



RAPPORT D'ETUDE

Septembre 2018

Les contaminations bactériologiques des eaux littorales du Morbihan

Quelles méthodes d'identification des origines de contamination ?



Mégane KISCHEL

Préambule

Ce rapport fait suite à un stage de fin d'études d'ingénieure à l'école Polytechnique de Tours, département "Aménagement et Environnement", option ADAGE (Aménagement Durable et Génie Ecologique) effectué par Mégane KISCHEL au sein du service de l'eau du Conseil départemental du Morbihan.

Ce travail a bénéficié de l'appui du Conseil Scientifique de l'Environnement du Morbihan (CSEM), présidé par Yves GROHENS, professeur en physique-chimie à l'Université de Bretagne-Sud. Il a été plus particulièrement suivi par Evelyne GOUBERT, Maître de conférences en géologie littorale, Université de Bretagne-Sud : Géosciences Marines et Géomorphologie du Littoral (GMGL), UMR CNRS 6538 Domaines Océaniques,

Remerciements

Tout d'abord, je voudrais remercier mes tuteurs de stage, Jean-Louis BELLONCLE et Romain CHAUVIERE, de m'avoir donné l'opportunité de réaliser ce stage : merci de m'avoir encadré tout au long de cette étude tout en me laissant une grande autonomie.

Merci également à tous les membres du service Eau pour leur accueil chaleureux et leur bienveillance.

Un grand merci à toutes les personnes rencontrées au cours de ce stage pour les informations précieuses qu'ils ont pu m'apporter et sur lesquelles repose toute cette étude.

Et enfin, merci à Evelyne GOUBERT et aux autres membres du CSEM pour leurs conseils.

Table des matières

Introduction	1
I. Contexte général de l'étude	2
1. Présentation du territoire morbihannais	2
2. Contaminations microbiologiques des eaux littorales	3
3. Enjeux associés	5
4. Evaluation de la contamination.....	6
4.1. Indicateurs de contamination fécale et cadre juridique	6
4.2. Classement des zones de baignade et de production conchylicole.....	8
5. Analyse systémique des risques de contamination	13
6. Les principaux acteurs liés à la gestion de la qualité des eaux	15
II. Objectifs de l'étude et méthodologie	16
1. Problématique et objectifs.....	16
2. Démarche méthodologique	17
III. Etat de l'art des différentes méthodes d'identification de l'origine des contaminations microbiologiques des eaux et des coquillages.....	20
1. Les méthodes TSM culture-indépendantes.....	23
1.1. Les marqueurs microbiologiques	23
1.2. Les marqueurs chimiques.....	37
2. Les méthodes TSM cultures-dépendantes : le typage des bactéries	43
3. Applicabilité dans les eaux et les coquillages.....	46
4. Synthèse de l'analyse comparative des différentes méthodes TSM.....	47
IV. Application des méthodes TSM par la sphère opérationnelle.....	50
1. Transfert de connaissances du monde de la recherche vers la sphère opérationnelle.....	50
2. Les acteurs opérationnels départementaux impliqués dans la réduction des contaminations des eaux littorales.....	51

3. Les actions menées par les maîtrises d’ouvrage pour identifier l’origine des contaminations	53
3.1. Structures porteuses et modalités d’analyse	53
3.2. Valorisation des résultats obtenus.....	68
4. Avantages et limites de l’approche d’identification par traceurs de sources microbiennes selon les acteurs opérationnels	71
4.1. Avantages de la méthode.....	71
4.2. Limites de la méthode.....	72
4.3. Synthèse	73
V. Recommandations et perspectives sur l’utilisation des méthodes d’identification de l’origine des contaminations	74
1. Principales recommandations issues de l’analyse	74
1.1. Améliorer le transfert des connaissances	74
1.2. Définir précisément les modalités de mise en œuvre.....	75
1.3. Mettre en place un guide technique visant à homogénéiser et aider les pratiques sur le territoire	82
2. Perspectives.....	85
2.1. Association de différents marqueurs dans des boîtes à outils.....	85
2.2. Optimisation des protocoles d’analyse	85
2.3. Développement de méthodes alternatives.....	86
Discussion.....	88
Conclusion	89
Bibliographie	91
Sitographie	95
Liste des sigles utilisés.....	96
Annexe 1 : Transposition des directives européennes en droit français.....	98
Annexe 2 : Personnes Ressources	99
Annexe 3 : Trame d’entretien à destination des acteurs du monde de la recherche	101

Annexe 4 : Trame d'entretien à destination des maîtres d'ouvrage.....	108
Annexe 5 : Trame d'entretien à destination des laboratoires d'analyse	112
Annexe 6 : Fiches-résumés des analyses menées par chaque maître d'ouvrage interrogé	115
Annexe 7 : Exemple de calendrier d'épandage	124
Annexe 8 : Carte d'occupation du sol localisant les potentielles sources de contamination	125

Introduction

Lieux d'échange entre le continent et l'océan, les territoires littoraux constituent des milieux très riches d'un point de vue écologique, qui abritent une grande biodiversité et voient se succéder divers espaces naturels : estrans, côtes et falaises rocheuses, marais maritimes, estuaires de cours d'eau, etc. (indicateurs-biodiversite.naturefrance.fr).

Territoires attractifs, où la densité de population est environ 3 fois plus importante que dans le reste du pays (Beoutis, Jean & Colas 2009), les milieux littoraux sont soumis à de nombreux usages, notamment liés au tourisme d'une part, du fait de la présence de sites de baignade, de plaisance ou de pêche à pied récréative, et à la conchyliculture d'autre part. Du fait de leur importance, à la fois écologique et économique, les littoraux font ainsi l'objet de nombreuses mesures de protection et de gestion, et leur préservation apparaît être un enjeu territorial majeur.

Les contaminations microbiologiques des eaux (et par conséquent, des coquillages qui s'y trouvent) représentent une des nombreuses problématiques auxquelles sont soumis les milieux littoraux. En effet, ces pollutions, dues à un apport important de germes d'origine fécale dans l'environnement, peuvent occasionner un risque sanitaire pour les baigneurs et les consommateurs de produits conchylicoles et ainsi impacter les usages du littoral.

Afin d'estimer le risque sanitaire encouru par les usagers, ces milieux (en particulier les sites de baignade, de production conchylicole et de pêche à pied récréative) font l'objet d'un classement de qualité, basé sur le dénombrement de bactéries indicatrices de contamination fécale dans les eaux/coquillages. L'analyse de ces bactéries permet ainsi de quantifier l'importance des pollutions, mais ne donne aucune indication quant à leur origine¹, ce qui empêche la mise en place d'actions correctives visant à réduire l'apport d'effluents contaminés dans le milieu naturel.

Si aujourd'hui, il existe des méthodes analytiques permettant d'identifier l'origine des contaminations microbiennes des eaux, leur connaissance et leur utilisation par les acteurs de la sphère opérationnelle semblent être limitées. Cette étude vise ainsi à réaliser :

- Un état de l'art des différentes méthodes existantes, validées par des phases expérimentales ou encore en cours de développement ;
- Un état des pratiques appliquées par la sphère opérationnelle, avec notamment une description des modalités de mise en œuvre des prélèvements et des analyses.

Tout ce travail a pour optique d'aboutir à une meilleure connaissance de l'existant, ainsi qu'à la formulation de recommandations pour une meilleure utilisation de ces méthodes par les acteurs du territoire.

¹ L'origine d'une contamination correspond à l'organisme duquel proviennent les germes mis en cause (hommes, bovins, porcins, chiens, ...). Ce terme s'oppose à la notion de "source" de contamination, qui fait référence à la provenance spatiale de la pollution (parcelle pâturée, poste de relevage, ...).

