité intraintestinale : 2 STEC, 1 EPEC, 3 aEPEC (EPEC atypique), 1 EAEC, 1 DAEC/EAEC, 3 DAEC. Ces isolats ont été caractérisés par leur « multilocus sequence typing » et leur O-type à des fins épidémiologiques. Il est à noter que les 2 STEC sont du même clone et isolés à des périodes différentes du même endroit, en aval d'une exploitation agricole (Tableau 34). Ceci indique que ce clone est présent dans le troupeau.

Origine (date)	Pathotype	Phylo groupe	O-type	afaD	aatA	aaiC	stx2	eae	eae type	bfpA	terD
Selles (nov09)	STEC	B1	O174	0	0	0	1	0	/	0	0
Risle (nov09)	EAEC	A0	ONT	0	1	1	0	0	/	0	1
Risle (nov09)	DAEC	A1	En cours	1	0	0	0	0	/	0	0
Risle (nov09)	aEPEC	B22	O81	0	0	0	0	1	beta 2	0	0
Selles (juin 10)	STEC	B1	O174	0	0	0	1	0	/	0	0
Risle (juin 10)	EPEC	B1	O88	0	0	0	0	1	epsilon	1	0
Tourville (juin, 10)	aEPEC	D1/E	O153	0	0	0	0	1	theta	0	0
Poses Amont (juillet 11)	aEPEC	B1	En cours	0	0	0	0	1	beta 1	0	0
Poses Amont (juillet 11)	DAEC	D2	En cours	1	0	0	0	0	/	0	0
STEP Emeraude Effluent traité (juillet 11)	DAEC	B23	En cours	1	0	0	0	0	/	0	0
STEP Emeraude Effluent traité (juillet 11)	DAEC/EAEC	A1	En cours	1	1	1	0	0	/	0	0

Tableau 34 : Gènes de virulences des 11 souches entéropathogènes isolées sur les 831 E. coli présentes dans les eaux des 2 continuum hospitaliers et agricoles, et dans les eaux de l'estuaire de Seine (juillet 2011) au cours des campagnes du projets flash

Une estimation du risque de gastroentérite lié à la présence de souches entéropathogènes dans les eaux a été effectuée sur la base des valeurs de doses infectantes rapportées dans la littérature (Kotara et Babu, 01) et des usages récréatifs connus sur la zone contaminée. Sur le site de la selle, des souches très virulentes STEC d'origine bovine ont été isolées mais à priori il n'y a pas d'usage de ces eaux à des fins récréatives ni de consommation (Tableau 35), écartant ainsi tout risque. Sur les sites de la Risle et de la Tourville, où des activités kayak ou de natation sont observées, le risque imputable à la présence de souches aEPEC, DAEC, EAEC n'est pas avéré si on considère un nombre de bactérie ingérées pour 100 mL (volume maximal ingéré par « une tasse ») et la dose infectante minimale occasionnant une gastroentérite chez l'adulte qui doit être supérieure à 10^8 . Dans son étude sur les usages nautiques, D. Féménias a montré que 70% des kayakistes ne boivent jamais la tasse, ils sont souvent dans l'eau par jeu, seul 2% la boivent très fréquemment (programme Seine-Aval, 2008). Si on considère la pratique de 6000 descentes de la Risle par an soit 1 descente / personne et /an, et si on néglige les pratiquants réguliers qui ne boivent jamais la tasse, on arriverait à une hypothèse maximale de 120 personnes (2% de 6000) /an qui boivent une tasse d'un volume compris entre 50 mL et 100 mL. Un raisonnement analogue peut être reporté pour le site de Poses où a priori il n'y a pas d'activité de loisirs. Dans les effluents traités de STEP, ce raisonnement n'est pas pertinent mais il est intéressant de considérer les risques potentiels dans les eaux directement à l'aval du rejet.

Origine (date)	Pathotype	Dose infectante ^a	Occurrence	Abondance UFC.100 mL ⁻¹	Usage	UFC/100mL	Volume d'eau critique ^b	Risque
Selles (nov 09)	STEC	10-10 ²	2% (1/50)	1,9 10 ³		38	26 mL	présence
Selles (juin 10)	STEC	10-10 ²	2% (1/49)	1,3 10 ³		26	38,5 mL	présence
Tourville (juin, 10)	aEPEC	10 ⁶ -10 ⁸	2% (1/48)	1.4 10 ³		28	5000 L	absence
Risle (nov 09)	EAEC	10 ⁸ -10 ¹⁰	2,2% (1/45)	5,8 10 ³	Natation Kayak	127	NP	absence
Risle (nov 09)	DAEC	>10 ¹⁰	2,2% (1/45)			127	NP	absence
Risle (nov 09)	aEPEC	10 ⁶ -10 ⁸	2,2% (1/45)			127	NP	absence
Risle (juin 10)	EPEC	10 ⁶ -10 ⁸	2% (1/48)	1.4 10 ⁴		280	NP	absence
Poses Amont (juillet 11)	aEPEC	10 ⁶ -10 ⁸	14% (1/7)	4 10 ¹		5,6	NP	absence
Poses Amont (juillet 11)	DAEC	>10 ¹⁰	14% (1/7)			5,6	NP	absence
STEP Emeraude Effluent traité (juillet 11)	DAEC	>10 ¹⁰	2% (1/48)	2.2 10 ⁴	NP	440	NP	absence
STEP Emeraude Effluent traité (juillet 11)	DAEC/ EAEC	10 ⁸ -10 ¹⁰	2% (1/48)	2.2 10 ⁴		440	NP	absence

^a Adultes en bonne santé, ^b Volume d'eau minimal à ingérer pour contracter une gastroentérite en fonction de la dose infectante, de l'abondance de la souche pathogène au sein de la population d' *E. coli*, et de la contamination en *E. coli*. NP, Non pertinent

Tableau 35 : Estimation du risque de gastroentérite en fonction des usages récréatifs des zones contaminées.

◆ Conclusions

Des souches d'*E. coli* entéropathogènes circulent dans les eaux de Seine, et dans celles du continuum agricole du bassin versant de la Risle. D'après les critères de la directive européenne, et sur la base des abondances des *E. coli* et des *Enterococcus*, la qualité de ces eaux était insuffisante sauf sur le site de Poses. Il serait intéressant d'évaluer les connexions hydrauliques avec les zones récréatives, et donc un éventuel impact sur le site de Lery-Poses. Ces résultats, qui devront être confirmés sur un échantillon dont l'effectif est plus important souligne le fait qu'il n'y a pas toujours de corrélation entre l'abondance des flores indicatrices et la présence de souches pathogènes, notamment la STEC *E. coli* O157 :H7 comme il a déjà été reporté dans la littérature (Williams et al, 2007).

Cette étude démontre que les eaux du continuum agricole lorsqu'il y a proximité immédiate d'une exploitation de bovins ne doivent pas être consommées ou être utilisées y compris indirectement pour la consommation humaine (cf culture hors sol à l'origine de l'épidémie de gastroentérites à STEC d'Allemagne en 2011) car il y a risque de gastroentérites sévères, qui peut s'aggraver de syndrome hémolytique et urémique. Il est toutefois notable d'observer que ces souches ne se retrouvent plus à l'aval du continuum suggérant qu'elles ne se maintiennent pas longtemps sous forme cultivable dans l'environnement aquatique.

Pour autant, une estimation quantitative du danger ne permet pas de conclure à l'existence d'un risque avéré de gastroentérite chez les pratiquants de kayak, adulte et en bonne santé, qui utilisent la zone de la Risle pour pratiquer cette activité. Cette conclusion ne peut pas être extrapolée à des enfants ou des personnes immunodéficientes.

Dans une perspective de modélisation du risque, il est possible de qualifier la vulnérabilité des eaux en fonction de l'usage du bassin versant. Ainsi, les eaux impactées par le ruissellement d'un bassin versant où se situe un élevage de bovins, sont susceptibles d'être contaminées par des souches d'*E. coli* entéropathogènes pour lesquelles les bovins sont porteurs sains, à l'issue d'un évènement pluvieux.

III-6-3 Un outil de discrimination de l'origine des contaminants microbiens (bovins / humains) lors de contamination

Au cours de ce projet, l'analyse collective des résultats entre l'équipe M2C et l'équipe INSERM U722, a montré que dans les différents hydrosystèmes étudiés, un apport en bactéries fécales d'origine humaine s'accompagne d'une augmentation de la proportion relative de souches d'*E. coli* appartenant au phylogroupe A. En revanche, une contamination d'origine bovine, se traduit par un apport de souches du groupe phylogénétique B1 (Ratajczak et al, 10). Ces résultats sont en accord avec ceux de Tenaillon et al (2010) montrant chez l'homme une prévalence plus importante de souches d'*E. coli* appartenant au groupe phylogénétique A, alors que chez les animaux domestiques et sauvages les souches d'*E. coli* appartiennent majoritairement au groupe phylogénétique B1.

A l'issue de ce projet nous proposons une méthode de discrimination l'origine des humaines ou bovines de la contamination en bactéries fécales des eaux sur la base de la distribution des groupes phylogénétiques au sein des populations d'*E. coli*. Dans le cadre de ses travaux de thèse, et en partenariat avec M. Gourmelon (Ifremer Brest), M Ratajczak a validé cette méthode en comparant avec l'approche moléculaire de discrimination des sources de contamination, basée sur la quantification des ADNr 16S de Bacteroidales spécifiques des hommes et des ruminants

Ce travail sera valorisé par une publication en collaboration avec M. Gourmelon et E. Topp (Montréal, Canada) pour une analyse comparative de nos bases de données.

III-6-4 Des éléments pour la modélisation de la contamination en bactéries fécales et/ou en antibiotiques

Les campagnes de terrain réalisées dans le cadre du projet FLASH, nous ont permis de déterminer les apports d'une zone urbaine (continuum hospitalier) mais également les apports d'origine agricole (continuum agricole). Ces données ont été extrapolées afin de prédire la contamination chimique des eaux en *E. coli* et entérocoques à partir des données existantes sur l'usage du bassin versant. Toutefois, lors de nos campagnes d'échantillonnages le long du continuum agricole, les conditions hydrologiques étaient identiques lors des deux périodes (Figure 46). En effet, pour ces deux périodes, l'absence ou la faible intensité de l'évènement pluvieux n'a pas permis de phénomène de ruissellements. Ainsi, nos résultats, qui représentent environ 58% d'une année hydrologique, ne permettent pas d'étudier l'impact des ruissellements sur la contamination des eaux. Néanmoins, ces résultats présentés précédemment soulignent la contamination ponctuelle des environnements aquatiques en fonction de l'usage des sols.

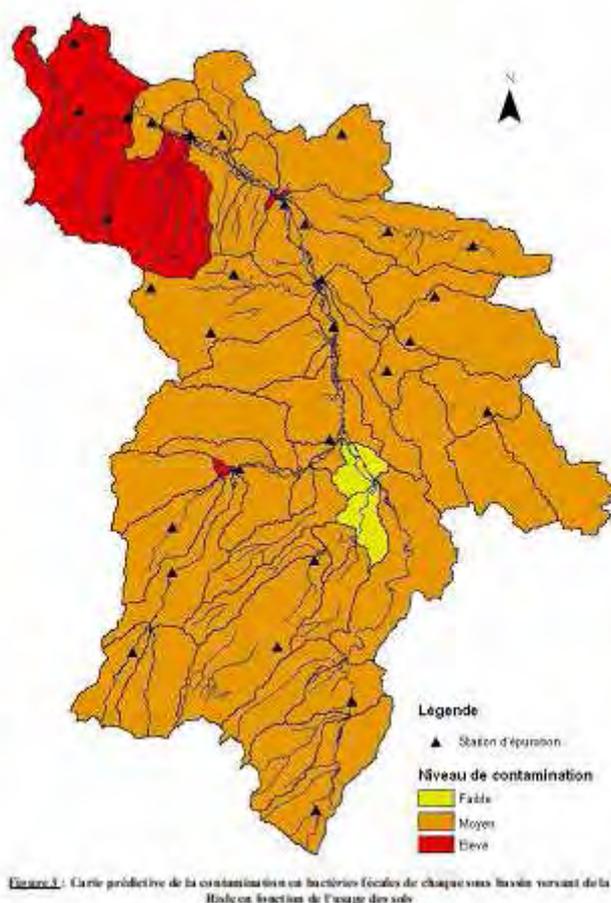


Figure 66 : Prédiction de la contamination en bactéries fécales des eaux en fonction de l'usage des sols.

Nous avons ainsi réalisé une carte en testant plusieurs scénarii sur l'usage des sols (Figure 66). Nos résultats soulignent que tous les cours d'eau des sous-bassins versants de la Risle ont un niveau de contamination basal mais que ceux localisés à l'aval sont plus contaminés. D'après cette cartographie, le sous bassin versant de la Tourville, affluent de la Risle, montre un niveau de contamination plus élevé (10^3 UFC.100mL⁻¹) que la plupart des autres sous bassins versants dont les ordres de grandeurs doivent encore être déterminés ($< 10^3$ UFC.100 mL⁻¹). Ces résultats seront poursuivis dans le cadre d'une réflexion à mener avec les modélisateurs du programme PIREN SEINE impliqués dans le programme FLASH (JM Mouchel) dans le cadre de la fin des travaux de thèse de Kenny Oberlé (octobre 2012).

IV Valorisation scientifique

Thèses de doctorat :

Barbara EVRARD (2010). La côte d'Albâtre comme terrain de jeux ? Aménagements, activités physiques et paysages vécus. Thèse de doctorat en Sciences et Techniques des Activités Physiques et Sportives, sous la co-direction de Michel BUSSI et Damien FEMENIAS, Université de Rouen, 381 p.

Emilie Laroche, 2010, « Etude de l'antibio-résistance de la population d'*Escherichia coli* isolée d'environnements aquatiques : estuaire et hydrosystèmes karstiques ». Co-direction: F. Petit, B. Pawlak Université de Rouen, 170 pp.

Mehdy Ratajczak, 2011 « Devenir des populations d'*E. coli* dans les environnements aquatiques (viabilité, cultivabilité, structure) ». Université de Rouen. Co-direction : F. Petit et T. Berthe, 120 pp.

