



# Traçage de l'origine fécale humaine ou animale de la contamination microbienne des eaux d'un bassin versant et du littoral méditerranéen : Aide à la gestion de la contamination

Mylène Toubiana

**HydroSciences Montpellier (HSM) :**

Estelle Jumas-Bilak , Patrick Monfort, Patricia Licznar-Fajardo,  
Marie-George Tournoud, Christian Salles

**Stagiaires :** Emilie Nifaut (M1 IMHE Montpellier, 2018)

Arnaud Senegas (M1 IMHE Montpellier, 2019)



# Contexte

- ▶ Contamination microbienne fécale dans les milieux aquatiques (bassins versants, littoral):
  - ▶ Fond permanent de pollution
  - ▶ Pics lors de pluies intenses (lessivage des sols, by-pass STEP, ...) et lors de défaillance des réseaux d'assainissement (fuites des réseaux, pannes de pompes de relevage, ...)

# Contexte

- ▶ Contamination microbienne fécale dans les milieux aquatiques (bassins versants, littoral):
  - ▶ Fond permanent de pollution
  - ▶ Pics lors de pluies intenses (lessivage des sols, by-pass STEP, ...) et lors de défaillance des réseaux d'assainissement (fuites des réseaux, pannes de pompes de relevage, ...)
- ▶ Mise en évidence lors de précédents projets OHM :
  - ▶ Bassin versant du Lez (Acti-Lez 2015, Quali-Lez 2017)
  - ▶ Eaux de baignade et sable du littoral du Golfe d'Aigues Mortes et de la ville de Marseille (QHyT-Med 2016, Quali-plages 2017)



Photo : Christian Salles, HSM Montpellier

Crue du Verdanson, Montpellier  
Octobre 2017



Photo : Christian Salles, HSM Montpellier

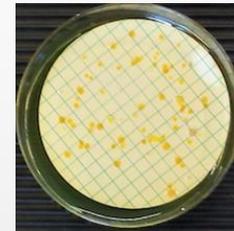


Photo : Marie-Laure Apers-Trémélo, ESPACE, Aix-en-Provence

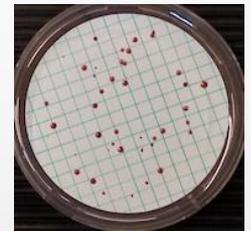
Plage du Prophète, Marseille  
Juillet 2017

# Contexte

- Evaluation de la qualité par mesure de deux témoins de contamination fécale (directive européenne 2006/7/CE-02/2006) :
  - les Coliformes ThermoTolérants (CTT)
  - les Entérocoques Intestinaux (EI)



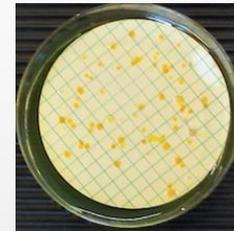
Coliformes thermo-tolérants  
dont *Escherichia coli*



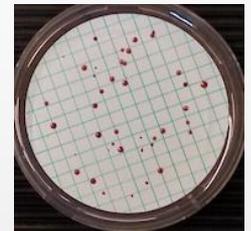
Entérocoques intestinaux

# Contexte

- ▶ Evaluation de la qualité par mesure de deux témoins de contamination fécale (directive européenne 2006/7/CE-02/2006) :
  - les Coliformes ThermoTolérants (CTT)
  - les Entérocoques Intestinaux (EI)