I. Contexte général de l'étude

1. Présentation du territoire morbihannais

Situé au sud de la Bretagne, le département du Morbihan présente une longueur de littoral assez exceptionnelle, avec plus de 1000 km de côtes (îles comprises), et possède ainsi une des franges côtières les plus importantes de France. Cette particularité entraîne une certaine dichotomie du territoire, avec d'une part la concentration d'une grande partie de la population et des activités liées à la pêche et au tourisme sur le littoral et d'autre part, un arrière-pays caractérisé par des activités agricoles et une surface importante de boisements. Le département est composé de 256 communes, dont 65 sont des communes littorales (telles que définies par la Loi Littoral) (observatoire-des-territoires.gouv.fr) et compte environ 745 000 habitants. Doté d'un climat tempéré de type océanique, les hivers y sont doux et pluvieux et les étés, frais et relativement humides (Atlas de l'Environnement du Morbihan 2010).



Figure 1. Côte sauvage de Quiberon (Source : terresceltes.net).

Le tourisme possède un poids économique prépondérant à l'échelle du Morbihan puisqu'il représente environ 10% du PIB du territoire (Atlas du Morbihan 2010) et concerne plus de 13 000 emplois en moyenne sur l'année (avec environ 21 000 postes pendant la saison estivale) (morbihan-pro.com 2014). Durant l'été, la population augmente considérablement puisque le département accueille chaque année 2,89 millions de touristes, dont 471 000 étrangers (morbihan.fr) : elle peut ainsi être multipliée par un facteur allant de 7 à 14 dans certains endroits, notamment sur la presqu'île de Rhuys et sur les îles (Treguier & Cochenec-Laureau 2017).

Si l'activité agricole est globalement en baisse sur le territoire (Treguier & Cochenec-Laureau 2017), le département recense tout de même 13 600 actifs dans ce secteur et environ 7 500 exploitations agricoles, dont 5 600 sont des exploitations professionnelles. La surface agricole représente 71% du territoire (morbihan.fr). L'élevage constitue l'essentiel de l'activité agricole morbihannaise, notamment l'élevage de vaches laitières, qui concerne 42% des exploitations professionnelles. L'aviculture est également très présente (18% des exploitations professionnelles) (DRAAF 2016).

Enfin, le littoral offre de nombreuses zones de baignade et de pêche à pied de coquillages (professionnelle ou récréative), et son morcellement est particulièrement favorable à la conchyliculture. Le Morbihan constitue ainsi le premier centre conchylicole de Bretagne. Il est possible d'y trouver trois types d'élevage de coquillages : l'ostréiculture (prédominante avec 69% des élevages), la mytiliculture (7%) et la vénériculture (2%) (Atlas de l'environnement du Morbihan 2010).



Figure 2. Concession conchylicole dans le Golfe du Morbihan (Source : parc-golfe-morbihan.bzh).



Figure 3. Principales zones conchylicoles dans le Morbihan en 2004 (Source : Atlas de l'Environnement du Morbihan 2010).

2. Contaminations microbiologiques des eaux littorales

Les contaminations (ou pollutions) microbiologiques représentent une des problématiques majeures auxquelles sont soumis les environnements littoraux. Ce terme correspond à la présence, dans un milieu donné, de germes microbiens, tels que des bactéries, des virus ou encore des parasites (SMRE 2012), dont certains peuvent être pathogènes pour l'Homme ou les animaux (pecheapied-responsable.fr). Le terme de contamination bactériologique sera plutôt employé quand les microorganismes polluants sont spécifiquement des bactéries.

Si le milieu marin constitue l'environnement naturel de certains microorganismes, la plupart des germes mis en cause dans les contaminations microbiologiques des eaux littorales sont d'origine humaine ou animale. Il s'agit de microorganismes entériques, c'est-à-dire provenant de l'intestin de l'Homme ou des animaux à sang chaud et apportés dans le milieu *via* leurs déjections (Agence de l'Eau Loire-Bretagne 2013). Il est possible d'identifier plusieurs causes de contamination, expliquant l'arrivée de ces microorganismes fécaux dans le milieu naturel en quantité plus ou moins importante.

Les **contaminations d'origine humaine** peuvent notamment être liées à un dysfonctionnement ou à une diminution de l'efficacité des systèmes d'assainissement des eaux usées. Le **système d'assainissement collectif** peut ainsi impacter les usages liés au milieu littoral *via* :

- Un dysfonctionnement des installations de traitement des eaux usées ou l'usage d'un traitement non-adapté dans les stations d'épuration. En effet, la filière de traitement peut influencer sur la quantité de microorganismes présente dans les effluents : le lagunage ou l'épuration par procédé membranaire permettent par exemple d'abattre une plus grosse quantité de bactéries que les boues activées (Treguier et *al.* 2010, Idhesa 2013).
- Une surcharge du réseau de collecte, notamment par temps de pluie, ce qui peut limiter l'efficacité du système d'assainissement.
- Une mauvaise étanchéité du réseau, entraînant une exfiltration des effluents.

- De mauvais raccordements du réseau, soit le branchement d'une évacuation d'eaux usées sur le réseau d'eaux pluviales, ou inversement.

Tous ces défauts du système d'assainissement collectif peuvent entraîner le rejet d'eau brute ou peu traitée dans les milieux aquatiques, ce qui a pour conséquence l'apport de germes microbiens dans le milieu naturel au niveau des points de rejet.

Les **installations d'assainissement non-collectif** (ANC) peuvent aussi engendrer une contamination si elles ne sont pas conformes et rejettent des effluents peu ou non traités dans le milieu naturel. Ces installations font l'objet d'un contrôle régulier par le SPANC mais la contamination qu'elles génèrent est plus difficile à quantifier que celle liée au système d'assainissement collectif (Agence de l'Eau Loire-Bretagne 2013). Par ailleurs, les phénomènes de cabanisation et de « caravaning sauvage », qui impliquent la mise en place d'habitations temporaires rarement reliées à un système d'ANC, peuvent également participer aux pollutions microbiologiques des eaux.

Enfin, d'autres activités peuvent entraîner l'apport de bactéries d'origine humaine dans le milieu, en particulier :

- Les activités de plaisance, notamment lorsque les embarcations sont habitées et ne disposent pas de système de récupération des eaux noires. Les pollutions fécales dues à ces activités se localisent essentiellement au niveau des ports de plaisance et des zones de mouillage.
- Les activités touristiques, notamment les sports nautiques (voile, kayak de mer, etc.) (les contaminations liées à ces activités sont cependant « secondaires » et leur impact sur les usages du littoral semble très faible).

Les **contaminations d'origine animale** sont quant à elles essentiellement liées aux activités agricoles. Elles peuvent notamment provenir :

- Du lessivage des surfaces pâturées et de circulation du bétail, qui va drainer les contaminations présentes dans le sol vers les cours d'eau. L'abreuvement des animaux directement dans les cours d'eau contribue également à la pollution.
- De l'épandage de lisier et de fumier sur les parcelles cultivées, dans le cas où les agriculteurs ne se conforment pas à la réglementation en vigueur, notamment en ce qui concerne les distances d'épandage à respecter vis-à-vis des milieux aquatiques ou encore les périodes d'épandage autorisées.
- Ou encore de la fuite des ouvrages de stockage de lisier et de fumier au niveau des sièges d'exploitation (Agence de l'Eau Loire-Bretagne 2013).

Ces contaminations peuvent aussi être dues aux industries, notamment agro-alimentaires, si leurs effluents ne sont pas traités correctement, ou encore à la **faune sauvage**, en particulier la faune avicole. Le département du Morbihan abrite en effet un certain nombre de zones humides, préservées par des restrictions réglementaires, qui favorisent la présence d'oiseaux en migration ou en hivernage (Treguier et *al.* 2010, 2017).

Enfin, les germes présents à la surface du sol (principalement issus des déjections animales) sont également apportés aux milieux aquatiques *via* le **réseau d'eaux pluviales** puisque les eaux de pluie constituent un des principaux vecteurs des contaminations. Par ailleurs, ce réseau, propice au dépôt de sédiments, favorise le développement de microorganismes qui sont également évacués vers le milieu naturel lors d'épisodes pluvieux (Agence de l'Eau Loire-Bretagne 2013).