Publications en rapport avec le programme Seine- Aval

*** * totalement ou pour *partie avec le projet FLASH**

Touron, T. Berthe, G. Gargala, M. Fournier, M. Ratajczak, P. Servais and **F. Petit**. 2007. Assessment of faecal contamination and the relationship between pathogens and faecal bacterial indicators in an estuarine environment (Seine, France). Mar. Poll. Bull. 54: 1441-1450.

Berthe T., A. Touron J. Leloup, J. Deloffre and **F. Petit**. 2008. Faecal indicator bacteria and sedimentary processes in estuarine mudflats (Seine, France). Mar Poll Bull 57: 59-67.

Ramond J-B., T. Berthe, R. Lafite, J. Deloffre, B. Ouddane and **F. Petit**. 2008. Relationship between hydrosedimentary processes and occurrence of mercury-resistant bacteria (*merA*) in estuary mudflats (Seine, France). Mar Poll Bull 56:1168-1176.

** Laroche, E., B. Pawlak, T. Berthe, D. Skurnik and **F. Petit**. 2009 Occurrence of antibiotic resistance and prevalence of class 1, 2 and 3 integrons in *Escherichia coli* isolated from a densely populated estuary (Seine, France) FEMS Microbiol. Ecol. 68: 118-130. (IF= 3,4)

Ramond, J-B., T. Berthe, R. Duran, and **F. Petit**. 2009. Comparative effect of mercury contamination and wastewater effluent inputs on Gram -negative *merA* gene abundance in mudflats of an anthropized estuary (Seine France) : a microcosm approach . Microbiol Res. 160:10-18. (IF= 2,4)

Massei N., Laignel B., Deloffre J., Mesquita J., Motelay A., Lafite R., Durand D., 2010. Long-term hydrological changes of the Seine River flow (France) and their relation to the North Atlantic Oscillation over the period 1950–2008. Int. J. Climatol Volume 30(14), 2146–2154.

* Ratajczak, M., E. Laroche, T. Berthe, O. Clermont, B. Pawlak, E. Denamur and **F. Petit**. 2010. Influence of hydrological conditions on the *Escherichia coli* population structure in the water of a creek on a rural watershed. BMC Microbiol 10: 222. (IF= 2,9)

Evrard, B., Féménias, D., & M. Bussi, 2011. « Pêche à pied en sortie d'estuaire de Seine : expositions ordinaires, déviations populaires et gestions différenciées ». In Espaces, Populations, Sociétés, n°1, pp. 137-151.

* Khaldi S, Ratajczak M, Gargala G, Fournier M, Berthe M, Favennec L, Dupont JP. 2011. Intensive exploitation enhances *Cryptosporidium* spp. oocyst transfer in a karst aquifer and leads to water supply contamination. Water Res. 45: 2906-2914. (IF 4,546)

Ramond, J.B., **Petit, F.**, Quillet, L., Ouddane, B. and Berthe, T. 2011. Evidence of methylmercury production and modification of the microbial community structure in estuarine sediments contaminated with wastewater treatment plant effluents. Mar. Poll. Bull. 62 :1073-1080. (IF= 2,3)

- ** Oberlé K., Capdeville M-J., Berthe T., Budzinski H. and F. Petit. 2012. Evidence for a complex relationship between antibiotics and antibiotic-resistant *Escherichia coli*: from Medical center patients to a receiving environment. *Env. Sci. Technol.* 46 (3) : pp. 1859 – 1868 (IF= 4,8).

Publications en préparation issues du projet FLASH

Ratajczak M., Berthe T., Clermont O., Denamur E. and Petit F. Coexistence of distinct *Escherichia coli* populations based on their survival ability in aquatic environment

Ratajczak M., Berthe T., Gourmelon M., Marti R., Topp E., Oberlé K. Clermont O., Denamur E., and F. Petit. Use of *E. coli* population structure : A/B1 phylo-groups ratio to discriminate human and bovine fecal pollution in environmental waters.

Capdeville M.J., Oberlé K., Piram A., Pardon P., Petit F. and Budzinski H. Multi-residue simultaneous analysis of 78 pharmaceutical compounds in aqueous samples: development and application.

Intra-intestinal pathogenic *Escherichia coli* strains in surface water from a river continuum in France and risk of enteric diseases F. Petit, T. Berthe B. Evrard J. Glodt, O. Clermont, E. Denamur D.Femenias

Gargala G, Ratajczak M, Petit F, Ballet JJ, Berthe T, Favennec L. Long term biomonitoring of coastal water for *Cryptosporidium*, using molluscan shellfish (*Mytilus edulis* and *Cerastoderma edule*) in the Seine river estuarine ecosystem

Roland Leclercq, Kenny Oberlé, Sébastien Galopin, Vincent Cattoir, and Fabienne Petit Changes in populations of enterococci and antibiotic resistance in effluents along a medical center-wastewater treatment plant-river continuum

Oberlé K., Leclercq R., Berthe T., Budzinski H. and Petit F. Contributions of land use to a water system along an anthropogenic gradient: Focus on fecal bacteria and antibiotics.

Communications réalisées depuis le début du projet

Communications invitées

- « Rejet d'antibiotiques dans les eaux et antibiorésistance bactérienne: Occurrence – déterminisme – risque environnemental et sanitaire ? » 25-26 mai 2009 Paris. Séminaire de travail de l'ONEMA « Résidus de médicaments dans le milieu aquatique » **F. Petit**
- « Eau et antibiotique : rôle dans l'antibiorésistance ? » 15ème Colloque sur le Contrôle Epidémiologique des Maladies Infectieuses (CEMI 15) 17 et 18 mai 2010 à l'Institut Pasteur (Paris) **F. Petit**.
- "Contamination par *Cryptosporidium* spp. des eaux souterraines de l'aquifère karstique de la craie en Haute-Normandie: influence des forçages anthropiques, conséquences sur les processus de potabilisation des eaux" «Parasites, virus et autres microbes»: Analyses et Enjeux Sanitaires dans les Eaux. Colloque organisé par l'Association Scientifique Européenne pour L'Eau et la Santé. Paris, 25-26 novembre 2010. **G. Gargala**
- "Evaluation des risques humains et environnementaux associés à la présence de *Cryptosporidium* dans l'environnement hydrique de Haute-Normandie" 2^e Congrès National de Santé et Environnement. Eau de boisson et santé : de l'acquisition des connaissances à la hiérarchisation des risques. Paris, 14 et 15 décembre 2011. **G. Gargala**
- "Difficulté de l'évaluation du risque lié à la présence de protistes parasites pathogènes de l'homme dans l'eau" Séance de l'Académie Nationale de Pharmacie, Paris, février 2012. **L. Favennec**.

Communications orales à des congrès internationaux

- Analysis of pharmaceuticals: analytical development and study of hospital sewages, wastewater treatment plants and impacted surface waters” Capdeville MJ, Oberle K, Piram P. Pardon1, **F. Petit** et H Budzinski “Water & Health. Juin 2010 .
- Laverman A., Yan C., Cazier T., Roose-Amsaleg C., Garnier J., Petit F., Berthe T. (2011). Effect of environmentally relevant vancomycin concentrations on nitrate reduction rates and denitrifying community structure in river sediments (Charmoise, France) Second International Conference on Nitrification (IcoN2) 16th European N-cycle meeting, 3-7 July 2011, Nijmegen, The Netherlands
- Occurrence and fate of antibiotics and antibiotic-resistant *Escherichia coli* and *Enterococcus* spp. along a hospital - WasteWater Treatment Plant - river continuum. Oberle K., Capdeville M.J, Berthe T., Leclercq R. Budzinski H., Petit F. Juin 2011. 4e symposium de l’Antimicrobial Resistance in Animals and the Environment (ARAE).(oral)
- Fate of antibiotic resistant *Escherichia coli* strains in environmental water. Ratajczak, M., Berthe T, Oberle K, Clermont O, Denamur E and Petit F. Juin 2011, 4e symposium de l’Antimicrobial Resistance in Animals and the Environment (ARAE).
- Effects of heavy metals on sediment microbial diversity. Kaci-Benaïcha A., Boust D., Lesueur P., Roose-Amsaleg C., Petit F., Berthe T., Vulnerability of coastal ecosystems to global change and extreme events. International Symposium. 18-21 Octobre 2011, Biarritz France.
- Lemoine, M., Deloffre, J., Lafite, R., Le Hir, P., Oberlé, K., Petit, F., 2012. Contribution of intra-estuarine tributaries to estuarine sediment budget. European Geosciences Union General Assembly, 22-27 Avril 2012, Vienne, communication orale.

Communications orales à des congrès nationaux

- Evrard B., Féménias D., Bussi M. (2009), *Environnement, santé publique et pêche à pied : jeux et enjeux inattendus d’une sociologie du sport*, Congrès de la Société de Sociologie du Sport en Langue Française, Lyon, 27, 28 et 29 mai 2009.
- Echanges sédimentaires entre un affluent et le bassin versant de la Seine. Lemoine, M., Deloffre, J., Lafite, R., Le Hir, P., Petit, F., 2011. Colloque ASF, Dijon, France.

Communications par voie d’affiche à des congrès internationaux

- Solid- phase extraction (SPE) and liquid chromatography-tandem mass spectrometry development and application for the screening of 78 pharmaceuticals in water. M.J Capdeville, A. Piram, P. Pardon, H. Budzinski and F. Petit.. congrès EMEC10 (10th. European Meeting on Environmental Chemistry) Limoges du 2 au 5 décembre 2009.
- Antibiotic use and contamination , structure and antibiotic resistance of *E. coli* population: from hospital to river. K Oberlé, M Ratajczak, T. Berthe, E. Denamur, O. Clermont, N. Massei, H. Budzinski and Petit F. International Society of Microbial Ecology ISME-13 22-27 Aout 2010 (Seattle USA).
- Influence of hydrological conditions on the *Escherichia coli* population structure in creek water on a rural watershed. M. Ratajczak, T. Berthe, O. Clermont, E. Denamur, F. Petit. International Society of Microbial Ecology ISME-13 22-27 Aout 2010 (Seattle USA).
- Influence of hydrological conditions on the *Escherichia coli* population structure in creek water on a rural watershed. M. Ratajczak, T. Berthe, O. Clermont, E. Denamur, F. Petit. 110th 23- 25 mai 2010 ASM general meeting (San Diego USA).

V Bibliographie non exhaustive

- Bendz, D., Paxéus, N., Ginn, T., et Loge, F. (2005). Occurrence and fate of pharmaceutically active compounds in the environment, a case study: Höje River in Sweden. *Journal of Hazardous Materials*, 122(3), p. 195-204.
- Bendz, D., Paxéus, N., Ginn, T., et Loge, F. (2005). Occurrence and fate of pharmaceutically active compounds in the environment, a case study: Höje River in Sweden. *Journal of Hazardous Materials*, 122(3), p. 195-204.
- Castiglioni, S., Bagnati, R., Fanelli, Roberto, Pomati, F., Calamari, Davide, et Zuccato, Ettore. (2006). Removal of pharmaceuticals in sewage treatment plants in Italy. *Environmental Science & Technology*, 40(1), p. 357-363.
- Castiglioni, S., Bagnati, R., Fanelli, Roberto, Pomati, F., Calamari, Davide, et Zuccato, Ettore. (2006). Removal of pharmaceuticals in sewage treatment plants in Italy. *Environmental Science & Technology*, 40(1), p. 357-363.
- Costanzo, S.D., Murby, J. and Bates, J. (2005) Ecosystem response to antibiotics entering the aquatic environment. *Marine Pollution Bulletin* 51(1-4), 218-223.
- Davies, J.; Spiegelman, G. B.; Yim, G. The world of subinhibitory antibiotic concentrations. *Curr. Opin. Microbiol.* 2006, 9 (5), 445–453.
- Ding, C. and J. Z. He (2010). "Effect of antibiotics in the environment on microbial populations." *Applied Microbiology And Biotechnology* 87(3): 925-941.
- Dokianakis, S.N., Kornaros, M.E. and Lyberatos, G. (2004) On the effect of pharmaceuticals on bacterial nitrite oxidation. *Water Science And Technology* 50(5), 341-346.
- Fajardo, A.; Martinez, J. L. Antibiotics as signals that trigger specific bacterial responses. *Current Opin. Microbiol.* 2008, 11 (2), 161–167.
- Fernandez, I., Mosquera-Corral, A., Campos, J.L. and Mendez, R. (2009) Operation of an Anammox SBR in the presence of two broad-spectrum antibiotics. *Process Biochemistry* 44(4), 494-498.
- Gabet-Giraud, V., Miège, C., Choubert, J. M., Ruel, S. M., et Coquery, M. (2010). Occurrence and removal of estrogens and beta blockers by various processes in wastewater treatment plants. *Science of The Total Environment*, 408(19), p. 4257-4269.
- Gabet-Giraud, V., Miège, C., Choubert, J. M., Ruel, S. M., et Coquery, M. (2010). Occurrence and removal of estrogens and beta blockers by various processes in wastewater treatment plants. *Science of The Total Environment*, 408(19), p. 4257-4269.
- Gobel, A., Mcardell, C., Joss, A., Siegrist, H, et Giger, W. (2007). Fate of sulfonamides, macrolides, and trimethoprim in different wastewater treatment technologies. *Science of The Total Environment*, 372(2-3), p. 361-371.
- Gobel, A., Mcardell, C., Joss, A., Siegrist, H, et Giger, W. (2007). Fate of sulfonamides, macrolides, and trimethoprim in different wastewater treatment technologies. *Science of The Total Environment*, 372(2-3), p. 361-371.