Coliformes thermo-tolérants  
dont *Escherichia coli*



Entérocoques intestinaux

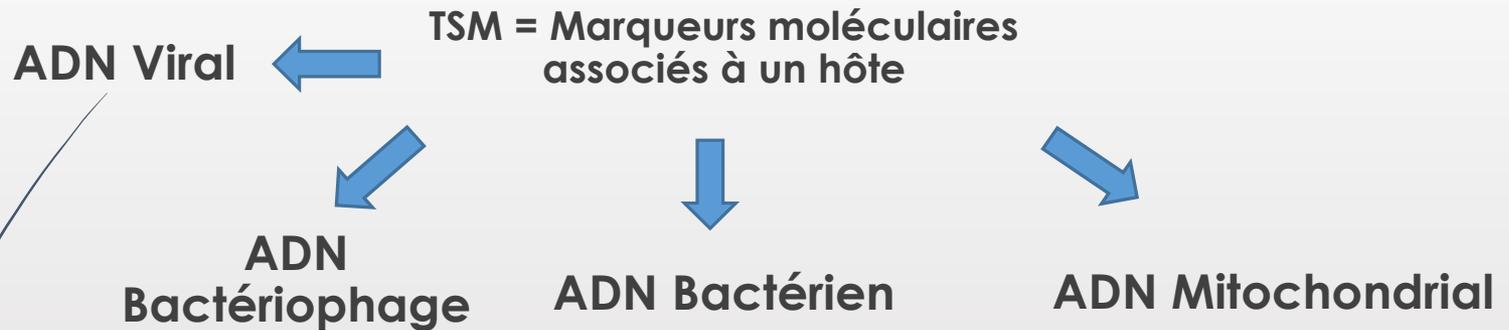
- ▶ Ne permettent pas d'identifier l'origine humaine ou animale (domestiques, élevages, sauvages) de la contamination
- ▶ Origine ?



Nécessité de mise en place  
de nouveaux outils :  
les Traceurs de Sources  
Microbiennes (TSM)

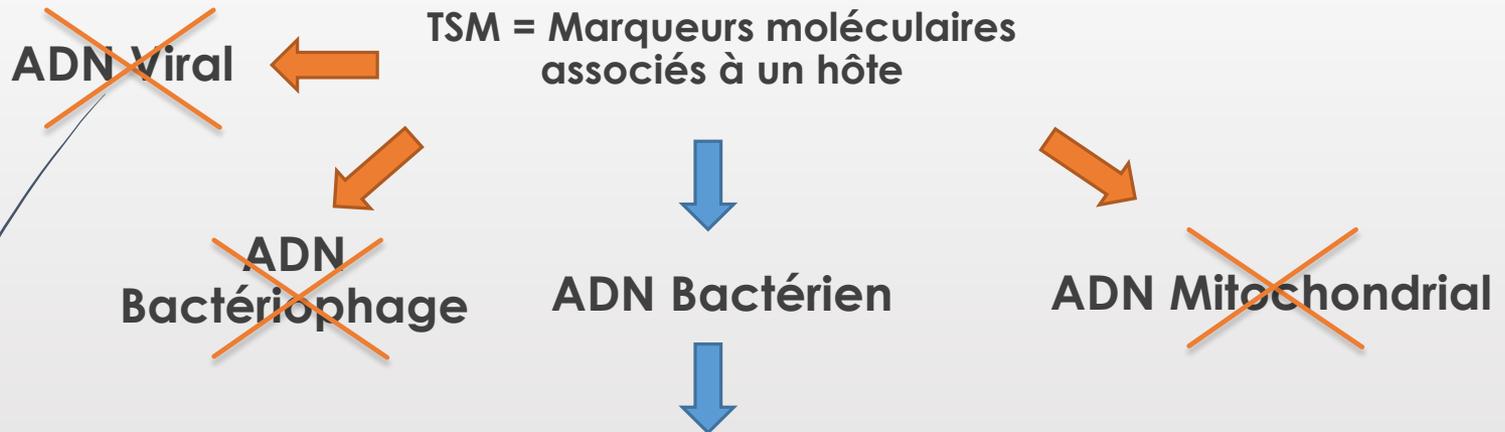
# Choix de Traceurs de Sources Microbiennes (TSM)

- Beaucoup de TSM développés ces dernières années dans la littérature scientifique :



# Choix de Traceurs de Sources Microbiennes (TSM)

- Beaucoup de TSM développés ces dernières années dans la littérature scientifique :



Gène codant l'ARNr 16S = ADNr 16S:

- Universel
- Spécifique : région hypervariables permettent d'identifier les taxons

# Choix de Traceurs de Sources Microbiennes (TSM)

## Traceurs choisis :



- Bactéries appartenant à l'ordre des *bacteroidales* : anaérobies, majoritaires (20 à 35 %) dans microbiote digestif mammifères
- 2 genres majoritaires : *Bacteroides* et *Prevotella*
- Coévolution, pression de sélection : spécificité de souches pour un hôte (au sein d'une même espèce bactérienne)