Il est également important de souligner l'impact néfaste des mauvais raccordements entre les systèmes d'assainissement (collectif ou non-collectif) des eaux usées et le réseau d'eaux pluviales. En effet, le raccordement d'évacuations d'eaux usées sur le réseau d'eaux pluviales impactera le milieu naturel de façon directe, puisque ce dernier recevra des eaux usées brutes. A l'inverse, l'arrivée d'eaux pluviales dans le réseau d'eaux usées aura un impact indirect ou différé sur le milieu récepteur, en générant potentiellement un débordement du réseau ainsi qu'une diminution de l'efficacité du traitement des eaux usées du fait de leur dilution (Agence de l'Eau Loire-Bretagne 2013).

Dans le département du Morbihan, les pollutions microbiologiques des eaux sont principalement dues aux déjections humaines, bovines et porcines (Pourcher et *al.* 2012). Cependant, les procédés analytiques permettant d'identifier clairement l'origine des contaminations semblent encore être peu mis en œuvre par les acteurs territoriaux de l'eau, notamment car ils nécessitent le recours à des méthodes complexes et onéreuses (Agence de l'Eau Loire-Bretagne 2013).

3. Enjeux associés

Les contaminations microbiologiques peuvent impliquer l'apparition d'un certain nombre de microorganismes, pathogènes ou non, dans les eaux littorales : il s'agit le plus souvent de germes fécaux, adaptés à l'organisme de l'Homme ou des animaux, tels que les virus et les bactéries entériques (Hervio-Heath, Gourmelon & Martial 2012). Le plus connu et le plus étudié est la bactérie *Escherichia coli*, dont certaines souches sont pathogènes (Gourmelon 2014).

Cette étude porte spécifiquement sur les impacts des contaminations des eaux sur la santé de l'Homme et les usages liés au littoral. Cependant, les germes microbiens peuvent également avoir un impact sanitaire sur la faune, notamment le bétail lors de l'abreuvement dans les cours d'eau.

Il existe différentes voies d'exposition de l'Homme aux microorganismes pathogènes présents dans le milieu naturel. L'Homme peut ainsi être contaminé par :

- Ingestion de l'eau contenant les germes. Il s'agit de la voie de contamination la plus fréquemment rencontrée.
- Contact de la peau ou des muqueuses avec les germes.
- Inhalation des germes (ce cas de figure est cependant très rare) (Agence de l'Eau Loire-Bretagne 2013).

La baignade dans une eau de mauvaise qualité microbiologique présente ainsi des risques pour la santé et peut entraîner des infections, principalement des gastro-entérites, plus ou moins sévères selon les germes impliqués, des otites et des dermatites. Dans de rares cas, une eau contaminée peut également conduire à des maladies infectieuses plus graves telles que la typhoïde, le choléra, etc. (Agence Régionale de Santé 2012, Agence de l'Eau Loire-Bretagne 2013).

Certains éléments du milieu peuvent aussi jouer le rôle de « vecteur » de la contamination de l'eau vers l'Homme, notamment les coquillages, qui sont particulièrement sensibles aux pollutions du fait de leur physiologie. En effet, il s'agit d'organismes filtreurs microphages, qui se nourrissent à partir des particules assimilables du milieu environnant, de phytoplancton et de bactéries et les concentrent dans leur système digestif. La concentration en microorganismes dans les tissus des coquillages peut ainsi être de 10 à 100 fois plus importante que celle de l'eau qui les entoure (Agence de l'Eau Loire-Bretagne 2013). L'ingestion de contaminants microbiens *via* la consommation de coquillages (souvent crus ou peu cuits) est impliquée dans l'apparition de Toxi-Infections Alimentaires Collectives (TIAC) et peut générer des maladies plus ou moins graves, notamment des gastro-entérites aiguës et des hépatites (Treguier et *al.* 2010 ; Hervio-Heath, Gourmelon & Martial 2012 ; Agence de l'Eau Loire-Bretagne 2013 ; Morin, Richard & Treguier 2017).

Enfin, en plus de l'enjeu sanitaire, les contaminations microbiologiques des eaux présentent également un enjeu économique puisqu'elles peuvent conduire au déclassement, voire à la fermeture, de zones de baignade ou de pêche à pied récréative et ainsi impacter le tourisme de façon plus ou moins importante. Elles peuvent aussi mener au déclassement ou à la fermeture de zones de production conchylicole, entraînant alors des investissements coûteux pour purifier les coquillages ou encore délocaliser l'activité (Hervio-Heath, Gourmelon & Martial 2012 ; Agence de l'Eau Loire-Bretagne 2013).

4. Evaluation de la contamination

4.1. Indicateurs de contamination fécale et cadre juridique

Les méthodes de recherche, d'identification et de quantification des divers germes pathogènes potentiellement présents dans les eaux ou les coquillages sont complexes et coûteuses (Agence de l'Eau Loire-Bretagne 2013). Afin d'évaluer le risque sanitaire encouru par les baigneurs et les consommateurs de coquillages, deux indicateurs de contamination fécale, dont l'habitat est spécifique du tube digestif des mammifères, ont été retenus dans les textes réglementaires : la bactérie *Escherichia coli* et les entérocoques intestinaux (Treguier et *al.* 2010). La présence de ces germes dans les eaux peut en effet être associée à celle d'autres microorganismes pathogènes plus dangereux, d'origine bactérienne (comme les *Salmonella*, les *Shigella* ou encore les *Pseudomonas*) ou virale (Agence Régionale de Santé 2012).

La **bactérie *Escherichia coli*** appartient au groupe des coliformes thermotolérants. Si la plupart de ses souches sont inoffensives, certaines peuvent entraîner une infection (intestinale ou extra-intestinale). *E. coli* a été choisi pour évaluer l'importance des contaminations bactériologiques dans les eaux et les coquillages notamment en raison de sa spécificité fécale et de sa facilité de détection

(Agence de l'Eau Loire-Bretagne 2013). De plus, sa capacité de survie très brève en dehors de l'organisme est comparable à celle des autres germes pathogènes, ce qui permet de mettre en évidence les contaminations fécales récentes. En revanche, cet indicateur n'est pas pertinent pour évaluer l'importance des contaminations d'origine virale (Treguier et *al.* 2010, Agence de l'Eau Loire Bretagne 2013). Les **entérocoques intestinaux** constituent quant à eux un sous-groupe des streptocoques fécaux. Leur quantité dans les fèces, humaines et animales, est nettement moins importante que celle d'*E. coli*. Cependant, ils ont tendance à survivre plus longtemps dans le milieu aquatique : ils représentent ainsi un bon indicateur des contaminations fécales anciennes (Agence Régionale de Santé 2012, Agence de l'Eau Loire Bretagne 2013).

Une réglementation a été mise en place dès les années 1970 pour évaluer le risque sanitaire lié aux eaux de baignade et aux eaux de production conchylicole. Ce **risque** peut être défini comme la "probabilité que des effets sur la santé surviennent à la suite d'une exposition à une source de contamination" (Morin, Richard & Treguier 2017) et équivaut au produit d'un aléa et d'une vulnérabilité :

- L'**aléa** correspond à la présence de germes pathogènes dans les eaux de baignade ou les tissus des coquillages destinés à la consommation humaine.
- La **vulnérabilité** correspond à la combinaison d'un ensemble de facteurs qui vont influencer sur la probabilité qu'un ou des usagers contractent une infection, notamment le nombre d'individus exposés à l'aléa, leur fréquence d'exposition ou encore leur fragilité d'un point de vue physiologique et immunitaire (Morin, Richard & Treguier 2017).