- Gros, M., Petrović, M., Ginebreda, A., et Barceló, Damià. (2010). Removal of pharmaceuticals during wastewater treatment and environmental risk assessment using hazard indexes. *Environment International*, 36(1), p. 15-26.
- Gros, M., Petrović, M., Ginebreda, A., et Barceló, Damià. (2010). Removal of pharmaceuticals during wastewater treatment and environmental risk assessment using hazard indexes. *Environment International*, 36(1), p. 15-26.
- Halling-Sorensen, B., et al. (1998). "Occurrence, fate and effects of pharmaceutical substances in the environment- A review." *Chemosphere* 36(2): 357-393.
- Hirsch, R., et al. (1999). "Occurrence of antibiotics in the aquatic environment." *Science Of The Total Environment* 225(1-2): 109-118.
- Hu, X., Zhou, Q., et Luo, Y. (2010). Occurrence and source analysis of typical veterinary antibiotics in manure, soil, vegetables and groundwater from organic vegetable bases, northern China. *Environmental Pollution*, 158(9), p. 2992-2998.
- Hu, X., Zhou, Q., et Luo, Y. (2010). Occurrence and source analysis of typical veterinary antibiotics in manure, soil, vegetables and groundwater from organic vegetable bases, northern China. *Environmental Pollution*, 158(9), p. 2992-2998.
- Kasprzyk Hordern, B., Dinsdale, R., et Guwy, A. (2009). The removal of pharmaceuticals, personal care products, endocrine disruptors and illicit drugs during wastewater treatment and its impact on the quality of receiving waters. *Water Research*, 43(2), p. 363-380.
- Kasprzyk Hordern, B., Dinsdale, R., et Guwy, A. (2009). The removal of pharmaceuticals, personal care products, endocrine disruptors and illicit drugs during wastewater treatment and its impact on the quality of receiving waters. *Water Research*, 43(2), p. 363-380.
- Kay, D., Fleisher, J.M., Salmon, R.L., Jones, F., Wyer, M.D., Godfree, A.F. et al. (1994) Predicting likelihood of gastroenteritis from sea bathing: results from randomised exposure. *Lancet* 344: 905-909.
- Klaver, A.L. and Matthews, R.A. (1994) Effects of oxytetracycline on nitrification in a model aquatic system. *Aquaculture* 123(3-4), 237-247.
- Kohanski, M. A.; DePristo, M. A.; Collins, J. J. Sublethal antibiotic treatment leads to multidrug resistance via radical induced mutagenesis. *Mol. Cell* 2010, 37 (3), 311–320.
- Laverman, A. M., et al. (2006). "Potential rates and pathways of microbial nitrate reduction in coastal sediments." *Fems Microbiology Ecology* 58(2): 179-192.
- Martínez-Carballo, E., González-Barreiro, C., Scharf, S., et Gans, O. (2007). Environmental monitoring study of selected veterinary antibiotics in animal manure and soils in Austria. *Environmental Pollution*, 148(2), p. 570-579.
- Martínez-Carballo, E., González-Barreiro, C., Scharf, S., et Gans, O. (2007). Environmental monitoring study of selected veterinary antibiotics in animal manure and soils in Austria. *Environmental Pollution*, 148(2), p. 570-579.
- Miège, C., Choubert, J. M., Ribeiro, L., Eusèbe, M., et Coquery, M. (2009). Fate of pharmaceuticals and personal care products in wastewater treatment plants – Conception of a database and first results. *Environmental Pollution*, 157(5), p. 1721-1726.

- Miège, C., Choubert, J. M., Ribeiro, L., Eusèbe, M., et Coquery, M. (2009). Fate of pharmaceuticals and personal care products in wastewater treatment plants – Conception of a database and first results. *Environmental Pollution*, 157(5), p. 1721-1726.
- Murray, R.E. and Knowles, R. (1999) Chloramphenicol inhibition of denitrifying enzyme activity in two agricultural soils. *Applied and Environmental Microbiology* 65(8), 3487-3492.
- Nieto, Antonio, Peschka, M., Borrull, Francesc, Pocurull, Eva, Marcé, R. M., et Knepper, T. P. (2010a). Phosphodiesterase type V inhibitors: Occurrence and fate in wastewater and sewage sludge. *Water Research*, 44(5), p. 1607-1615.
- Nieto, Antonio, Peschka, M., Borrull, Francesc, Pocurull, Eva, Marcé, R. M., et Knepper, T. P. (2010a). Phosphodiesterase type V inhibitors: Occurrence and fate in wastewater and sewage sludge. *Water Research*, 44(5), p. 1607-1615.
- Petrovic, M., et al. (2005). "Liquid chromatography-tandem mass spectrometry for the analysis of pharmaceutical residues in environmental samples: a review." *Journal of Chromatography A* 1067(1-2): 1.
- Prasse, C., Schlüsener, M. P., Schulz, R., et Ternes, T. A. (2010). Antiviral Drugs in Wastewater and Surface Waters: A New Pharmaceutical Class of Environmental Relevance? *Environmental Science & Technology*, 44(5), p. 1728-1735.
- Prasse, C., Schlüsener, M. P., Schulz, R., et Ternes, T. A. (2010). Antiviral Drugs in Wastewater and Surface Waters: A New Pharmaceutical Class of Environmental Relevance? *Environmental Science & Technology*, 44(5), p. 1728-1735.
- Tamtam, F., et al. (2008). "Occurrence and fate of antibiotics in the Seine River in various hydrological conditions." *Science of The Total Environment* 393(1): 84.
- Ternes, Thomas. (1998). Occurrence of drugs in German sewage treatment plants and rivers. *Water Research*, 32(11), p. 3245-3260.
- Ternes, Thomas. (1998). Occurrence of drugs in German sewage treatment plants and rivers. *Water Research*, 32(11), p. 3245-3260.
- Vieno, N., Tuhkanen, T., et Kronberg, L. (2007). Elimination of pharmaceuticals in sewage treatment plants in Finland. *Water Research*, 41(5), p. 1001-1012.
- Vieno, N., Tuhkanen, T., et Kronberg, L. (2007). Elimination of pharmaceuticals in sewage treatment plants in Finland. *Water Research*, 41(5), p. 1001-1012.
- Wiedenmann, A. Epidemiological Determination of Disease Risk from Bathing. Final Report (10 Feb 2004). DRAFT. Eberhard Karls Universität Tübingen.
- Woegerbauer M., Jenni B., Thalammer F., Graninger W. and Burgmann H. (2002) Natural genetic transformation of clinical isolates of *Escherichia coli* in urine and water. *Applied and Environmental Microbiology*. 68: 440-443.

VI Annexe méthodologique

Méthodologie socio économie (CARE, IDEES)

Motivation / Objectifs

La pollution de l'eau par les résidus de médicament est un phénomène récemment avéré mais qui suscite déjà des inquiétudes auprès du public. Dans l'attente de connaissances scientifiques plus précises sur les risques environnementaux et/ou sanitaires qui pourraient être liés à ce phénomène, les pouvoirs publics sont d'ores et déjà sollicités pour la mise en œuvre de mesure de précaution.

Si la palette des mesures pouvant être mises en œuvre dans ce contexte s'avère assez vaste, l'application raisonnée du principe de précaution incite, étant donné l'information scientifique disponible, à privilégier des mesures réversibles et relativement peu coûteuses. En particulier la modification des comportements de prescription et de consommation des substances pharmaceutiques, tant en médecine humaine que vétérinaire, serait de nature à réduire les rejets à la source et constitue aujourd'hui l'instrument d'action privilégié. Cependant la mise en œuvre de plans d'actions visant à atteindre ces modifications de comportements ne pourra être efficace que si elle rencontre l'adhésion des acteurs que sont les médecins et les vétérinaires mais également les éleveurs et les patients. L'étude menée par les économistes dans le cadre du projet FLASH vise à étudier la perception que les acteurs ont des risques liés à la pollution de l'eau par les résidus de médicaments, afin d'analyser comment ils peuvent adhérer à des mesures visant à modifier leurs pratiques. Plus précisément, le travail a consisté à mener une enquête auprès des médecins généralistes de la région Haute-Normandie afin de collecter des informations nous permettant d'étudier ces différentes notions.

Une enquête auprès des médecins généralistes de Haute Normandie

Le questionnaire (cf. Annexe) a été élaboré au printemps 2010 afin de répondre à ces objectifs. Une version préliminaire a été testée auprès de 6 médecins par des chercheurs de l'équipe. Les entretiens ont été enregistrés et analysés par l'équipe et des modifications ont été apportées au questionnaire de manière à ce que le questionnaire puisse être administré sans problème de compréhension par des enquêteurs vacataires.

Une première partie du questionnaire vise à identifier de manière générale les médecins et leurs pratiques. Une première série de questions porte sur des éléments factuels liés aux caractéristiques des médecins et de leur activité (âge, genre, nombre d'enfants, secteur d'exercice, type d'exercice, caractéristiques de la clientèle, etc.). Ces éléments, outre le fait qu'ils peuvent influencer la perception des risques des médecins, nous permettent de tester la représentativité de notre échantillon en les comparant aux éléments publiés par le conseil national de l'ordre des médecins dans son atlas régional de la démographie médicale. Une deuxième série de question cherche à évaluer d'une part la sensibilité personnelle du médecin interrogé vis-à-vis des problématiques environnementales (exposition par la pratique d'activités récréatives, par la consommation d'eau du robinet, perception de la qualité de l'environnement régionale) et, d'autre part, son accès à l'information spécialisée (consultation de différentes sources d'information). Enfin une dernière question vise à mieux identifier les pratiques des médecins interrogés en quantifiant leurs niveaux de prescription sur les différents types de médicaments.

La deuxième partie du questionnaire porte sur la perception des risques environnementaux et/ou sanitaires par les médecins. Une approche comparative est retenue et quatre phénomènes sont présentés aux médecins :

- La présence de polluants dans l'air (POLAIR)
- La présence de résidus de médicaments dans l'eau (MEDEAU)
- La présence de contaminants chimiques dans l'eau (CHIMEAU)
- L'utilisation des antibiotiques en médecine (ANTIBIO)

Ces phénomènes ont des caractéristiques différentes qui doivent nous permettre d'établir par la suite un lien entre les caractéristiques des risques et leur perception par les médecins. Ces phénomènes peuvent être à l'origine de risques environnementaux et/ou sanitaires. L'activité

médicale est à l'origine de certains de ces phénomènes alors que d'autres sont liés aux activités industrielles ou aux transports. Certains de ces risques ont été étudiés très largement par les scientifiques alors que pour d'autres le manque de connaissances scientifiques est encore très important. Le quatrième phénomène cité (ANTIBIO) n'est pas directement lié à un problème de qualité de l'environnement naturel, cependant il a été placé aux côtés des autres car il sera par la suite utilisé comme référence pour tenter d'établir un lien entre la perception des risques et l'acceptabilité des mesures de gestion des risques. En effet, les risques liés à une utilisation trop fréquente et à mauvais usage des antibiotiques ont fait l'objet de plusieurs campagnes d'informations au cours des dernières années ayant pour objet la modification des pratiques de prescription des médecins.

Pour ces différents phénomènes les médecins doivent indiquer, sur une échelle de 0 à 5, leur degré d'inquiétude, leur degré de connaissance de ces risques, la gravité perçue des conséquences potentielles de ces risques et leur estimation de la capacité des pouvoirs publics à maîtriser ces risques.

La troisième partie du questionnaire porte plus spécifiquement sur le risque ANTIBIO. Elle cherche à mesurer l'impact des mesures de gestion du risque sur les pratiques des médecins et à comprendre quels ont été les éléments déterminants de ces changements de pratiques.

Enfin, la dernière partie du questionnaire porte sur le phénomène MEDEAU et les risques potentiels associés. Il s'agit d'établir si les médecins considèrent que ce phénomène doit d'ores et déjà faire l'objet de mesures de précaution par les pouvoirs publics, de quelle nature doivent être ces mesures et si les médecins eux-mêmes sont prêts à s'impliquer dans la gestion de ces risques. Le questionnaire s'achève sur des questions visant à identifier les éléments informationnels dont dispose le médecin au sujet de ce phénomène, éléments susceptibles d'influencer sa perception du risque potentiel associé.

Le questionnaire a été administré entre septembre 2010 et janvier 2011 auprès de 218 médecins de la région Haute-Normandie. L'échantillon a été constitué à partir des bases de données disponibles sur le site internet du conseil de l'ordre des médecins qui recense les médecins en activité. Les médecins généralistes libéraux, salariés et hospitaliers exerçant dans la région ont été sélectionnés, soit une base d'environ 2500 médecins. La base de données a été nettoyée afin de supprimer les entrées en doublons ainsi que les entrées pour lesquelles les adresses ou les numéros de téléphone étaient incorrects. La base de données a ensuite été triée selon des critères géographiques et différents secteurs ont été attribués aux enquêteurs. Chaque enquêteur avait pour tâche de prendre un premier contact téléphonique avec les médecins et d'obtenir un rendez-vous afin d'administrer le questionnaire en face-à-face. Le médecin remplissait seul le questionnaire mais l'enquêteur était présent pour le présenter l'enquête et le guider en cas de difficulté.

Méthodologie sociologie (CETAPS)

Stratégie d'échantillonnage : les sites ateliers

- Risle-embouchure

La détermination des sites d'enquête s'est effectuée au regard des espaces effectivement investis par les pratiquants. Or, l'exploration de terrain préalable à la réalisation de l'enquête (recensement des clubs, identification des sites de pratiques, des événements) a révélé que l'embouchure n'est pas un site de pratique investi et reconnu comme un espace récréatif par les pratiquants. Dès lors nous avons concentré l'enquête sur les lieux les plus pertinents (bases de loisirs, clubs de canoë-kayak, campings, sites de pêche, etc.) afin de viser à la fois les pratiquants qui fréquentent la Risle occasionnellement et les pratiquants plus réguliers.

Collecte des données

Méthodes sociologiques mobilisées

Le programme FLASH vise à identifier l'exposition des populations humaines à un risque de contamination sanitaire (chimique et microbiologique). Le but du volet social de ce programme est double.

L'objectif premier est d'identifier les usages récréatifs de l'eau qui peuvent conduire à un risque de contamination soit par prélèvement et consommation de bivalves, soit par immersion dans un cours d'eau contaminé. Deux activités, présentant un risque élevé pour les pratiquants (la pêche à pied et le kayak) ont été étudiées dans deux espaces distincts (respectivement l'embouchure de l'estuaire de Seine et la Risle). L'enjeu est de parvenir à identifier une population, de mesurer et de qualifier une exposition. Il convient dès lors de mesurer une fréquentation et de connaître les modalités de pratique de l'activité. Qui sont les pratiquants? D'où viennent-ils? A quelle fréquence viennent-ils? Comment et dans quelle mesure s'exposent-ils à un risque de contamination?

Le deuxième objectif est de qualifier des perceptions du milieu pour comprendre l'espace des représentations dans lesquelles s'inscrivent ces activités, et, pour la pêche à pied, expliquer les représentations des risques des pratiquants et les éventuelles résistances aux interdictions. Comment perçoivent-ils leur espace de pratique ? Quel regard portent-ils sur le milieu ? Se sentent-ils exposés à un danger ? Si oui, lequel ? Ont-ils connaissance des réglementations et / ou interdictions qui régissent leur site de pratique ?