Identification de séquences d'ADN caractéristiques pour chaque hôte :

- Homme et chien : bactérie du genre *Bacteroides* (Seurinck et al, 2005; Dick et al, 2005a)
- Cheval : bactérie du genre *Prevotella* (Dick et al, 2005b)

# Choix de Traceurs de Sources Microbiennes (TSM)

## Traceurs choisis :



- Bactéries appartenant à l'ordre des *bacteroidales* : anaérobies, majoritaires (20 à 35 %) dans microbiote digestif mammifères
- 2 genres majoritaires : *Bacteroides* et *Prevotella*
- Coévolution, pression de sélection : spécificité de souches pour un hôte (au sein d'une même espèce bactérienne)



Identification de séquences d'ADN caractéristiques pour chaque hôte :

- Homme et chien : bactérie du genre *Bacteroides* (Seurinck et al, 2005; Dick et al, 2005a)
- Cheval : bactérie du genre *Prevotella* (Dick et al, 2005b)
- La bactérie *Catelicoccus marimammalium* (ordre des *Lactobacilliales*) : Aéro-anaérobie facultatif, cultivable, 25 à 50 % du microbiote du goéland (Wu et al. 2017)

# Test des traceurs

- ▶ Variabilité géographique de la sensibilité et de la spécificité des traceurs en fonction des études :
  - ▶ Nécessité de test sur un échantillonnage régional (fèces) :
    - 55 échantillons humains : CHU de Nîmes, Gard
    - 6 échantillons canins : Montpellier, Hérault
    - 15 échantillons équins : centre équestre Saint Affrique, Aveyron
    - 51 échantillons oiseaux (dont 19 goélands et mouettes) : Ligue de protection des oiseaux de Villeveyrac, Hérault

# Test des traceurs

- ▶ Variabilité géographique de la sensibilité et de la spécificité des traceurs en fonction des études :
  - ▶ Nécessité de test sur un échantillonnage régional (fèces) :
    - 55 échantillons humains : CHU de Nîmes, Gard
    - 6 échantillons canins : Montpellier, Hérault
    - 15 échantillons équins : centre équestre Saint Affrique, Aveyron
    - 51 échantillons oiseaux (dont 19 goélands et mouettes) : Ligue de protection des oiseaux de Villeveyrac, Hérault
- ▶ Détermination des conditions optimales de PCR et PCR quantitative (qPCR) sur ADN total extrait de fèces

# Détermination de la sensibilité et de la spécificité des TSM

- Pourcentage d'échantillons positifs en qPCR pour chaque traceur :

Echantillons	Traceur Humain	Traceur Canin	Traceur equin	Traceur Goéland / Mouette
Homme (n=55)	<b>50,9 % (28/55)</b>	0 % (0/55)	0 % (0/55)	0 % (0/55)
Chien (n=6)	0% (0/6)	<b>83,3% (5/6)</b>	0% (0/6)	0% (0/6)
Cheval (n=15)	0% (0/15)	0% (0/15)	<b>100% (15/15)</b>	0% (0/15)
Goélands et Mouettes (n=19)	0% (0/19)	10,53 % (2/19)	5,263 % (1/19)	<b>100 % (19/19)</b>
Autres oiseaux (n=32)	0% (0/32)	0% (0/32)	0% (0/32)	12,5 % (4/32)

# Détermination de la sensibilité et de la spécificité des TSM

- Pourcentage d'échantillons positifs en qPCR pour chaque traceur :

Echantillons	Traceur Humain	Traceur Canin	Traceur equin	Traceur Goéland / Mouette
Homme (n=55)	<b>50,9 % (28/55)</b>	0 % (0/55)	0 % (0/55)	0 % (0/55)
Chien (n=6)	0% (0/6)	<b>83,3% (5/6)</b>	0% (0/6)	0% (0/6)
Cheval (n=15)	0% (0/15)	0% (0/15)	<b>100% (15/15)</b>	0% (0/15)
Goélands et Mouettes (n=19)	0% (0/19)	<b>10,53 % (2/19)</b>	<b>5,263 % (1/19)</b>	<b>100 % (19/19)</b>
Autres oiseaux (n=32)	0% (0/32)	0% (0/32)	0% (0/32)	<b>12,5 % (4/32)</b>