Cette réglementation a principalement été formalisée par la **Directive Cadre sur l'Eau DCE** (directive 2000/60/CE du 23 octobre 2000), qui fournit un cadre pour la politique de gestion des eaux à l'échelle des territoires de l'Union Européenne et impose à ses Etats membres de mettre en œuvre des actions pour préserver, améliorer ou restaurer la qualité des eaux, notamment littorales (Agence de l'Eau Loire-Bretagne 2013). Cette directive a donné naissance à deux autres directives européennes, qui assurent en grande partie l'encadrement de la qualité des eaux littorales associées aux activités de loisirs et de production conchylicole :

- La **Directive 2006/7/CE** du 15 février 2006 ([Annexe 1 : transposition des directives européennes en droit français](#)) fixe des dispositions en ce qui concerne la surveillance et le classement des zones de baignade et demande à ce que soit élaboré un profil de baignade pour chacune d'elles, avec notamment une description de leur qualité microbiologique et le recensement de toutes les sources de contamination pouvant potentiellement les impacter (Agence de l'Eau Loire Bretagne 2013). Ces profils visent à établir des mesures de gestion adaptées pour réduire ou éliminer le risque de pollution. Leur élaboration est à la charge des personnes juridiquement responsables des eaux de baignade (Agence Régionale de Santé 2012).
- La **Directive 2006/113/CE** du 12 décembre 2006, relative à la qualité requise des eaux conchylicoles, a pour but d'assurer la vie et la croissance des coquillages (mollusques bivalves et gastéropodes) et de garantir la bonne qualité des produits conchylicoles. Elle définit notamment les valeurs des paramètres applicables aux zones de production conchylicole

ainsi que la fréquence de mesure et d'échantillonnage à respecter dans le cadre de leur suivi (Agence de l'Eau Loire Bretagne 2013).

Enfin, le **Règlement (CE) n°854/2004** du Parlement Européen et du Conseil du 29 avril 2004 (modifié par le règlement (CE) n°2285/2015), fixant les règles spécifiques d'organisation des contrôles officiels concernant les produits d'origine animale destinés à la consommation humaine, définit les exigences en ce qui concerne la qualité sanitaire des zones conchylicoles (Bordage 2009 ; Treguier et *al.* 2017). Il s'agit d'un des six règlements communautaires qui composent le **Paquet Hygiène**, entré en application le 1^{er} janvier 2006 et ayant pour but de mettre en place une politique commune à l'échelle européenne en matière d'hygiène de l'alimentation humaine et animale (agriculture.gouv.fr).

4.2. Classement des zones de baignade et de production conchylicole

Evaluation de la qualité des eaux de baignade

La caractérisation de la qualité des eaux de baignade et de production conchylicole est basée sur le dénombrement des indicateurs de contamination fécale. En ce qui concerne l'évaluation du nombre de bactéries dans les eaux de baignade, les méthodes d'analyse officiellement reconnues par le ministère en charge de la santé sont les méthodes dites « microplaques », soit les méthodes normalisées NF EN 9308-03 pour *Escherichia coli* et NF EN 7899-1 pour les entérocoques intestinaux (Agence Régionale de Santé 2012). Le classement des eaux est réalisé chaque année *via* le traitement statistique des résultats d'analyse obtenus sur une période de quatre ans. La directive 2006/7/CE distingue quatre classes de qualité de l'eau, définies par des valeurs seuils (différentes pour l'eau de mer et l'eau douce) (Tableau 1) : excellente, bonne, suffisante et insuffisante. Les indicateurs de contamination fécale sont mesurés en UFC (Unité Formant Colonie) dans 100 ml d'eau.

Tableau 1. Valeurs seuils et classes de qualité pour l'eau de mer dans la directive 2006/7/CE (Source : AFSSET 2007).

Paramètre (UFC/100 ml)	Excellente qualité	Bonne qualité	Qualité suffisante	Qualité insuffisante
Entérocoques intestinaux	100*	200*	185**	> 185**
E. coli	250*	500*	500**	> 500**

* Evaluation au 95^{ème} percentile : valeur à laquelle 95% des résultats sont inférieurs.

** Evaluation au 90^{ème} percentile : valeur à laquelle 90% des résultats sont inférieurs.

Plus la concentration en indicateurs de contamination fécale augmente dans le milieu, plus le risque sanitaire encouru par les baigneurs est important. Des résultats indiquant une eau de qualité insuffisante peuvent ainsi entraîner une interdiction de baignade si aucune mesure de gestion n'est prise pour réduire la pollution. Pour satisfaire à l'exigence de qualité européenne, les eaux de baignade sont censées atteindre au moins un niveau de qualité suffisante.

Les “pollutions à court terme” peuvent également entraîner des mesures d’interdiction de baignade. Il s’agit de contaminations microbiologiques dont la durée n’excède normalement pas 72 heures et dont les causes sont clairement identifiables (Agence Régionale de Santé Nouvelle Aquitaine 2016). Ces contaminations sont caractérisées par le dépassement de valeurs seuils définies par le ministère en charge de la santé, à savoir 1000 UFC/100 ml d’eau pour *Escherichia coli* et 370 UFC/100 ml d’eau pour les entérocoques intestinaux (Agence Régionale de Santé 2012). Il est à noter que les prélèvements d’eau réalisés lors d’un épisode de contamination à court terme ayant mené à une interdiction de baignade et dont la cause a été identifiée peuvent ne pas être pris en compte dans l’établissement du classement de qualité des eaux de loisirs de l’ARS (ARS Nouvelle-Aquitaine 2016).

Evaluation de la qualité des zones de production conchylicole

L’ensemble des zones de production conchylicole et de pêche professionnelle de coquillages vivants fait l’objet d’un classement, fonction de valeurs seuils définies par le Règlement (CE) n°854/2004. Ce classement utilise les données acquises par le réseau REMI (REseau de contrôle MIcrobiologique des zones de production conchylicole) de l’Ifremer au cours des trois dernières années et se base sur le dénombrement de l’indicateur de contamination fécale *Escherichia coli* ainsi que sur la concentration en métaux lourds (plomb, cadmium et mercure) dans les tissus des coquillages. De façon générale, chaque zone classée possède un point de prélèvement de coquillages dont la localisation est pérenne et bien définie géographiquement (Treguier et *al.* 2017). Le suivi porte sur une espèce précise appartenant à un des trois groupes de coquillages suivants, distincts au regard de leur physiologie :

- Le groupe 1 rassemble les gastéropodes, les échinodermes et les tuniciers.
- Le groupe 2, les bivalves fouisseurs.
- Le groupe 3, les bivalves non-fouisseurs.



Figure 4. De gauche à droite : exemple de coquillages du groupe 1, 2 et 3 : ormeaux sauvages (source : luximer.com) ; palourdes (source : crc-pays-de-la-loire.fr) ; huîtres (source : luximer.com).

Les zones de production conchylicole sont ainsi classées en trois classes de qualité, avec des conséquences sur le traitement et la commercialisation des coquillages (Tableau 2). La quantification bactériologique est exprimée en nombre de germes présents dans 100 g de Chair et de Liquide Intervalaire (CLI) (Treguier et *al.* 2017).

Tableau 2. Exigences réglementaires du classement de zone (Règlement (CE) n°854/2004, arrêté du 06/11/2013) (Source : Treguier et al. 2017).

Classement	Mesures de gestion avant mise sur le marché	Critères de classement (E. coli/100g de chair et liquide intervalvaire (CLI))			
		230	700	4 600	46 000
A	Consommation humaine directe	Au moins 80% des résultats	Tolérance de 20% des résultats		
B	Consommation humaine après purification	Au moins 90% des résultats			Tolérance de 10% des résultats
C	Consommation humaine après reparcage ou traitement thermique	100% des résultats			
Non-classée	Interdiction de récolte	Si résultat supérieur à 46 000 E. coli/100 g de CLI Ou si Seuils dépassés pour les contaminants chimiques (cadmium, mercure, plomb, HAP, dioxines et PCB)			

Le réseau REMI possède également un dispositif d'alerte, qui vise à détecter et suivre les épisodes inhabituels de contamination. La concentration seuil en *Escherichia coli* dont le dépassement entraîne une mise en alerte est :

- 230 E. coli/100 g de CLI pour les sites classés A.
- 4 600 E. coli/100 g de CLI pour les sites classés B.
- 46 000 E. coli/100 g de CLI pour les sites classés C (Ifremer 2015).