Deux enquêtes ont été menées en plusieurs temps:

- Identification des sites de pratique dans des territoires reconnus contaminés par les microbiologistes.

- Observation des usages

- Estimation des fréquentations lors des grandes marées pour la pêche à pied et en période estivale pour l'activité kayak.

- Administration de deux enquêtes par questionnaire auprès des populations exposées.

Les activités étudiées possèdent leur logique propre et une forme d'exposition différente au risque. Elles ont donc nécessité un traitement distinct.

Déroulement de l'enquête pêche à pied à l'embouchure de l'estuaire de Seine

Pour qualifier l'exposition on a cherché à noter la fréquentation, à identifier une population et à connaître les modes de pêches ainsi que la représentation des risques des pêcheurs.

Au-delà d'une possible exposition à un risque sanitaire, la présence des pêcheurs sur des sites où l'activité est normalement interdite soulève d'autres questions auxquelles nous avons tenté de répondre. Comment est mise en œuvre la sécurité sanitaire sur ces sites? Quels sont les processus sociaux à l'œuvre? Qui interdit l'activité? Dans quelle mesure l'activité est-elle contrôlée? Comment la pêche à pied apparaît-elle progressivement comme une déviance? Cette étude propose de dépasser la simple mesure de l'exposition des pêcheurs à un risque sanitaire en s'attachant à identifier également les logiques d'actions des différents acteurs impliqués dans la définition de la sécurité sanitaire. L'objectif est de montrer comment, en sortie d'estuaire de Seine, le ramassage des moules est identifié et "équipé" comme un risque "collectif" (Gilbert, 2002) par les pouvoirs publics, et comment ce risque est ignoré ou disqualifié par les pêcheurs.

En identifiant, d'une part, le travail des autorités sanitaires qui construisent la pêche à pied comme une activité à risque et en analysant, d'autre part, les risques des pêcheurs, on voit comment deux représentations de la réalité s'opposent. Les recherches sur les risques sanitaires tendent à se concentrer sur les facteurs individuels (Gilbert, 2005). Ici, le non-respect des interdictions ne peut être compris isolément du contexte socio-culturel dans lequel se déroule l'activité.

Il paraît pertinent d'analyser également l'action des autorités de contrôle dont la gestion hétérogène de l'activité pêche à pied produit des espaces de déviances différenciés. L'analyse des modes de contrôle réalisés lors d'alertes sanitaires montre que, sur ce littoral, on ne négocie pas partout de la même façon. Dans la mesure où les enjeux symboliques ne sont pas les mêmes, l'occupation de l'espace et les pratiques de pêche sont différemment tolérées.

Une enquête par questionnaires a été réalisée sur les trois sites en sortie d'estuaire de Seine sur lesquels la pêche à pied est interdite à l'année mais sur lesquels on constate néanmoins une présence régulière de pêcheurs [Le Havre (La Hève), Octeville-sur-Mer (site de l'ancienne base militaire de l'OTAN), Saint-Jouin-Bruneval (site d'Antifer)].

La période de passation correspond aux marées d'équinoxes d'août et septembre 2008. Douze journées d'enquête (neuf en semaine et trois en week-end) ont permis de couvrir vingt marées (du matin et du soir). Le questionnaire passé est construit autour de huit thématiques:

- La pratique (type(s) de pêche(s) pratiquée(s); produits prélevés; modalités de prélèvement)
- Fréquentation des sites (période; saisonnalité; fréquence; durée)
- Formes de sociabilité développée dans la pratique
- Consommation des produits (mode de consommation; mode de préparation)
- Les risques de l'activité (risques identifiés spontanément par les pêcheurs; perception des risques sanitaires; antécédents de contamination)
- La réglementation (connaissance de la réglementation; support de connaissance; réaction face aux interdictions; motifs de fréquentation face aux interdictions)
- Variables sociologiques classiques d'identification des interrogés (sexe; âge; PCS; niveau d'étude; lieu de résidence)
- Carte géographique d'identification des autres sites de pêche fréquentés

Une équipe de six enquêteurs (dont 5 vacataires) a été mobilisée pour administrer des questionnaires anonymes auprès des pêcheurs considérés « exposés ». Au cours de cette enquête, nous n'avons pas procédé par échantillonnage mais nous avons cherché, au contraire, à interroger l'ensemble des présents.

En parallèle de cette enquête par questionnaire, une observation systématique des sites, des pratiques et des conditions d'enquête avec prise de note sur les conditions météorologiques et le nombre de pêcheurs présents était effectuée.

Analyses microbiologiques (M2C, U 722, EA 2128)

Collecte des données de consommation d'antibiotiques

Le programme FLASH nécessitait une coopération entre scientifiques et les acteurs locaux afin de déterminer le choix des sites et l'accès aux données d'utilisation des antibiotiques sur les différents continums.

Le site hospitalier (150 lits de maison de retraite et 87 lits d'hôpital) a été retenu car il était possible d'accéder au plan du réseau des eaux usées, aux données de consommation des antibiotiques par service, et d'effectuer nos prélèvements. Les rejets hospitaliers rejoignent comme dans le premier continuum la station d'épuration de la commune de Pont-Audemer (9500 habitants). La ville de Pont-Audemer nous a donné l'accès à sa station d'épuration et a facilité le contact avec toutes les 6 pharmacies de la zone concernée, afin d'accéder aux quantités en antibiotiques vendues sur cette zone pendant la période du projet.

Le site agricole situé dans le bassin versant d'un petit affluent de la Risle a été choisi en fonction des caractéristiques des sols et de l'occupation du bassin versant par des exploitations agricoles (élevages bovins), avec l'aide du groupement sanitaire de l'Eure. Un exploitant agricole met à notre disposition son registre d'élevage où sont annotées les prescriptions en antibiotiques à usage vétérinaire. Ainsi, pour la zone géographique dont les eaux usées sont traitées par la STEP de Pont-Audemer, nous disposons des données sur la consommation en antibiotiques en médecine hospitalière (direction de l'Hôpital), médecine de ville et vétérinaire (registre d'élevage).

Les acteurs locaux ont été associés au projet tout au long de son déroulement à travers les réunions. Ces réunions ont été l'occasion de communiquer l'information scientifique issue du programme de recherche et de répondre aux questions que peuvent se poser les acteurs quant aux risques. Une réunion de restitution de l'ensemble des résultats du projet FLASH, élargie à d'autres partenaires institutionnels, est envisagée courant 2012.

Analyses microbiologiques et biologie moléculaire

Dénombrements des *Escherichia coli* et *Enterococcus cultivables*

Les populations d'*E. coli* cultivables ont été dénombrées selon la norme préconisée par l'ISO AFNOR, ISO 9308-1. Après filtration des volumes et des dilutions appropriés sur une membrane de 0,45 µm HA047 (Millipore, France), *E. coli* a été dénombrée sur le milieu Rapid'E. coli (Biorad, USA) additionné du supplément eau REC2 (Biorad, USA), après 24 h d'incubation à

44°C. Une méthode analogue a été développée pour les entérocoques mais en utilisant le milieu RapidEnterococcus (Biorad).

Détermination de la résistance aux antibiotiques des souches isolées

La résistance des souches d'*Escherichia coli* a été déterminée par la méthode de diffusion sur gélose, selon les recommandations du comité de l'antibiogramme de la Société Française de Microbiologie (SFM). Dix-sept antibiotiques (Biomérieux, France) appartenant à différentes familles utilisées dans le traitement médical humain et animal ont été testés : amoxicilline (charge du disque : 25 µg) ; amoxicilline + acide clavulanique (20+10 µg) ; ticarcilline (75 µg) ; ticarcilline + acide clavulanique (75+10 µg) ; imipénème (10 µg) ; céfalotine (30 µg), ceftazidime (30 µg) ; céfotaxime (30 µg) ; gentamicine (10 µg) ; amikacine (30 µg) ; kanamycine (30 µg) ; streptomycine (10 µg) ; chloramphénicol (30 µg) ; tétracycline (30 µg) ; sulfaméthoxazole+triméthoprime (1,25+23,75 µg) ; acide nalidixique (30 µg) et ciprofloxacine (5 µg). La méthode de diffusion sur gélose consiste à inonder uniformément la surface d'une gélose Mueller-Hinton (AES laboratoire, France) avec une suspension bactérienne de la souche à tester. Afin d'éviter l'apparition de mutants spontanés, la densité de cette suspension est normalisée à environ 10^6 bactéries.mL⁻¹. Des disques de papier imprégnés d'une concentration connue d'antibiotique (Biomérieux, France) sont ensuite déposés à la surface de la gélose ensemencée et les boîtes sont incubées 18-24h à 37°C. Le diamètre de la zone d'inhibition est mesuré et comparé à des tableaux références qui déterminent le phénotype de la bactérie testée, sur la base de valeurs critiques délimitant les catégories cliniques. Les souches sont alors classées comme sensible (S), intermédiaires (I) ou résistantes (R) pour chaque antibiotique, en accord avec le guide du comité de l'antibiogramme de la SFM. Les données d'antibio-résistances ont été transformées en un code binaire : résistante (1) et non résistantes (0) ; ces dernières regroupant les souches sensibles et intermédiaires. Dans ces travaux, la souche CIP 7624 a été utilisée comme contrôle. Les résistances des souches d'*Enterococcus* ont été réalisées par l'équipe de R. Leclercq (EA 2128) en utilisant une démarche analogue.

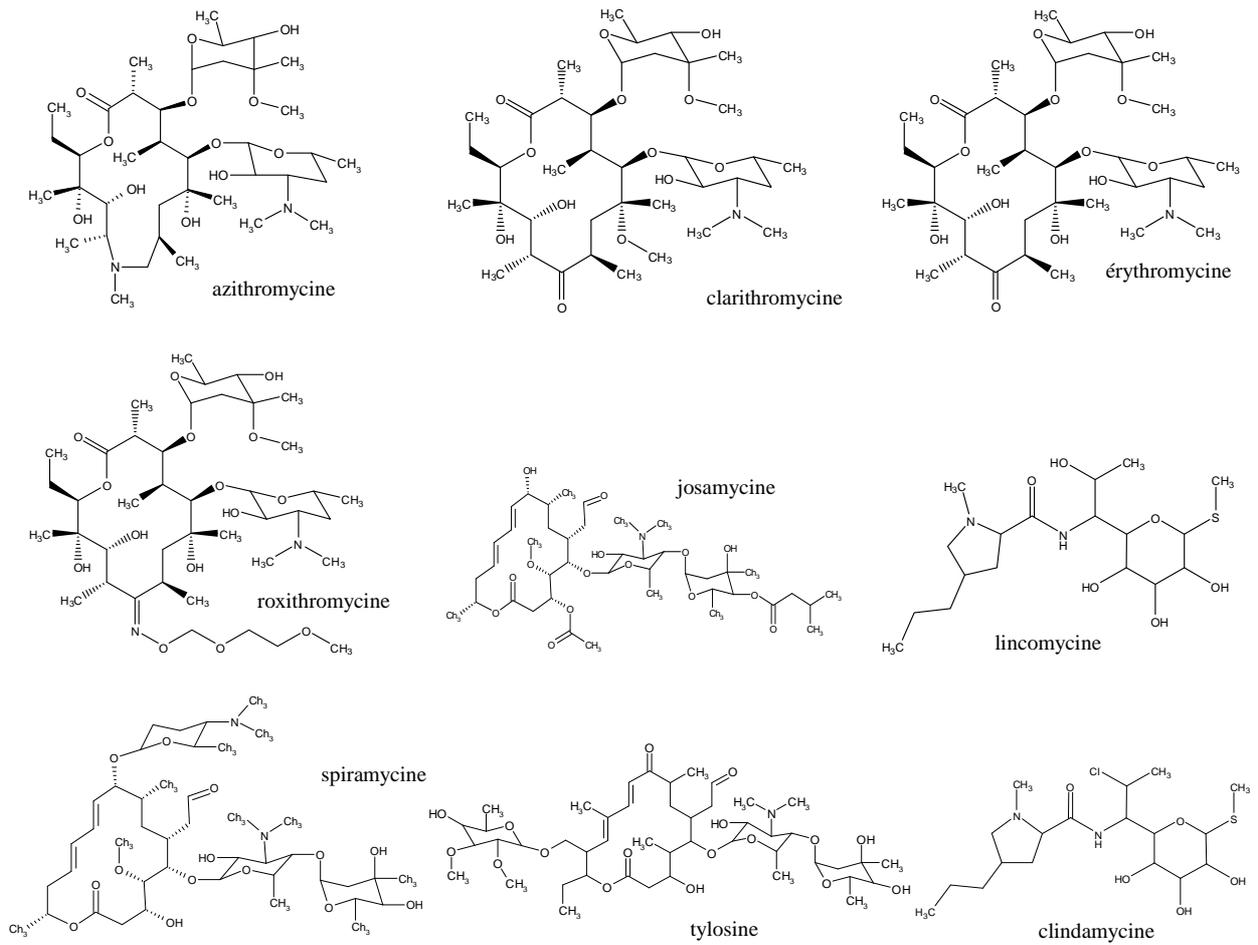
Approches moléculaires

La PCR en temps réel a été utilisée pour la détection et la quantification des marqueurs Bacteroidales, avec la collaboration de Mme M. Gourmelon du laboratoire de Microbiologie de l'IFREMER de Brest. La recherche de gènes de virulence et de résistance aux antibiotiques par PCR chez les souches d'*E. coli* et *Enterococcus* a été respectivement réalisée par les équipes de E. Denamur (INSERM U722) et R Leclercq (EA 2128). Les intégrons de classe II, II et III ont été recherchés comme indiqué dans Laroche et al (2009).