	Sensibilité ( r )	Spécificité ( s )
Traceur Humain	51,00 %	100,00 %
Traceur Canin	83,00 %	98,30 %
Traceur equin	100,00 %	99,10 %
Traceur Goéland / Mouette	100,00 %	96,00 %

- Sensibilité variable :

- Résultats pour l'homme cohérent avec la littérature (61,1% en Californie, 62,5% et 54% en Bretagne)

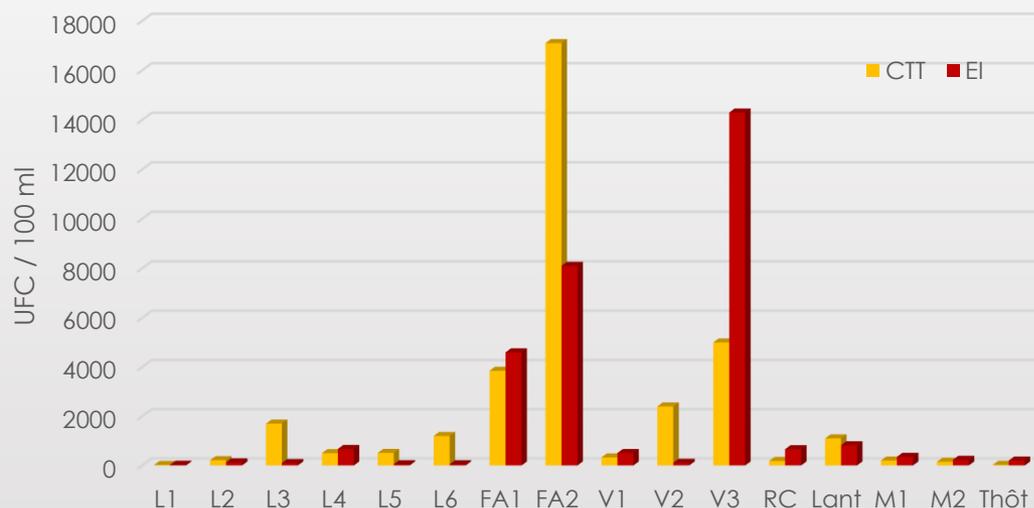
- Très bonnes spécificités

- Validation des TSM

# Premier test sur échantillons environnementaux : Cours d'eau bassin versant Montpelliérain (Projet OHM AntibioEaux 2, 2016, P. Licznar)

- Mesure de la contamination microbienne fécale (témoins de contamination) :

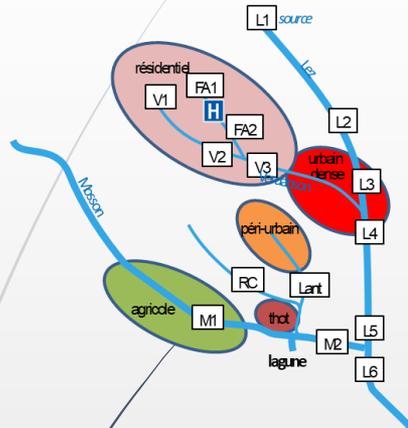
Coliformes ThermoTolérants et Entérocoques  
Intestinaux pour 100 ml d'eau



Campagne de décembre 2016

Forts taux de contamination surtout dans les cours d'eau de la zone résidentielle, et après le CHU