Il est possible de distinguer trois niveaux d'alerte :

- Le niveau d'alerte 0 est déclenché de façon préventive, sans qu'un prélèvement issu de la surveillance ne montre de résultat "défavorable" (c'est-à-dire dépassant la concentration seuil en *E. coli* fixée).
- Le niveau d'alerte 1 est déclenché sur la base d'un résultat défavorable.
- Enfin, le niveau d'alerte 2 est déclenché sur la base d'au moins deux résultats défavorables.

Le déclenchement du dispositif d'alerte se traduit par :

- L'émission d'un bulletin d'alerte vers :
 - les administrations locales dans le cadre d'une alerte de niveau 0 ou 1.

- les administrations locales et nationales dans le cadre d'une alerte de niveau 2.
- La réalisation de prélèvements (dont le nombre et la fréquence dépendent du niveau d'alerte) sur le site en alerte (Ifremer 2015).

Evaluation des zones de pêche à pied récréative

Dans le Morbihan, la surveillance des sites de pêche à pied récréative est assurée conjointement par l'ARS et le LDA56 (laboratoire prestataire des analyses du suivi REMI dans le département). En effet, l'ARS suit les spots de pêche à pied de loisirs les plus prisés et ce réseau de surveillance est complété par des points du réseau REMI, correspondant aux gisements professionnels également fréquentés par des pêcheurs amateurs. Ainsi, en 2016, le Morbihan comptait 16 points suivis par l'ARS et 4 points suivis par le LDA (Morin, Richard & Treguier 2017).

Contrairement à la production professionnelle de coquillages, la pratique de la pêche à pied récréative est très peu encadrée d'un point de vue juridique (Agence Régionale de Santé Bretagne & Ifremer 2016). La seule disposition réglementaire existante à ce sujet est apportée par l'article R.231-43 du Code Rural, qui indique que la pêche non-professionnelle de coquillages est autorisée uniquement sur les sites de production de classement A ou B et interdite sur les sites classés C (Morin, Richard & Treguier 2017). L'ARS et l'Ifremer ont donc établi un classement non-officiel visant à évaluer la qualité sanitaire des sites de pêche à pied de loisirs (source : entretien Benjamin Richard,). Ce classement diffère de celui appliqué aux gisements professionnels, notamment car les coquillages issus de la pêche à pied de loisirs ne sont pas contrôlés et ne bénéficient pas de procédés de purification avant consommation, contrairement aux coquillages commercialisés. Le risque sanitaire lié à leur consommation est donc plus important.

Ce classement comporte 5 classes de qualité (bonne, moyenne, médiocre, mauvaise et très mauvaise), définies par des valeurs seuils de concentration en *Escherichia coli* (Tableau 3). Pour que les résultats issus de la surveillance soient lisibles et compréhensibles par le grand public, chaque classe de qualité est associée à des recommandations sanitaires, qui indiquent notamment si la pêche sur le site est autorisée, tolérée, déconseillée ou interdite.

Tableau 3. Principe d'évaluation de la qualité sanitaire des zones de pêche à pied récréative (Source : Morin, Richard & Treguier 2017).

Niveau de contamination (Escherichia coli pour 100g de Chair et Liquide Intervalaire)	Qualité	Message sanitaire
100% des résultats ≤ 230	Bonne	
90% des résultats ≤ 1 000 et 100% des résultats ≤ 4 600	Moyenne	
90% des résultats ≤ 4 600 et 100% des résultats ≤ 46 000	Médiocre	
100% des résultats ≤ 46 000	Mauvaise	
Au moins un résultat > 46 000	Très mauvaise	

Comme pour les gisements de coquillages professionnels, le classement des sites de pêche à pied récréative se base sur les résultats acquis par les réseaux de surveillance de l'ARS et du REMI au cours des 3 dernières années. En principe, la fréquence de suivi des sites est mensuelle. Cependant, les zones qui présentent une qualité bonne et stable font l'objet d'un suivi allégé par l'ARS (6 analyses/an). En ce qui concerne le REMI, la fréquence de suivi des sites est adaptée en fonction du classement de salubrité de la zone et peut être mensuelle ou bimestrielle (Morin, Richard & Treguier 2017). Par ailleurs, étant donné le risque de contamination moindre encouru par les coquillages du groupe 1, la surveillance sanitaire des sites de pêche à pied de loisirs porte uniquement sur les coquillages bivalves (groupe 2 et 3).

Comme pour les exploitations professionnelles et les eaux de baignade, le risque sanitaire encouru par les consommateurs de produits conchylicoles augmente avec la concentration en *E. coli* dans les tissus des coquillages (indiquant la présence potentielle d'autres germes pathogènes).

5. Analyse systémique des risques de contamination

La Figure 5. Principales origines et vecteurs de risque des contaminations bactériologiques des eaux littorales. résume le contexte général de l'étude et illustre les différents éléments mis en jeu lors d'une contamination microbiologique des eaux estuariennes, littorales et des coquillages, notamment :

- Les principales origines/sources de contamination, à savoir les organismes-hôtes qui portent les germes microbiens responsables des pollutions au sein de leur tractus intestinal. En Bretagne, ces microorganismes proviennent essentiellement des humains, du cheptel agricole (bovins, ovins, porcins, volailles, etc.), des animaux domestiques (en particuliers les canins) ou encore de la faune sauvage (oiseaux, etc.). Leur évacuation vers le milieu extérieur se fait *via* les déjections de leurs hôtes.
- Les principaux sites/milieus porteurs des contaminations, qui vont recevoir les déjections et les germes associés.
- Les périodes propices aux pollutions sur chaque type de milieu porteur. En effet, la fréquentation des milieux par les organismes-hôtes peut varier au cours de l'année : la probabilité qu'ils soient contaminés est alors plus ou moins forte selon les saisons. Ce cas de figure s'applique notamment aux sites de camping, de caravanning sauvage et aux zones de plaisance, qui sont fréquentés essentiellement en période estivale par les hommes et les animaux domestiques. De même, les vasières littorales et les marais maritimes sont plus susceptibles d'être contaminés par les oiseaux migrateurs en automne et en hiver.
- Les principaux vecteurs de contamination, qui transportent les microorganismes fécaux entre les différents milieux porteurs. Il peut s'agir :
 - o des eaux pluviales, qui vont drainer les germes présents à la surface du sol vers les cours d'eau ou les eaux littorales directement.
 - o Des réseaux d'assainissement des eaux usées.
 - o Des marées en ce qui concerne les milieux soumis à leur balancement.

La Figure 6. Principaux enjeux liés aux contaminations bactériologiques des eaux littorales. représente quant à elle les grands enjeux associés aux contaminations microbiologiques des principales zones d'intérêt du littoral, à savoir les sites de baignade, les zones de pêche à pied récréative et les exploitations conchylicoles professionnelles.