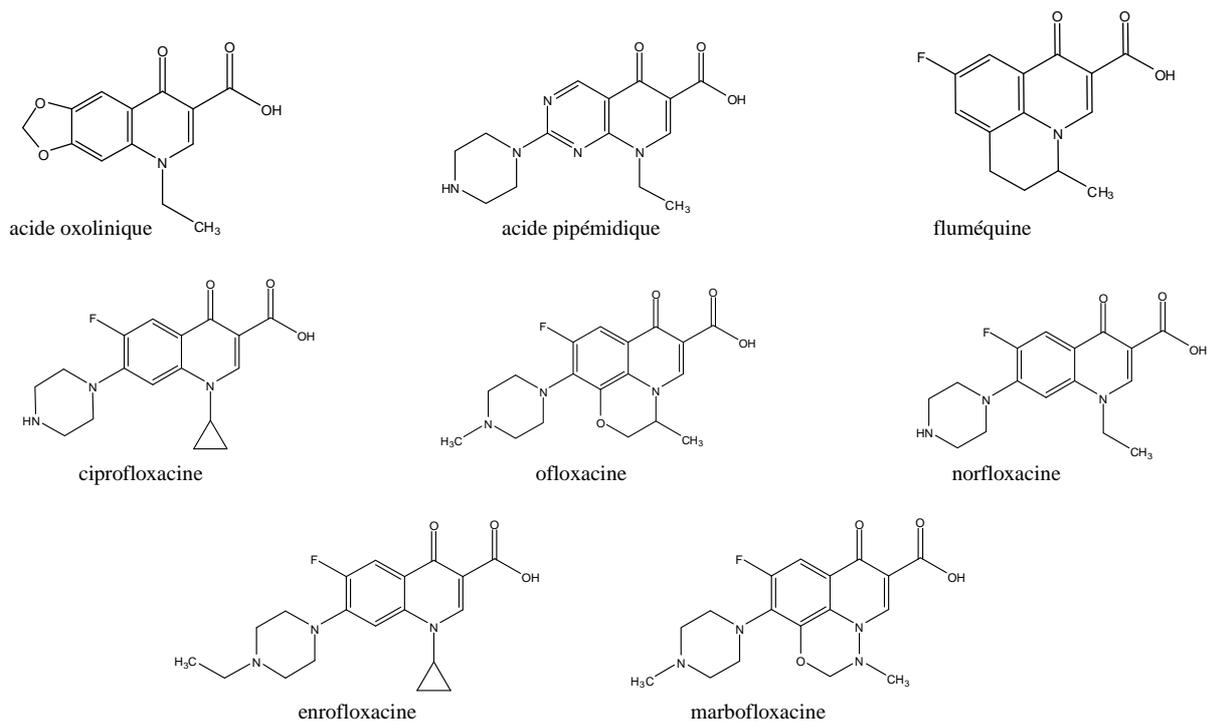
Analyses chimiques (UMR 5255 LPTC)

Des préleveurs automatiques ont été posés sur chacun des sites de prélèvement de façon à obtenir des échantillons moyens sur 24 heures. En juin 2010, 300 ml ont été prélevés par heure et les échantillons moyens ont été constitués en mélangeant 210 ml de chaque prélèvement (5 litres moyennés). Les échantillons de la campagne estivale ont été prélevés le 8 juin. Les dénombrements microbiologiques ont été effectués immédiatement et les analyses chimiques le 11 juin et sont arrivées au laboratoire le 11 juin. Ils ont été filtrés immédiatement. Les phases dissoutes, comme les phases particulaires, ont ensuite été conservées au congélateur à -20°C. Dans les deux cas, les phases dissoutes ont été extraites et analysées dans le mois suivant.

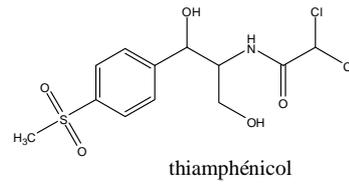
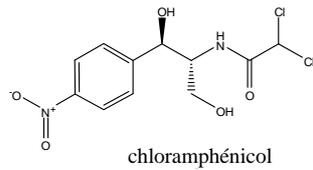
Les macrolides et lincosamides



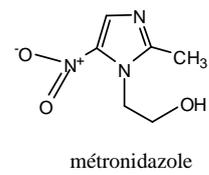
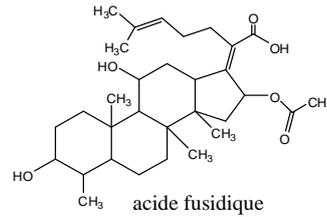
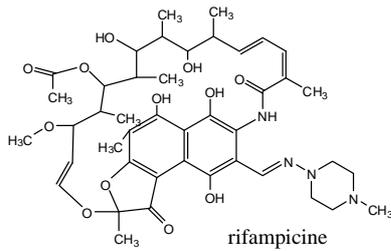
Les quinolones et fluoroquinolones



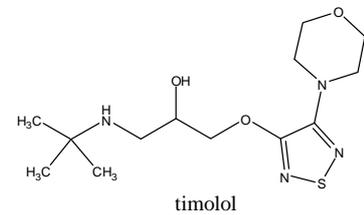
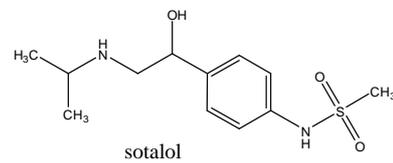
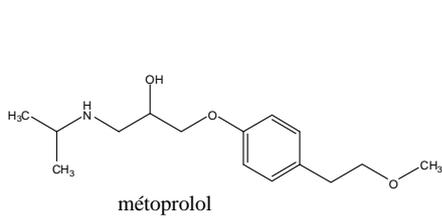
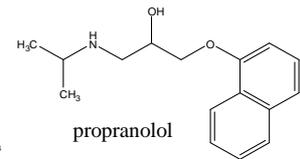
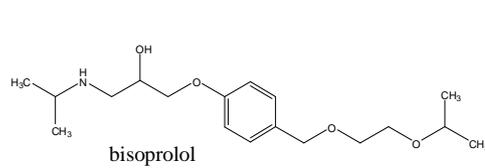
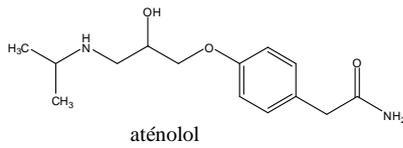
Les phénicolés



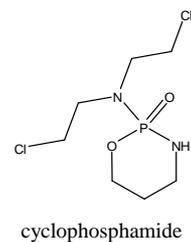
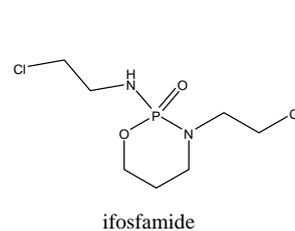
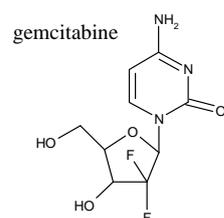
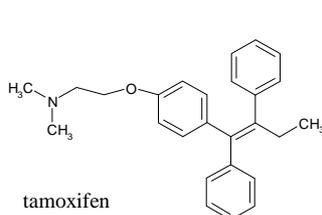
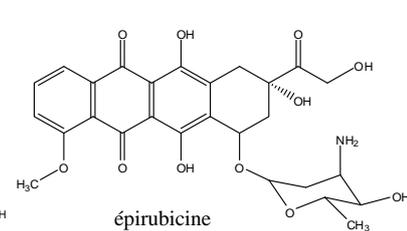
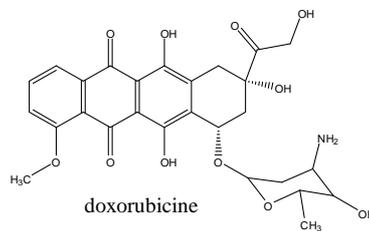
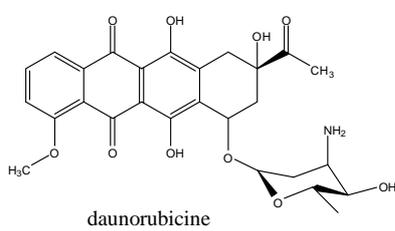
Les autres antibiotiques



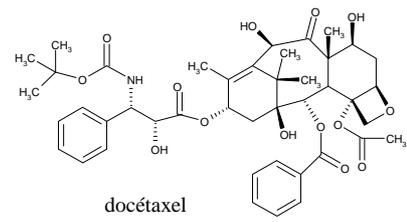
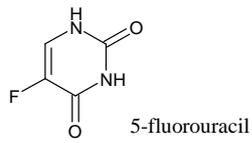
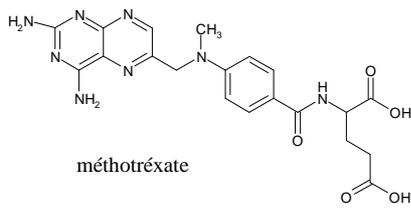
Les β -bloquants



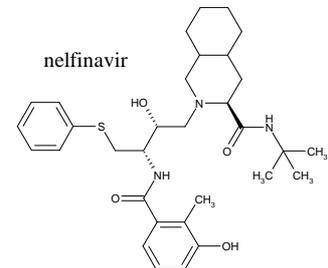
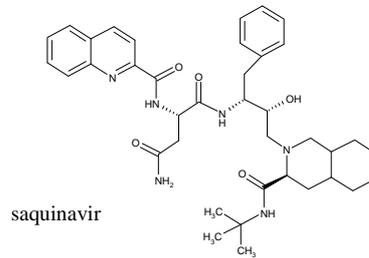
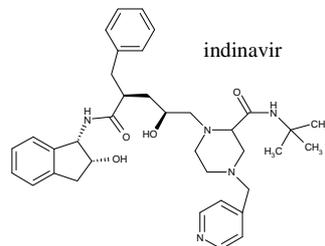
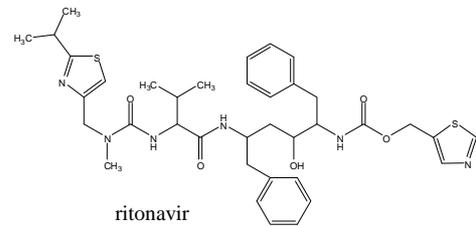
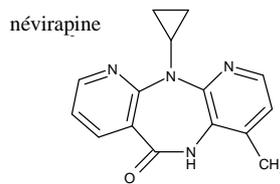
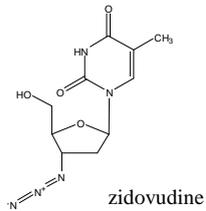
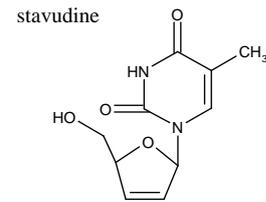
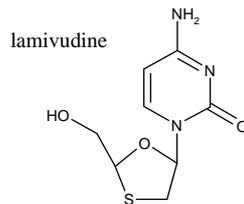
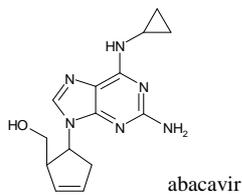
Les anticancéreux



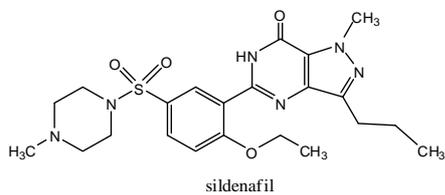
Les anticancéreux (suite)



Les anti-VIH



L'inhibiteur de PDE 5



Annexe 2 : Prescriptions en antibiotiques à l'hôpital, la maison de retraite et par la médecine de ville lors de deux périodes

Antibiotiques	Avril 2009 – Sept. 2009 (g)			Oct. 2009 – Mars 2010 (g)		
	Hôpital	Maison Retraite	Médecine de ville*	Hôpital	Maison Retraite	Médecine de ville*
Pénicillines						
Amoxicilline	7866	473	178334	7371	544	258430
Pénicilline V	0	0	0	24	0	0
Cloxacilline	84	32	506	88	16	736
Oxacilline	36	0	449	32	0	650
Pénicilline G	6	0	0	0	0	0
Piperacilline	44	0	0	164	0	0
Ticarcelline	16	0	0	0	0	0
Céphalosporines						
Céfaclor	0	0	220	0	0	398
Céfamandole	41	0	0	40	0	0
Céfazoline	240	0	0	239	0	0
Céfotaxime	685	4	0	836	0	0
Céfoxitine	125	0	0	97	0	0
Céfpodoxime	23	0	1390	12	5	2505
Céftazidime	0	0	0	6	0	0
Céftriaxome	563	110	0	686	224	0
Céfixime	181	10	299	183	62	541
Carbapénème						
Imipénème	25	0	0	24	0	0
Quinolones & fluoroquinolones						
Ciprofloxacine	155	17	633	115	0	980
Norfloxacine	187	40	425	124	100	656
Ofloxacine	219	6	57	168	14	88
Acide pipémédique	12	0	36	16	0	56
Levofloxacine	318	0	126	424	0	195
Moxifloxacine	0	0	164	0	0	254
Pefloxacine	0	0	1	0	0	2
Lomefloxacine	0	0	15	0	0	24
Sulfamides						
Sulfaméthoxazole	27	0	504	9	0	902
Tétracyclines						
Doxycycline	0	0	684	4	0	1562
Aminosides						
Amikacine	49	0	-	46	0	-
Gentamicine	33	0	-	47	0	-
Macrolides						
Azithromycine	5	0	-	8	0	-
Clindamycine	31	0	-	43	0	-
Erythromycine	39	0	-	55	20	-
Telithromycine	20	0	-	21	0	-
Pristinamycine	855	100	-	44	0	-
Roxithromycine	134	0	-	103	34	-

Annexe 3 : Concentrations en antibiotiques le long du continuum hospitalier en période estivale.