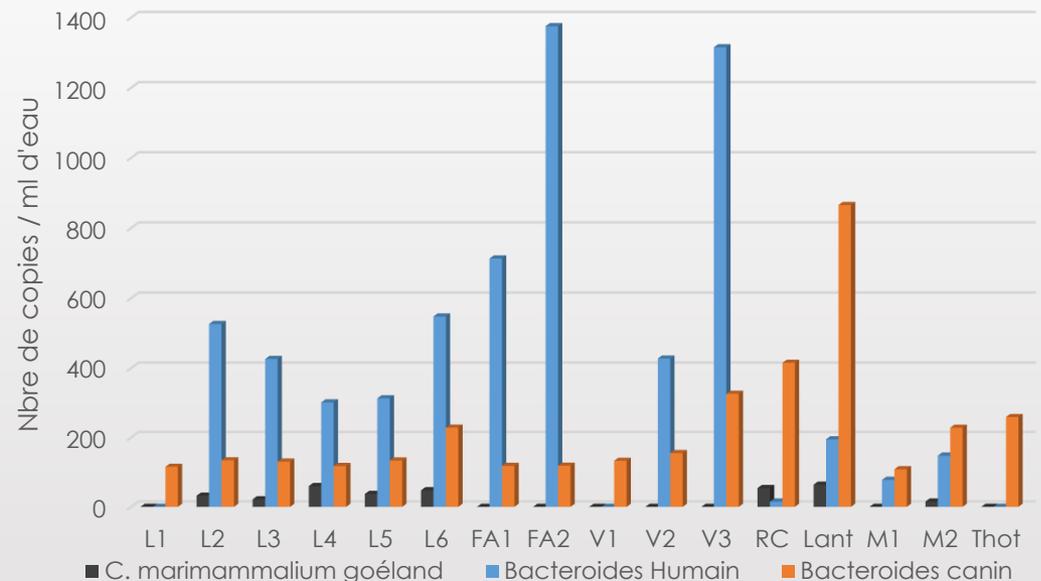
# Test de quantification par PCR quantitative (qPCR) des TSM



## Travail déjà effectué dans le cadre du projet Antibieaux 2 :

- Filtration d'un volume d'eau pour chaque site (200 à 500 ml) sur filtre acétate de cellulose 0,2 µm
- Purification d'ADN total à partir du filtre

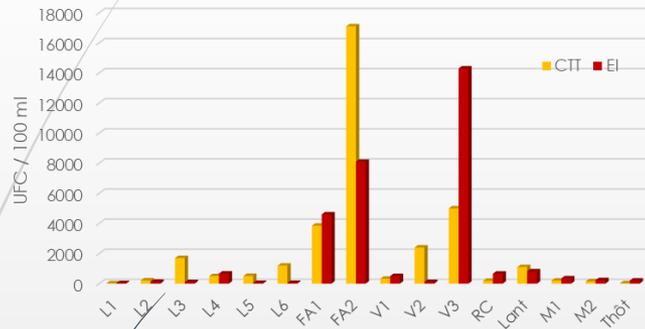
Détermination du nombre de copies / ml d'eau filtrée de chaque traceur par qPCR (décembre 2016)



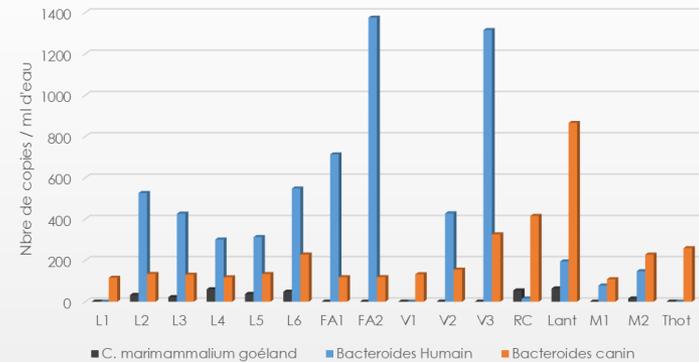
- Prédominance du marqueur humain le long du Lez et dans la zone résidentielle, surtout après l'hôpital
- Contamination d'origine canine partout, surtout dans les cours d'eau péri-urbains
- Faible contamination due aux goélands sur le Lez et les cours d'eau péri-urbains
- Pas de contamination d'origine équine