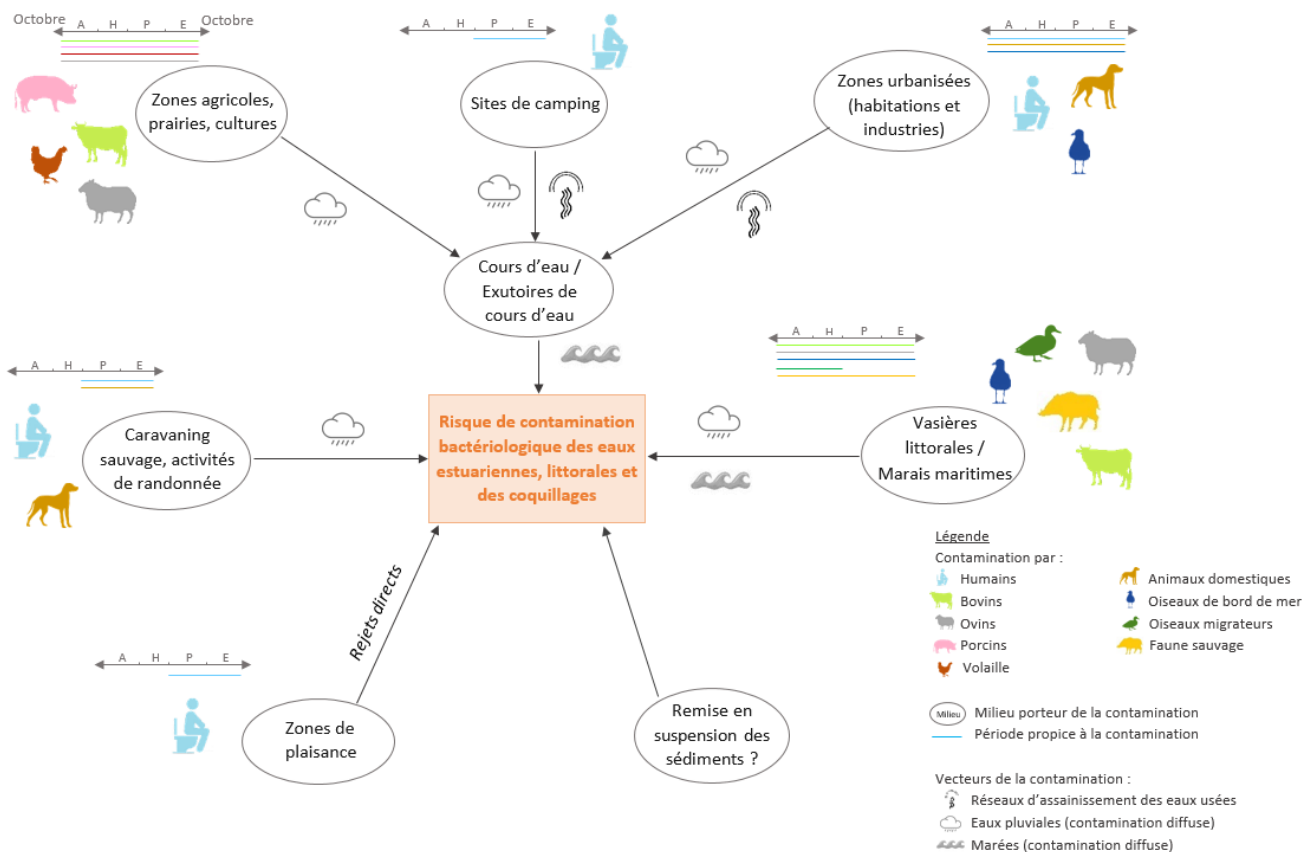


Figure 5. Principales origines et vecteurs de risque des contaminations bactériologiques des eaux littorales.

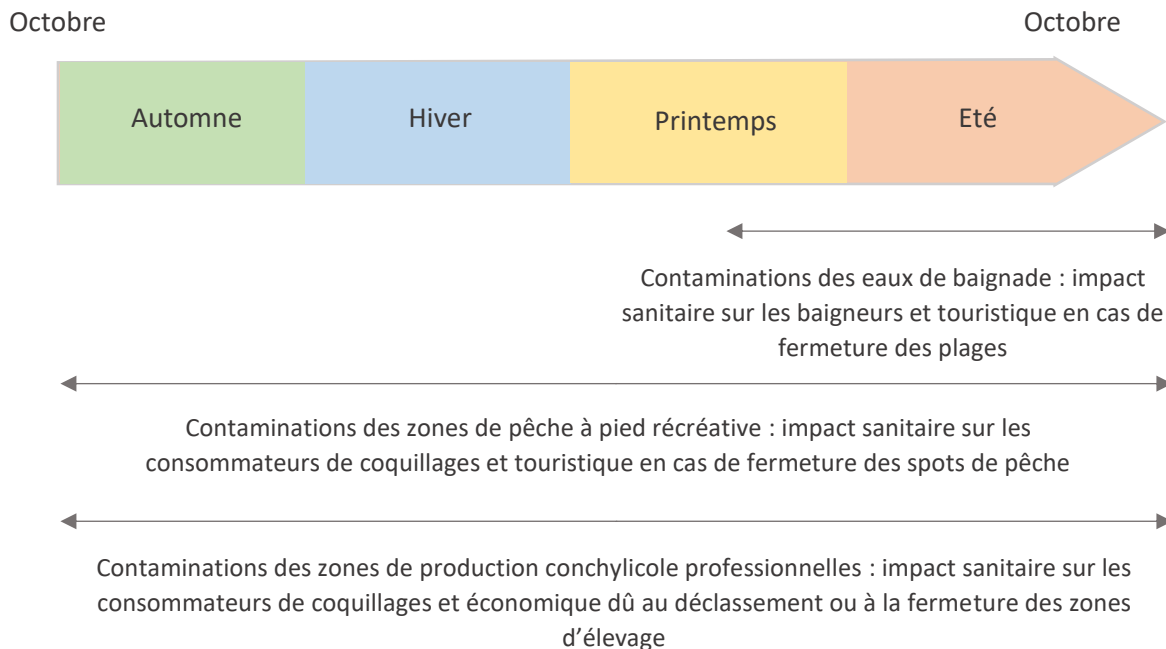


Figure 6. Principaux enjeux liés aux contaminations bactériologiques des eaux littorales.

6. Les principaux acteurs liés à la gestion de la qualité des eaux

De nombreux acteurs entrent en jeu dans le cadre de la surveillance et de la gestion des milieux littoraux, à différentes échelles (Figure 7). Globalement, les projets visant à maintenir ou à améliorer la qualité microbiologique des zones littorales, estuariennes et des cours d'eau qui les alimentent sont mis en place par des maîtrises d'ouvrage, pouvant être des Syndicats Mixtes ou des Etablissements Publics de Coopération Intercommunale (EPCI). Ces structures bénéficient d'un appui technique et financier, notamment de la part du département, de la région ou encore de l'Agence de l'Eau.

Les maîtrises d'ouvrage sont également impliquées dans la surveillance de la qualité des eaux puisqu'un certain nombre d'entre elles disposent d'un réseau de suivi basé sur des analyses plus ou moins régulières de la concentration en *E. coli* dans le milieu. Les résultats obtenus permettent ainsi de renforcer le suivi assuré par l'ARS au niveau des sites de baignade et des zones de pêche à pied récréative et le suivi REMI.

Enfin, en cas de contamination, il incombe au maire de la commune concernée, au préfet de département, voire au préfet maritime de Brest selon la gravité de la situation, de mettre en œuvre des actions visant à limiter le risque sanitaire.