Molécules	limité de détection (µg.L ⁻¹)	limite de quantification (µg.L ⁻¹)	Effluent hospitalier (µg.L ⁻¹)	Effluent maison retraite (µg.L ⁻¹)	Effluent brut STEP (µg.L ⁻¹)	Effluent traité STEP (µg.L ⁻¹)	Rivière (µg.L ⁻¹)
Pénicillines							
Amoxicilline	1x10 ⁻¹	3x10 ⁻¹	-	-	-	-	-
Ampicilline	4x10 ⁻²	1x10 ⁻¹	-	-	-	-	-
Pénicilline G	4x10 ⁻²	2x10 ⁻²	-	-	-	-	-
Pénicilline V	7x10 ⁻²	2x10 ⁻²	-	-	-	-	-
Oxacilline	5x10 ⁻²	2x10 ⁻²	-	-	-	-	-
Cloxacilline	5x10 ⁻²	2x10 ⁻²	-	-	-	-	-
Dicloxacilline	2x10 ⁻²	5x10 ⁻²	-	-	-	-	-
Céphalosporines							
Céfalexine	6x10 ⁻²	2x10 ⁻²	-	-	-	-	-
Céfotaxime	2x10 ⁻²	7x10 ⁻²	-	-	-	-	-
Céfepodoxime	1x10 ⁻¹	3x10 ⁻¹	-	-	-	-	-
Céftriaxone	2x10 ⁻²	6x10 ⁻²	-	-	-	-	-
Céfuroxime	3x10 ⁻²	8x10 ⁻²	-	-	-	-	-
Quinolones & fluoroquinolones							
Ciprofloxacine	5x10 ⁻²	2x10 ⁻²	0.05	-	-	0.03	-
Enrofloxacin	2x10 ⁻²	5x10 ⁻²	-	-	-	-	-
Marbofloxacine	1x10 ⁻²	3x10 ⁻²	-	-	-	-	-
Norfloxacine	4x10 ⁻²	2x10 ⁻²	-	0.5	0.08	0.06	0.01
Ofloxacine	1x10 ⁻²	3x10 ⁻²	0.8	0.6	0.23	0.2	0.01
Acide pipémidique	4x10 ⁻²	2x10 ⁻²	-	0.04	0.04	0.03	-
Acide oxolinique	1x10 ⁻²	1x10 ⁻²	-	-	-	-	-
Fluméquine	1x10 ⁻²	2x10 ⁻²	-	-	-	0.002	0.002
Tétracyclines							
Tétracycline	3x10 ⁻²	1x10 ⁻²	-	-	0.1	0.01	-
Oxytétracycline	4x10 ⁻²	2x10 ⁻²	-	-	-	-	-
Chlortétracycline	6x10 ⁻²	2x10 ⁻²	-	-	-	-	-
Doxycycline	4x10 ⁻²	2x10 ⁻²	-	-	-	-	-
Sulfamides							
Sulfadiazine	1x10 ⁻²	3x10 ⁻²	0.07	0.1	0.009	0.02	0.01
Sulfadiméthoxine	1x10 ⁻²	1x10 ⁻²	-	-	-	-	-
Sulfaméthazine	1x10 ⁻²	4x10 ⁻²	-	-	-	-	-
Sulfaméthazole	1x10 ⁻²	2x10 ⁻²	-	-	-	-	-
Sulfaméthizole	1x10 ⁻²	4x10 ⁻²	-	-	-	-	-
Sulfaméthoxazole	3x10 ⁻²	1x10 ⁻²	-	-	0.35	0.16	0.02
Sulfanilamide	2x10 ⁻²	7x10 ⁻²	-	-	-	-	-
Sulfapyridine	1x10 ⁻²	3x10 ⁻²	-	-	-	0.009	0.001
Sulfathiazole	2x10 ⁻²	5x10 ⁻²	-	-	-	-	-
Other							
Triméthoprim	1x10 ⁻²	3x10 ⁻²	-	-	0.1	0.03	0.002

d: Molécule d'antibiotique détecté mais inférieur à la limite de quantification; -: Molécule d'antibiotique non détectée

Annexe 4: Concentration en antibiotiques retrouvées dans les eaux le long du continuum agricole pour les deux périodes échantillonnées

Molécules	Limite de détection (ng.L ⁻¹)	Limite de quantification (ng.L ⁻¹)	Sébec (ng.L ⁻¹)		Selles (ng.L ⁻¹)		Tourville river (ng.L ⁻¹)		Risle (ng.L ⁻¹)	
			1	2	1	2	1	2	1	2
Quinolones & Fluoroquinolones										
Ciprofloxacine	5x10 ⁻¹	2	-	-	-	-	-	-	-	-
Enrofloxacin	2x10 ⁻¹	5x10 ⁻¹	-	2,9	-	3,2	-	-	-	-
Marbofloxacine	1x10 ⁻¹	3x10 ⁻¹	-	-	-	-	-	-	-	-
Norfloxacine	4x10 ⁻¹	2	-	-	-	-	-	-	-	-
Ofloxacin	1x10 ⁻¹	3x10 ⁻¹	-	4,7	-	3,3	1,0	2,5	2,0	0,8
Acide pipémédique	4x10 ⁻¹	2x10 ⁻¹	-	-	-	-	-	-	-	-
Acide oxilinique	1x10 ⁻¹	1x10 ⁻¹	-	-	-	-	-	-	-	-
Fluméquine	1x10 ⁻¹	2x10 ⁻¹	-	-	-	-	d	0,1	d	0,3
β-lactamines										
Amoxicilline	100	300	-	-	-	-	-	-	-	-
Ampicilline	40	100	-	-	-	-	-	-	-	-
Pénicilline G	4x10 ⁻¹	2x10 ⁻¹	-	-	-	-	-	-	-	-
Pénicilline V	7x10 ⁻¹	2x10 ⁻¹	-	-	-	-	-	-	-	-
Oxacilline	5x10 ⁻¹	2x10 ⁻¹	-	-	-	-	-	-	-	-
Cloxacilline	5x10 ⁻¹	2x10 ⁻¹	-	-	-	-	-	-	-	-
Dicloxacilline	2	5x10 ⁻¹	-	-	-	-	-	-	-	-
Cefalexine	6x10 ⁻¹	20	-	-	-	-	-	-	-	-
Cefotaxime	2x10 ⁻¹	7x10 ⁻³	-	-	-	-	-	-	-	-
Cefpodoxime	100	300	-	-	-	-	-	-	-	-
Ceftiofur	2x10 ⁻¹	6x10 ⁻¹	-	-	-	-	-	-	-	-
Cefuroxime	3x10 ⁻¹	8x10 ⁻¹	-	-	-	-	-	-	-	-
Sulfamides										
Sulfadiazine	1x10 ⁻¹	3x10 ⁻¹	-	0,5	-	-	-	0,3	-	0,9
Sulfadiméthozine	1x10 ⁻¹	1x10 ⁻¹	-	-	-	-	-	-	0,1	-
Sulfamérazine	1x10 ⁻¹	4x10 ⁻¹	-	-	-	-	-	-	-	-
Sulfaméthazine	1x10 ⁻¹	2x10 ⁻¹	-	-	-	-	-	-	-	-
Sulfaméthizole	1x10 ⁻¹	4x10 ⁻¹	-	-	-	-	-	-	-	-
Sulfaméthoxazole	3x10 ⁻¹	1	-	-	-	-	9,0	-	3,0	3,2
Sulfanilamide	20	70	-	-	-	-	-	-	-	-
Sulfapyridine	1x10 ⁻¹	3x10 ⁻¹	-	-	-	-	1,0	1,2	1,0	0,5
Sulfathiazole	2x10 ⁻¹	5x10 ⁻¹	-	-	-	-	-	-	-	-
Tetracyclines										
Tétracycline	3x10 ⁻¹	1	-	-	-	-	-	-	1,0	-
Oxytétracycline	4x10 ⁻¹	2	-	-	-	-	-	19,6	-	16,5
Chlortétracycline	6	2	-	-	-	-	-	-	12,0	-
Doxycycline	4x10 ⁻¹	2	-	-	-	-	-	-	-	-
Macrolides										
Azithromycine	nd	nd	-	-	-	-	-	4,3	-	-
Clarithromycine	nd	nd	0,1	0,6	0,2	0,4	0,4	2,8	4	1,8
Erythromycine	nd	nd	3,0	0,8	1,0	0,9	1,0	1,5	2,0	1,2
Josamycine	nd	nd	0,3	-	0,2	-	1,0	-	0,5	-
Roxithromycine	nd	nd	7,0	-	0,1	-	0,4	-	4,0	0,7
Spiramycine	nd	nd	-	-	-	-	-	-	4,0	22,8
Tylosine	nd	nd	0,3	-	-	-	-	-	-	-
Triméthoprim	1x10 ⁻¹	3x10 ⁻¹	-	-	-	-	3,0	1,5	0,3	3,9

¹ Période de stabulation des bovins (Novembre 2009)

² Période de pâturage des bovins (Juin 2010)

-: Molécules d'antibiotique non détectées; d: Molécule d'antibiotique détectée mais valeur inférieure à la limite de quantification

Annexe 5 : Diversité et occurrence des profils de résistance pour les souches d'*E. coli* isolées le long du continuum agricole pour les deux périodes

Patterns	Sebec	Selles	Tourville	Risle (N=93)
	(N=99)	(N=102)	(N=96)	
C	1	1	4	8
CF	0	0	0	1
CIP	1	0	0	0
TET	6	2	0	3
STR	2	0	0	0
C-TE	4	0	1	0
C-STR	1	0	0	1
C-CIP	1	0	0	0
CIP-STR	1	0	0	0
AMX-TET	0	1	0	0
AMX-AMC	0	1	0	1
STR-SXT	0	0	1	0
TET-STR	0	0	0	1
C-TET-STR	1	0	0	0
AMX-C-TET	1	0	0	0
TET-SXT-STR	0	0	1	0
AMX-TIC-STR	0	0	0	1
AMX-TIC-TIM	0	0	0	1
TIM-C-CIP	0	0	0	1
AMX-AMC-CF	0	0	0	1
AMX-TIC-TET-SXT	1	0	0	0
AMX-TIC-STR-SXT	0	0	0	1
AMX-TIC-TIM-STR	1	0	0	0
AMX-TIC-C-STR	0	0	1	0
AMX-TIC-TET-STR	0	0	0	2
G-K-C-SXT-STR	0	1	0	0
AMX-TIC-TIM-C-TET	0	0	0	1
AMX-TIC-STR-TET-SXT	0	0	0	1
AMX-AMC-CF-C-SXT	0	0	0	1

N: Total number of *E. coli* strains isolated during wet and dry after a rainfall event periods

AMX: Amoxicilline; **AMC**: Amoxicilline + acide clavulanique; **TIC**: Ticarcilline; **TIM**: Ticarcilline + ac. clavulanique; **CF**: Céfalotine; **G**: Gentamycine; **K**: Kanamycine; **STR**: Streptomycine; **C**: Chloramphénicol; **TET**: Tétracycline; **SXT**: Sulfaméthoxazole + triméthoprime; **NAL**: Acide nalidixique; **CIP**: Ciprofloxacine

Annexe 6: Profils phénotypiques de résistances aux antibiotiques chez les isolats d'*E. coli* de l'effluent de la maison de retraite pour la période de décembre 2009.

Nombre d'isolats	<i>Int I</i>	Nombre de résistances	Profils phénotypiques
1	-	1	TET
2	1	1	TET
13	-	1	NAL
1	-	2	GEN, TET
1	1	2	AMX, NAL
1	1	2	CF, TET
1	-	2	C, NAL
1	-	2	AMX, TIC
1	1	2	AMX, NAL
1	-	3	C, TET, NAL
1	1	3	CF, TET, SXT
1	1	3	GEN, STR, TET
1	-	3	AMX, TIC, TIM
3	-	4	AMX, TIC, NAL, CIP
1	1	5	AMX, TIC, TIM, SXT, NAL
4	1	5	AMX, TIC, STR, TET, SXT
2	1	5	AMX, TIC, TIM, TET, SXT
5	1	6	AMX, TIC, TIM, STR, TET, SXT
1	-	6	AMX, TIC, TIM, STR, GEN, KAN
1	-	6	AMX, TIC, CF, STR, GEN, KAN
1	1	8	AMX, TIC, TIM, STR, C, TET, SXT, NAL

Annexe 7 : Données sur les prescriptions en antibiotiques en médecine humaine et animale

Tableaux issues du rapport « 10 ans d'évolution des consommations d'antibiotiques en France (AFSSAPS, Juin 2011)

Tableau n°11 - Part des différentes classes d'antibiotiques dans la consommation de ville et Comparaisons 1999-2009

Classe ATC	Part dans la consommation 1999	Part dans la consommation 2009
J01A - Tétracyclines	9,0%	11,4%
J01C - Bêta-lactamines, Pénicillines	51,1%	54,3%
dont J01CA - Pénicillines à large spectre	36,5%	30,4%
dont J01CR - Association de pénicillines	12,6%	21,9%
J01D - Autres bêtalactamines	14,0%	10,0%
dont J01DB - Céphalosporines de 1ère génération	5,3%	0,3%
dont J01DC - Céphalosporines de 2ème génération	5,3%	3,2%
dont J01DD - Céphalosporines de 3ème génération	3,8%	6,5%
J01E - Sulfamides et triméthoprime	1,5%	1,4%
J01F - Macrolides	16,5%	14,0%
J01G - Aminosides	0,2%	0,2%
J01M - Quinolones	5,5%	6,8%
J01R+J01X - Associations et autres antibactériens	2,0%	1,9%
Total	100,0%	100,0%

Source : Ossap

Tableau n°12 - Part des différentes classes d'antibiotiques dans la consommation à l'hôpital et Comparaisons 1999-2009

Classe ATC	Part dans la consommation 1999	Part dans la consommation 2009
J01C - Bêta-lactamines, Pénicillines	55,5%	55,7%
dont J01CA - Pénicillines à large spectre	25,2%	18,8%
dont J01CR - Association de pénicillines	26,0%	33,6%
dont J01CR04 - Amoxicilline et inhibiteur d'enzyme	24,0%	32,3%
dont J01CR05 - Pipéracilline et inhibiteur d'enzyme	0,5%	1,2%
J01D - Autres bêtalactamines	12,4%	12,1%
dont J01DB - Céphalosporines de 1ère génération	8,6%	2,4%
dont J01DC - Céphalosporines de 2ème génération	1,2%	1,1%
dont J01DD - Céphalosporines de 3ème génération	2,5%	7,2%
dont J01DH - Carbapenems	0,5%	1,2%
J01E - Sulfamides et triméthoprime	2,4%	2,1%
J01F - Macrolides	7,0%	5,7%
J01G - Aminosides	3,5%	2,7%
J01M - Quinolones	11,5%	14,3%
J01R+J01X - Associations et autres antibactériens	6,2%	6,0%
Autres classes	1,5%	1,3%
Total	100%	100%

Source : Ossap

Dénomination (ATC, ATC/INN)	Classe ATC	2014 (en %)	
		Commercialisé	Commercialisé/total
Quinupristine/dalfopristine	Streptogramines (synergistines)	2000	
Lévofloxacine	Fluoroquinolones	2000	
Linézolide	Autres antibactériens	2001	
Méropénem	Carbapénems	2002	
Télithromycine	Macrolides	2002	
Moxifloxacine	Fluoroquinolones	2002	
Ertapénem	Carbapénems	2004	
Tigécycline	Tétracycline	2006	
Daptomycine	Autres antibactériens	2007	
Doripénem	Carbapénems	2008	
Oxolinique acide	Autres quinolones		1999
Amphotéricine B/Tétracycline	Tétracycline		2000
Oxytétracycline en association	Tétracycline		2000
Sulfadiazine et triméthoprime	Associations de sulfamides et de triméthoprime		2000
Xibomol	Autres antibactériens		2000
Tétracycline	Tétracycline		2001
Sulbactam	Inhibiteurs de bêta-lactamases		2001
Céfopérazone	Céphalosporine		2001
Dibécacine	Autres aminosides		2001
Sparfloxacine	Fluoroquinolones		2001
Rosoxacine	Autres quinolones		2001
Oxytétracycline	Tétracycline		2002
Ceftizoxime	Céphalosporine		2002
Céfotélan	Céphalosporine		2004
Triméthoprime	Triméthoprime et dérivés		2004
Clofoctol	Autres antibactériens		2004
Isépamicine	Autres aminosides		2005
Nalidixique acide	Autres quinolones		2005
Bacampicilline	Penicillines à large spectre		2006
Nitroxoline	Autres antibactériens		2006
Pivampicilline	Penicillines à large spectre		2007
Céfaprine	Céphalosporine		2007
Céfotine	Céphalosporine		2008
Céfsulodine	Céphalosporine		2008
Spactinomycine	Autres antibactériens		2008

Données et tableaux issus du rapport de l'ANSES d'octobre 2011 : « Suivi des ventes de médicaments vétérinaires contenant des antibiotiques en France en 2010 : volume et estimation de la consommation des antibiotiques chez les animaux.