# Etude des Corrélations

Témoins de contamination  
CTT et EI pour 100 ml d'eau



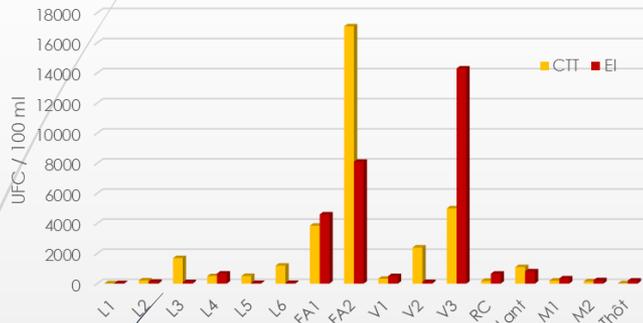
Traceurs d'origine  
Nombre de copies / ml d'eau des marqueurs humain, canin et goéland



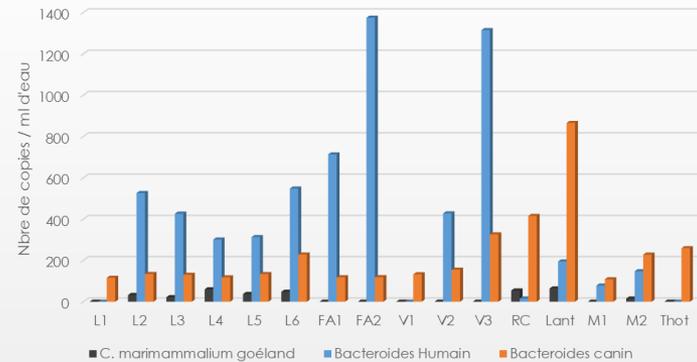
Fortes corrélations positives significatives ( $r=0,864$ ,  $p<0,001$ ) entre le nombre de copies du marqueur humain et le taux de CTT

# Etude des Corrélations

Témoins de contamination  
CTT et EI pour 100 ml d'eau

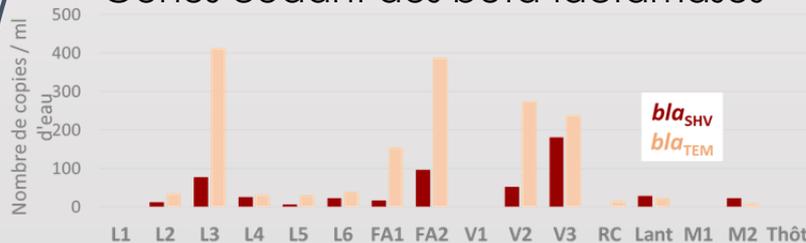


Traceurs d'origine  
Nombre de copies / ml d'eau des marqueurs humain, canin et goéland



- ▶ Forte corrélation positive significative ( $r=0,864$ ,  $p<0,001$ ) entre le nombre de copies du marqueur humain et le taux de CTT
- ▶ Corrélations avec antibiorésistance : voir poster AntibioEaux

Gènes codant des bêta-lactamases



- ▶ Corrélation positive ( $p<0,001$ ) entre :
  - taux de CTT
  - marqueur humain
  - Taux des 2 gènes de résistance

▶ A confirmer...



# Conclusion

- ▶ Outils mis au point et fonctionnels.
  - ▶ Prêts pour quantification sur échantillons environnementaux de toute origine.
  - ▶ Etudes avec TSM devraient apporter de l'aide à la décision pour le gestion de la contamination d'origine fécale.
- 

# Conclusion

- Outils mis au point et fonctionnels.
- Prêts pour quantification sur échantillons environnementaux de toute origine.
- Etudes avec TSM devraient apporter de l'aide à la décision pour la gestion de la contamination d'origine fécale.

## A suivre....

- Quantification des traceurs dans des échantillons récoltés en 2017-2018 :
  - Bassin versant Montpellierain : Projet Quali-LEZ, C. Salles
    - > 3 échantillonnages au cours de crues (Verdanson) en 2017 et 2018
  - Plage du Prophète à Marseille : Projet Quali-Plages, M-G Tournoud, S. Robert et P. Monfort
    - > Une journée de prélèvement en juillet 2018 : eau toute les heures et sable x3
  - Port Camargue : projet PORT-TRACONS, C. Bancon-Montigny
    - > Échantillonnage (8 sites) mensuel depuis mars 2018, bi-mensuel entre mai et septembre



Merci pour votre attention