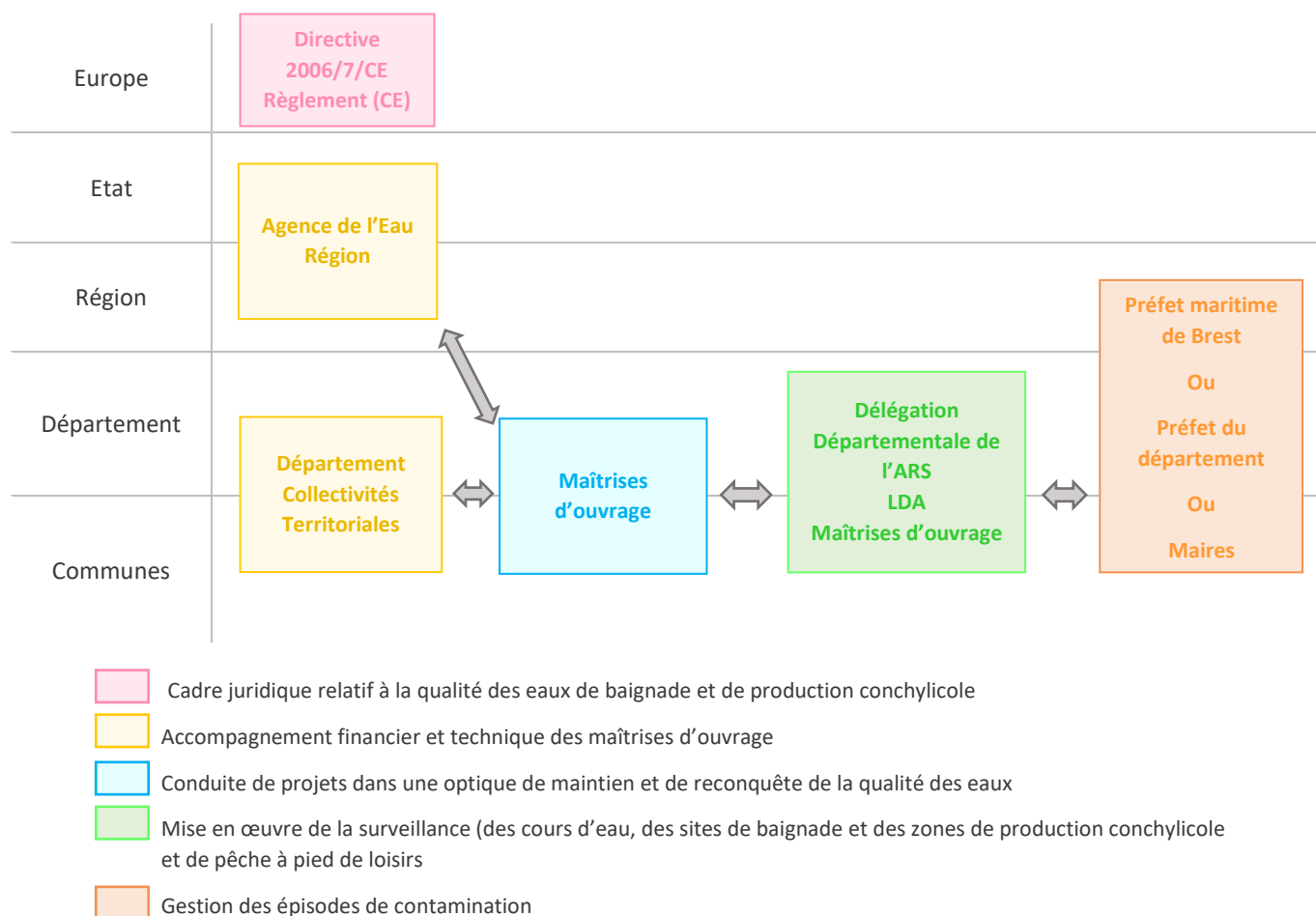


Figure 7. Acteurs impliqués dans la gestion de la qualité des eaux sur le territoire du Morbihan.

II. Objectifs de l'étude et méthodologie

1. Problématique et objectifs

La réduction des contaminations microbiologiques des sites de baignade, de production conchylicole et de pêche à pied récréative représente un enjeu majeur pour le littoral morbihannais, d'une part car la fermeture de ces sites peut fortement impacter l'économie locale, notamment le tourisme et l'activité conchylicole, et d'autre part car ces contaminations exposent les baigneurs et les consommateurs de coquillages à un risque sanitaire.

Les indicateurs de contamination fécale (la bactérie *E. coli* et les entérocoques intestinaux) permettent de détecter les pollutions microbiennes et d'évaluer la qualité des eaux et des coquillages. Cependant, leur utilisation ne fournit aucune information sur l'origine, humaine ou animale, des germes mis en cause (Pourcher et *al.* 2012). Ce renseignement est pourtant d'une importance primordiale pour cibler et hiérarchiser les actions à mettre en place sur le territoire afin de réduire les pollutions et estimer de façon plus précise le risque pour la santé humaine.

En France, des méthodes analytiques visant à identifier l'origine des contaminations des eaux ont été développées et commencent à être appliquées depuis une dizaine d'années par certains laboratoires d'analyse. Cependant, elles sont encore peu répandues et parfois méconnues par les maîtrises d'ouvrage en charge de la gestion de la qualité des eaux.

En tant qu'appui financier et technique de ces maîtrises d'ouvrage dans le département, le Conseil Départemental du Morbihan souhaite que ses contributions se traduisent par une efficacité et une efficience des mesures de gestion mises en œuvre sur le territoire dans le cadre de la réduction des pollutions microbiennes des eaux littorales. Cette étude a ainsi vocation à en savoir davantage sur ces nouvelles méthodes analytiques capables de discriminer les origines des contaminations, notamment sur leur principe de fonctionnement, leur mise en application et les résultats qu'elles permettent d'obtenir. Son principal objectif est de mettre en commun les connaissances existantes sur le sujet entre le monde de la recherche (qui développe les méthodes) et la sphère opérationnelle (qui applique les méthodes), principalement dans une démarche d'apport d'informations aux acteurs territoriaux. L'étude vise également à réaliser un état des lieux des pratiques mises en œuvre sur le territoire morbihannais afin de répondre aux questions suivantes :

- Quelles méthodes sont réellement applicables et appliquées par la sphère opérationnelle ?
- Comment et dans quel but sont-elles utilisées par les acteurs territoriaux ?
- Quels sont leurs principaux intérêts et leurs principales limites ?

Ce partage et cette mutualisation des expériences pourraient éventuellement conduire à une amélioration des mesures de lutte contre les pollutions appliquées par les maîtrises d'ouvrage ainsi qu'à une homogénéisation des modalités de mise en œuvre des méthodes d'identification à l'échelle du territoire, permettant la production de données agrégables et une meilleure valorisation des résultats, notamment *via* des synthèses départementales.

Il est toutefois important de préciser certains points quant au contenu de l'étude :

- Les origines des contaminations microbiennes des eaux et des coquillages peuvent être identifiées *via* d'autres moyens, notamment par la recherche des causes de pollution directement sur le terrain ou encore la réalisation de diagnostics territoriaux. Ces méthodes ne seront cependant pas abordées dans l'étude, qui se concentre uniquement sur les méthodes analytiques.
- Les méthodes étudiées ici permettent de déterminer l'origine des contaminations et non pas leur cause. Les résultats obtenus indiquent en effet si la pollution provient plutôt des humains ou des animaux, et éventuellement de quels types d'animaux. En revanche, ils ne permettent pas d'identifier le moyen par lequel les germes issus des déjections ont atteint les cours d'eau (par exemple, un mauvais traitement des effluents au niveau d'une station d'épuration donnée, une fuite d'un ouvrage de stockage de lisier/fumier sur un siège d'exploitation agricole, ...).
- Enfin, ces méthodes sont à bien distinguer des analyses d'*Escherichia coli*, qui visent uniquement à évaluer l'importance des contaminations microbiennes.

2. Démarche méthodologique

Afin de répondre aux objectifs de l'étude, une démarche méthodologique en 5 étapes a été mise en place, s'étalant du mois d'avril au mois de septembre 2018 ([Figure 8](#)).

- 1 Analyse du contexte et de la problématique
- 2 Recensement et description des méthodes d'identification existantes
- 3 Etat des lieux des méthodes appliquées par les maîtrises d'ouvrage
- 4 Analyse comparative des méthodes recensées
- 5 Formulations de recommandations à l'égard des acteurs territoriaux

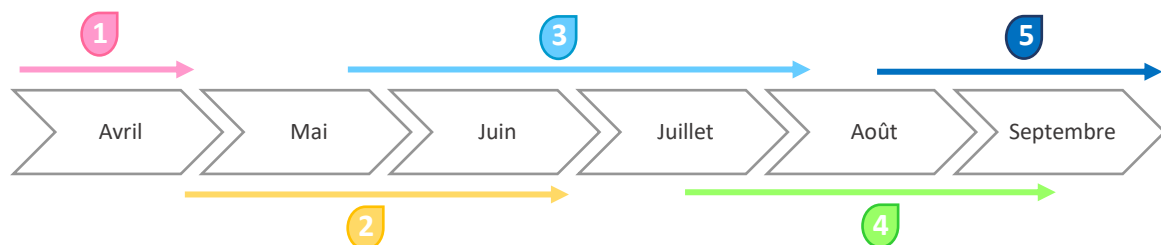


Figure 8. Calendrier prévisionnel simplifié de l'étude.