Tableau 4. Ventes d'antibiotiques pour les principales espèces en mg/kg et en indicateur de l'exposition

	Bovins	Chats-Chiens	Chevaux	Poissons	Lapins	Ovins-Caprins	Porcs	Volailles	Autres	Toutes espèces
Wacti/Wap mg/kg	19,11	110,86	51,47	57,34	799,35	104,50	147,37	107,53	0,90	63,92
ALEA	0,316	0,609	0,472	0,221	3,736	0,492	1,130	1,307	0,003	0,620

Tableau 8. Evolution des ventes par famille d'antibiotiques de 1999 à 2010 (Wacti en tonnes)

	1999	2000	2001	2002	2003	2004	2005	2006	2007	2008	2009	2010
Aminoglycosides	98,71	88,44	91,15	88,82	80,94	78,04	75,91	76,94	74,25	72,94	61,15	62,49
Céphalosporines 1&2G	5,25	5,30	5,24	6,19	6,84	6,71	7,13	6,41	7,16	7,20	7,01	5,94
Céphalosporines 3&4G	0,92	1,05	1,02	1,17	1,27	1,37	1,60	1,87	2,00	2,12	1,82	2,28
Divers	5,08	5,24	5,12	4,02	2,50	2,18	2,54	2,75	2,78	2,78	2,58	2,52
Fluoroquinolones	3,30	3,69	4,06	4,18	4,43	4,28	4,36	4,81	4,68	4,89	4,89	5,19
Lincosamides	5,87	8,01	9,28	10,87	10,21	9,50	10,06	8,98	9,07	7,79	7,11	6,72
Macrolides	79,82	88,64	102,29	108,39	101,98	96,53	99,78	102,69	97,60	94,89	83,39	81,37
Pénicillines	91,08	97,19	94,91	98,15	92,77	84,80	89,43	93,38	93,64	85,04	83,69	90,63
Phénicolés	4,31	4,65	4,44	5,61	4,30	4,90	4,69	6,08	5,88	5,01	4,79	5,12
Pleuromutilines	31,14	32,96	25,80	25,26	21,94	16,55	10,04	12,31	10,32	7,90	8,19	7,62
Polypeptides	63,04	66,06	67,63	64,68	65,65	61,72	64,81	65,40	72,44	64,44	65,26	64,05
Quinolones	18,77	15,61	14,34	15,59	13,99	12,50	13,29	13,44	10,91	7,93	7,48	8,03
Sulfamides	259,69	271,40	246,02	229,02	209,45	210,18	215,31	211,41	224,59	194,91	181,21	174,00
Tétracyclines	625,14	656,25	667,09	630,66	645,99	637,00	658,61	594,42	677,79	584,57	504,97	471,98
Triméthoprime	37,48	38,64	36,23	33,91	32,53	33,80	35,55	33,15	33,84	29,57	28,19	26,29
Total en tonnes	1 329,58	1 383,14	1 374,62	1 326,54	1 294,81	1 260,07	1 293,11	1 234,04	1 326,95	1 171,97	1 051,73	1 014,24

Figure 2a. Evolution du tonnage de poids vif traité de bovins selon la voie d'administration

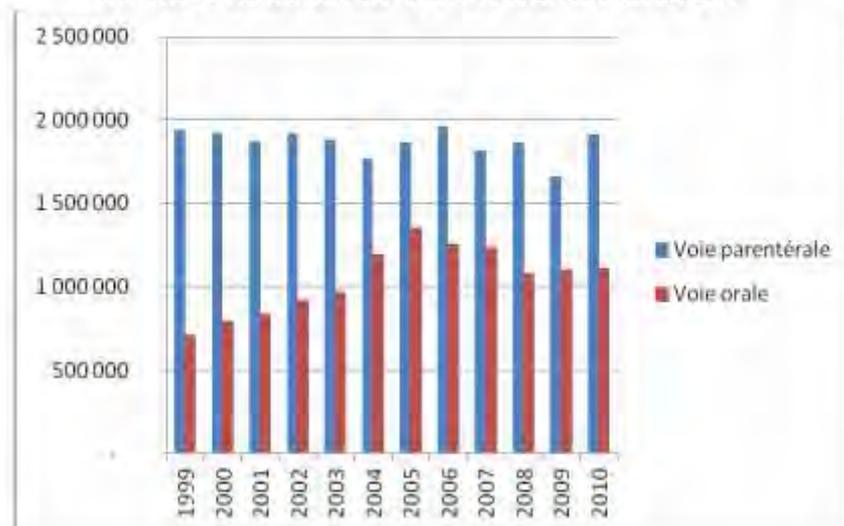


Figure 2b*. Bovins : Tonnage de poids vif traité par famille pour la voie parentérale

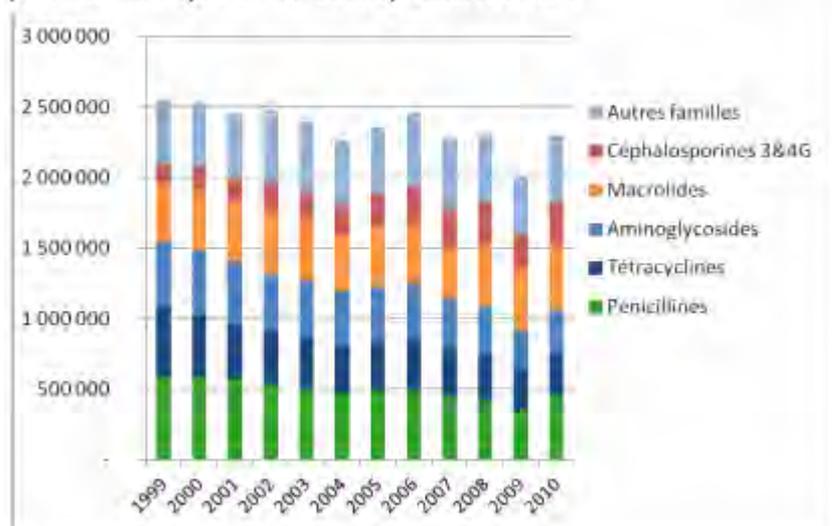
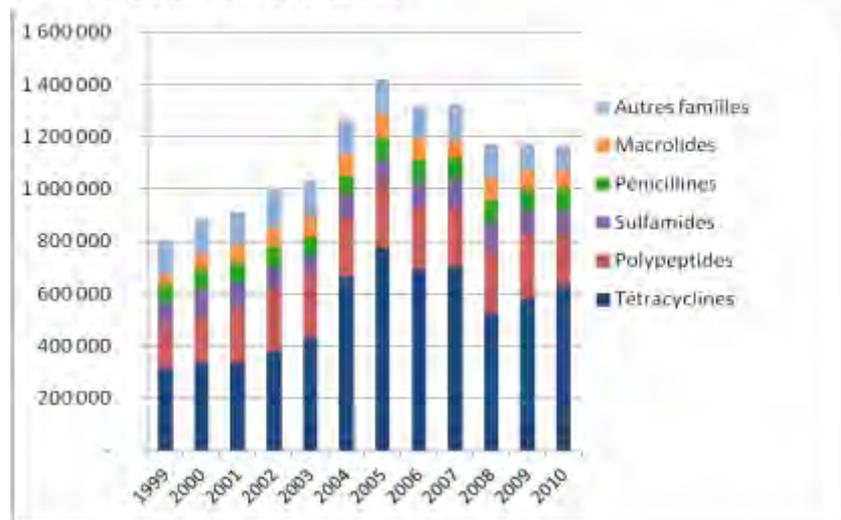


Figure 2c*. Bovins : Tonnage de poids vif traité par famille pour la voie orale



Annexe 8 : Questionnaires utilisés lors des enquêtes sociologiques

Code intervieweur	<input type="text"/>	<input type="text"/>	NE PAS REMPLIR SVP			
Code questionnaire	<input type="text"/>	<input type="text"/>	Date de l'interview	<input type="text"/> / <input type="text"/> / <input type="text"/>	Lieu d'interview	<input type="text"/>
Activités physiques, sportives et de loisirs de la côte d'Albâtre						
<p><i>Dans le cadre de la thèse intitulée "Les activités sportives et de loisirs de la côte d'Albâtre" réalisée à l'université de Rouen, en collaboration avec le Groupement d'Intérêt Public "Seine-Aval", nous nous intéressons aux usages du littoral Haut-Normand. En répondant spontanément à ce questionnaire, vous nous apporterez des informations précieuses. Veuillez répondre dans l'ordre des questions et dans les cadres prévus à cet effet. Nous vous remercions.</i></p>						
LE QUESTIONNAIRE EST STRICTEMENT ANONYME						
5. Durant ces 12 derniers mois, quels types de pêche avez-vous pratiqués sur ce littoral? (plusieurs réponses possibles)						
<input type="radio"/> pêche à pied <input type="radio"/> pêche en mer <input type="radio"/> pêche à la ligne <input type="radio"/> pose de casier <input type="radio"/> Autre						
6. Si 'Autre', précisez : <input type="text"/>						
7. Qu'avez-vous pêché durant ces 12 derniers mois? (plusieurs réponses possibles)						
<input type="radio"/> coquillages <input type="radio"/> crustacés <input type="radio"/> poissons						
8. Si vous pêchez à pied, quels types de coquillage ramassez-vous? <input type="text"/>						
9. Vous pêchez le plus souvent: (par ordre d'importance)						
<input type="radio"/> coquillages <input type="radio"/> poissons <input type="radio"/> crustacés						
10. Pêchez-vous:						
<input type="radio"/> Tout ce qui vient <input type="radio"/> une seule sorte de coquillage à la fois <input type="radio"/> une seule sorte et je sélectionne les coquillages						
11. A quelle période pêchez vous des Coquillages ?						
<input type="radio"/> Toute l'année <input type="radio"/> uniquement lors des grandes marées de septembre <input type="radio"/> lors des grands coefficient de marée (>95) <input type="radio"/> dès que possible						
12. Vous réalisez cette activité majoritairement:						
<input type="radio"/> En semaine <input type="radio"/> Le week-end <input type="radio"/> Pendant les vacances <input type="radio"/> je m'adapte aux marées						
13. Vous pratiquez cette activité sur cette côte:						
<input type="radio"/> Jamais <input type="radio"/> Quelques fois dans l'année <input type="radio"/> Une fois par mois <input type="radio"/> Une fois par semaine <input type="radio"/> Plusieurs fois par semaine						
14. Lors de chaque sortie, vous pêchez en moyenne						
<input type="radio"/> moins d'une heure <input type="radio"/> entre 1 et 2 heures <input type="radio"/> toute la durée de la marée						
15. Avec qui allez-vous à la pêche?						
<input type="radio"/> seul <input type="radio"/> en famille <input type="radio"/> entre amis <input type="radio"/> avec des professionnels de la pêche <input type="radio"/> avec des inconnus						
16. Comment avez-vous connu cette zone de pêche? (Plusieurs réponses possibles)						
<input type="radio"/> par brochure <input type="radio"/> par hasard <input type="radio"/> par transmission familiale <input type="radio"/> par le bouche à oreille <input type="radio"/> par des amis/ des connaissances <input type="radio"/> autre						
17. Autre, précisez: <input type="text"/>						
18. Pêchez-vous: (plusieurs réponses possibles)						
<input type="radio"/> pour le loisir <input type="radio"/> pour passer un moment entre amis/ en famille <input type="radio"/> pour manger des produits frais <input type="radio"/> pour faire des économies <input type="radio"/> pour la balade au contact du milieu marin <input type="radio"/> pour revendre les produits de votre pêche <input type="radio"/> autre						
19. Autre, précisez: <input type="text"/>						
20. Lors de chaque sortie, vous ramassez en moyenne:						
<input type="radio"/> moins d'un kilo de coquillages <input type="radio"/> entre 1 et 2 kilos <input type="radio"/> plus de 2 kilos						

Annexe 8 : Questionnaires utilisés lors des enquêtes sociologiques

21. Consommez-vous les produits de votre pêche? <input type="radio"/> oui <input type="radio"/> non	22. Mangez-vous ces coquillages: <input type="radio"/> cru <input type="radio"/> cuit
23. Si vous les mangez cuit, utilisez-vous de l'eau de mer pour faire cuire vos coquillages? <input type="radio"/> Jamais <input type="radio"/> Rarement <input type="radio"/> Occasionnellement <input type="radio"/> Assez souvent <input type="radio"/> Très souvent <input type="radio"/> Toujours	
24. Quels sont les risques principaux de l'activité pêche à pied? <input type="text"/>	
25. Selon vous, y'a-t-il des risques concernant votre santé à consommer les produits de votre pêche? <input type="radio"/> Oui <input type="radio"/> Non	
26. Si oui, quels sont ces risques sanitaires?	<input type="text"/>
27. Suite à la consommation des produits de votre pêche, avez-vous déjà eu les problèmes de santé suivants? <input type="radio"/> Réactions allergiques (rougeurs, boutons, plaques...) <input type="radio"/> diarrhées <input type="radio"/> vomissements <input type="radio"/> autre	
28. Autre, précisez	<input type="text"/>
29. Connaissez-vous la réglementation liée à la pratique de la pêche à pied sur la côte? <input type="radio"/> oui <input type="radio"/> non	
30. Si oui, comment avez-vous eu connaissance de ce règlement? <input type="radio"/> par affichage à l'entrée de la plage <input type="radio"/> par affichage à la mairie <input type="radio"/> par la presse <input type="radio"/> par le bouche à oreille <input type="radio"/> autre	
31. Autre, précisez	<input type="text"/>
32. Selon vous, la pêche à pied est-elle autorisée sur cette plage? <input type="radio"/> oui <input type="radio"/> non	
33. Si c'était interdit et que vous le sachiez, continueriez-vous à venir pêcher ici? <input type="radio"/> oui <input type="radio"/> non	
34. Pour quels motifs continuerez-vous de venir pêcher ici? <input type="text"/>	
35. Pensez-vous que cette zone est moins polluée qu'ailleurs? <input type="radio"/> oui <input type="radio"/> non	
36. En quoi reconnaît-on qu'une zone est polluée? <input type="text"/>	
37. Quel est votre sexe ? <input type="radio"/> Masculin <input type="radio"/> Féminin	38. Quel est votre âge ? <input type="text"/>
39. Quelle est votre profession? <input type="radio"/> Agriculteur <input type="radio"/> Commerçant, artisan, chef Entreprise <input type="radio"/> Cadre.Prof.Intellectuelle.Sup. <input type="radio"/> Profession intermédiaire <input type="radio"/> Employé <input type="radio"/> Ouvrier <input type="radio"/> Chomeur <input type="radio"/> Elève, Etudiant <input type="radio"/> Inactif <input type="radio"/> Autre	
40. Si 'Autre', précisez :	<input type="text"/>
41. Quel est votre niveau d'études ? <input type="radio"/> Sans diplôme ou CEP <input type="radio"/> BEPC seul <input type="radio"/> CAP, BEP ou équivalent <input type="radio"/> Baccalauréat ou brevet professionnel <input type="radio"/> Bac +2 <input type="radio"/> Diplôme supérieur à Bac +2	
42. Dans quelle ville résidez-vous la majorité de l'année?	<input type="text"/>
43. Code postal	<input type="text"/>
44. En vous reportant sur la carte en page 3, indiquez votre (vos) zone(s) de pêche.	

Annexe 8 : Questionnaires utilisés lors des enquêtes sociologiques

<h3 style="margin: 0;">Usages récréatifs de la Risle</h3> <p style="font-size: small; margin: 0;">Dans le cadre du projet de recherche "Seine-Aval", une étude sur les usages des espaces récréatifs de la Risle est réalisée. En répondant spontanément à ce questionnaire, vous nous apporterez des informations précieuses. Veuillez répondre dans l'ordre des questions et dans les cadres prévus à cet effet avec un stylo bille ou un feutre fin. Nous vous remercions.</p>	
-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	-------------------------------------------------------------------------------------

Ce questionnaire est strictement anonyme

Partie réservée à l'administration ne pas remplir S.V.P.

Code quest. Date / / L.P.

5. Sexe <input type="checkbox"/> homme <input type="checkbox"/> femme	6. Âge <input type="checkbox"/> moins de 15 <input type="checkbox"/> 15-17 <input type="checkbox"/> 18-24 <input type="checkbox"/> 25-34 <input type="checkbox"/> 35-49 <input type="checkbox"/> 50-64 <input type="checkbox"/> 65 et plus
---------------------------------------------------------------------------------	---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------

7. Quelle est votre profession (ou celle du chef de famille si vous êtes scolarisé(e))?

<input type="checkbox"/> Agriculteur	<input type="checkbox"/> Commerçant, artisan, chef Entreprise
<input type="checkbox"/> Cadre.Prof.Intellectuelle.Sup. (cadre d'entreprise ou de la fonction publique, ingénieur, médecin...)	<input type="checkbox"/> Profession intermédiaire (enseignant, infirmière, technicien, agent de maîtrise...)
<input type="checkbox"/> Employé	<input type="checkbox"/> Ouvrier
<input type="checkbox"/> retraité	<input type="checkbox"/> Chômeur ou inactif
<input type="checkbox"/> Etudiant	<input type="checkbox"/> Autre

8. Si "autre" précisez:

9. Quel est votre niveau d'étude ?

<input type="checkbox"/> Sans diplôme ou CEP	<input type="checkbox"/> BEPC seul	<input type="checkbox"/> CAP, BEP ou équivalent	<input type="checkbox"/> Baccalauréat ou brevet professionnel
<input type="checkbox"/> Bac+2	<input type="checkbox"/> supérieur à Bac +2		

10. Dans quelle ville résidez-vous la majorité de l'année ? **11. Code postal**

12. Quel est votre type de résidence principale

<input type="checkbox"/> appartement	<input type="checkbox"/> appartement avec jardin ou terrasse	<input type="checkbox"/> maison individuelle sans jardin	<input type="checkbox"/> maison individuelle avec jardin
--------------------------------------	--------------------------------------------------------------	----------------------------------------------------------	----------------------------------------------------------

13. Quelle(s) activité(s) pratiquez-vous dans la vallée de la Risle (plusieurs choix possibles) ?

<input type="checkbox"/> baignade	<input type="checkbox"/> pédalo	<input type="checkbox"/> planche à voile	<input type="checkbox"/> voile
<input type="checkbox"/> ski-nautique-wake-board	<input type="checkbox"/> cerf-volant	<input type="checkbox"/> randonnée pédestre	<input type="checkbox"/> vélo-VTT
<input type="checkbox"/> jogging	<input type="checkbox"/> tennis ou sports de raquette	<input type="checkbox"/> jeux de ballon	<input type="checkbox"/> escalade
<input type="checkbox"/> tir à l'arc	<input type="checkbox"/> golf-mini golf	<input type="checkbox"/> pétanque	<input type="checkbox"/> pique-nique
<input type="checkbox"/> pêche à la ligne	<input type="checkbox"/> sieste	<input type="checkbox"/> lecture	<input type="checkbox"/> bronzage
<input type="checkbox"/> canoë-kayak	<input type="checkbox"/> autre		

14. Si "autre", précisez:

15. Quelle est votre activité dominante ?

16. Vous pratiquez cette activité en vallée de Risle : (en nbre de fois/an, 1 choix)

<input type="checkbox"/> 1	<input type="checkbox"/> 2-6	<input type="checkbox"/> 7-12	<input type="checkbox"/> 13-24	<input type="checkbox"/> + de 24/an
----------------------------	------------------------------	-------------------------------	--------------------------------	-------------------------------------

17. En moyenne, combien de temps consacrez-vous à la pratique à chaque sortie en vallée de Risle ? (1 choix)

<input type="checkbox"/> 1h ou moins	<input type="checkbox"/> 2-3 h	<input type="checkbox"/> 1/2 journée	<input type="checkbox"/> la journée	<input type="checkbox"/> plusieurs jours (stages)
--------------------------------------	--------------------------------	--------------------------------------	-------------------------------------	---------------------------------------------------

18. Dans quel cadre pratiquez-vous cette activité dans la vallée de la Risle ? (1 choix)

<input type="checkbox"/> clubs/associations	<input type="checkbox"/> amis/famille	<input type="checkbox"/> structure marchande	<input type="checkbox"/> seul
---------------------------------------------	---------------------------------------	----------------------------------------------	-------------------------------

19. Quelles sont vos motivations pour venir dans la vallée de la Risle ?



Annexe 8 : Questionnaires utilisés lors des enquêtes sociologiques

20. Si vous-êtes en vacances, quel est votre mode d'hébergement ? (1 choix)

- camping
 gîte
 hôtel
 famille / amis

21. Quelle est la durée de votre séjour en vallée de la Risle ?

22. Combien de fois par an venez-vous sur ce site ?

23. Vous venez préférentiellement : (1 choix)

- en semaine
 le mercredi
 le week-end
 pendant les vacances

24. A quelle(s) période(s) de l'année fréquentez-vous la vallée de la Risle (plusieurs choix possibles) ?

- printemps
 été
 automne
 hiver
 toute l'année

25. Pour vous la vallée de la Risle est : (plusieurs choix)

- intégrée à l'espace urbain
 industrielle
 un paysage rural
 un espace naturel à proximité de la ville
 naturelle
 reconvertie en espace naturel
 artificielle

26. Pour mes loisirs et mes vacances, je préfère : (1 choix)

- mer/plage
 rivière/campagne
 ville
 montagne

Représentations du "milieu": Êtes-vous d'accord avec les propositions suivantes :

	Pas du tout d'accord	Plutôt pas d'accord	Plutôt d'accord	Tout à fait d'accord	Sans opinion
28. La Risle est paisible, reposante	<input type="checkbox"/>				
29. La Risle est facile d'accès	<input type="checkbox"/>				
30. La Risle est bien aménagée	<input type="checkbox"/>				
31. L'eau de la Risle est propre	<input type="checkbox"/>				
32. J'aime la Risle et sa vallée	<input type="checkbox"/>				
33. Les berges de la Risle sont bien entretenues et nettoyées	<input type="checkbox"/>				
34. La Risle est un espace naturel protégé	<input type="checkbox"/>				
35. La pratique du canoë-kayak détériore ou abîme la rivière	<input type="checkbox"/>				
36. La baignade et la pratique d'activités nautiques en Risle présentent un risque pour ma santé	<input type="checkbox"/>				

36. Citez les éléments naturels qui, pour vous, caractérisent le mieux la vallée de la Risle (3 réponses max.):

37. Quelles sont les odeurs de la Risle ?

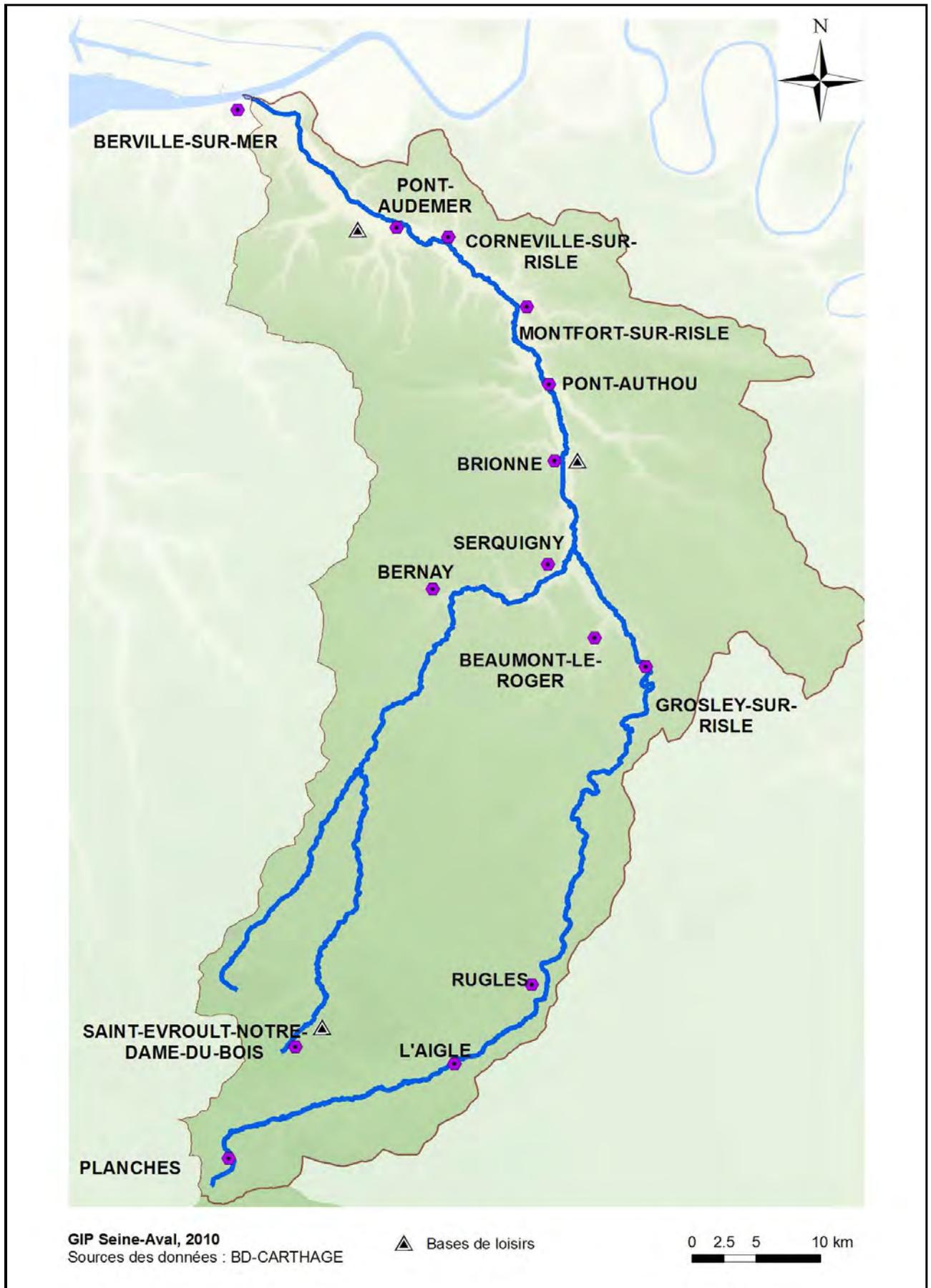
38. Citez les loisirs qui, pour vous, caractérisent le mieux cette vallée (3 réponses max.):

39. Fréquentez-vous les lieux suivants (plusieurs réponses possibles):

- Abbaye du Bec Hellouin
 réserve naturelle de l'estuaire
 Parc naturel régional des Boucles de la Seine Normande
 littoral
 musées et lieux culturels

40. Entourez à la fois les zones de rivières, les bases de loisirs et les villes fréquentées. Merci de noter tout élément manquant

Annexe 8 : Questionnaires utilisés lors des enquêtes sociologiques



Crédit photo couverture : GIP Seine-Aval, C. Lévêque
Pour tout renseignement, veuillez contacter la coordination scientifique : cdegremont@seine-aval.fr

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.

Le GIP Seine-Aval est financé par :