Etape 1 : Analyse du contexte et de la problématique

Cette étape s'est essentiellement appuyée sur des recherches bibliographiques. Son premier objectif était d'apporter une vision nette du sujet de l'étude ainsi que du contexte dans lequel elle se place. Elle visait globalement à répondre aux questions suivantes : qu'est-ce qu'une contamination bactériologique ? Quelles peuvent être ses origines ? Par quels moyens peut-elle atteindre les eaux littorales et les coquillages ? Quels sont les enjeux liés à ce type de contamination dans le département ? Quel cadre juridique encadre ces contaminations et les risques sanitaires qui leur sont associés ?

L'étape 1 visait également à bien définir la problématique et les objectifs de l'étude.

Etape 2 : Recensement et description des méthodes d'identification de l'origine des contaminations microbiologiques existantes

Cette étape avait pour objectif de réaliser un état de l'art de la recherche scientifique en ce qui concerne les principales méthodes de discrimination des origines des contaminations. Les informations relatives à ces méthodes ont été obtenues de deux façons :

- D'une part *via* un travail de recherche bibliographique.
- D'autre part à travers des entretiens avec les chercheurs ayant participé à leur élaboration (les chercheurs rencontrés au cours de l'étude sont répertoriés en [Annexe 2 : Personnes Ressources](#)).

Ces chercheurs ont été rencontrés en personne lorsque cela était possible. Si non, les entretiens étaient menés par téléphone. Ils portaient à la fois sur les méthodes validées par des phases expérimentales et les méthodes actuellement en cours de développement. Pour faciliter la discussion, une trame de questionnaire a été mise en place ([Annexe 3 : Trame d'entretien à destination des acteurs du monde de la recherche](#)) : envoyée aux chercheurs avant l'entretien, elle leur permettait éventuellement de prendre connaissance des différentes questions avant la rencontre/l'appel téléphonique. En plus de compléter les renseignements fournis par la bibliographie, cette démarche a notamment permis une meilleure compréhension du principe, des avantages et des limites de chaque méthode étudiée.

Etape 3 : Recensement et description des méthodes d'identification appliquées par les maîtrises d'ouvrage chargées de la gestion de la qualité de l'eau

Les informations concernant les méthodes d'identification réellement appliquées sur le terrain ont été récoltées directement auprès des acteurs de la sphère opérationnelle. En premier lieu, les recherches se sont concentrées sur les maîtrises d'ouvrage morbihannaises. Il est à noter que, l'étude portant sur les contaminations des eaux estuariennes et littorales, seuls les organismes dont le territoire d'action comporte une frange littorale ont été contactés.

Au vu du faible nombre de maîtrises d'ouvrage ayant mis en œuvre ce type d'analyses sur le territoire, les prospections ont ensuite été étendues aux départements limitrophes dans un premier

temps, principalement le Finistère et les Côtes d'Armor, puis à toute la France dans un second temps. Les coordonnées des contacts susceptibles d'avoir travaillé sur le sujet ont notamment été obtenues auprès du Service Eau du Conseil Départemental du Morbihan, du CSEM et des délégations départementales du Morbihan, du Finistère et des Côtes d'Armor de l'ARS. Les acteurs de la sphère opérationnelle ayant permis d'alimenter l'étude sont répertoriés en [Annexe 2 : Personnes Ressources](#).

Comme pour les acteurs du monde de la recherche, des entretiens ont été menés auprès des maîtrises d'ouvrages (entretiens physiques ou téléphoniques), avec envoi d'un questionnaire au préalable ([Annexe 4 : Trame d'entretien à destination des maîtrises d'ouvrage](#)). Ces entretiens avaient pour principal objectif la récolte d'informations concernant :

- Les modalités d'application des méthodes mises en œuvre par les acteurs du territoire, notamment le nombre de points de prélèvement, leur localisation ou encore la fréquence des prélèvements.
- La valorisation des résultats obtenus.
- Le ressenti des acteurs vis-à-vis de ces méthodes : répondent-elles à leurs attentes ? Quelles sont leurs principaux avantages ? Leurs principales limites du point de vue de l'applicabilité ?

Les acteurs interrogés ont tous accepté de fournir des cartes localisant les points de prélèvement ainsi que d'autres documents, notamment les rapports d'étude liés aux campagnes d'identification des origines des contaminations des eaux.

Les méthodes étudiées ici nécessitent toutes des compétences en techniques de laboratoire ainsi que du matériel d'analyse spécifique et souvent onéreux. Si les maîtrises d'ouvrage peuvent réaliser les phases de prélèvement et d'interprétation des résultats elles-mêmes, elles doivent faire appel à des laboratoires spécialisés pour l'analyse des échantillons. Des entretiens ont donc également été menés auprès de laboratoires d'analyse des eaux, notamment pour pouvoir estimer le nombre de prestataires potentiels des méthodes d'identification sur le territoire national. Un questionnaire a aussi été élaboré en vue de ces entretiens ([Annexe 5 : Trame d'entretien à destination des laboratoires d'analyse](#)).

Etape 4 : Analyse comparative des méthodes recensées et de leur mise en œuvre

Les différentes méthodes identifiées ont été comparées sur la base de leurs principaux avantages et inconvénients, déterminés principalement d'après la littérature et les entretiens menés auprès des acteurs du monde de la recherche.

L'application de ces méthodes par les maîtrises d'ouvrage a également été analysée, notamment afin de relever et de comprendre les différences existantes en termes de mode opératoire entre les divers acteurs interrogés.

Etape 5 : Formulation de recommandations à l'égard des acteurs territoriaux

L'analyse comparative des modalités d'application par les maîtres d'ouvrage a ensuite permis de tirer des grands enseignements quant à l'utilisation de ces méthodes et de formuler des recommandations/préconisations destinées à la fois aux acteurs du monde de la recherche et de la sphère opérationnelle.

III. Etat de l'art des différentes méthodes² d'identification de l'origine des contaminations microbiologiques des eaux et des coquillages

Les indicateurs de contamination fécale, la bactérie *Escherichia coli* et les entérocoques intestinaux, sont utilisés dans la réglementation pour évaluer le risque sanitaire lié à la baignade ou à la consommation de produits conchylicoles, et permettent de détecter et de quantifier l'importance des pollutions microbiennes dans les eaux et les coquillages (Figure 9). Cependant, ces bactéries sont présentes chez tous les mammifères et oiseaux (Gourmelon 2014) : elles n'apportent donc aucun renseignement quant à la provenance de ces contaminations.

Afin de pouvoir accéder à cette information, précieuse pour poser un diagnostic et le cas échéant, mettre en place des mesures correctives adaptées, des chercheurs ont développé des méthodes capables de renseigner sur l'origine des contaminations. Les méthodes identifiées dans le cadre de cette étude reposent sur la détection de Traceurs de Sources Microbiennes TSM (ou MST pour Microbial Source Tracking), soit des cibles microbiologiques ou chimiques retrouvées dans les effluents d'origine fécale (Gourmelon 2014) et spécifiques des déjections humaines ou animales (Pourcher et al. 2012, Jardé et al. 2018). Il est possible de distinguer les méthodes culture-dépendantes des méthodes culture-indépendantes. Certaines d'entre elles ont été validées par des phases expérimentales et sont maintenant utilisées par les maîtrises d'ouvrage, tandis que d'autres sont encore au stade de recherche et de développement (Figure 9).

² Opérationnelles ou en cours de développement

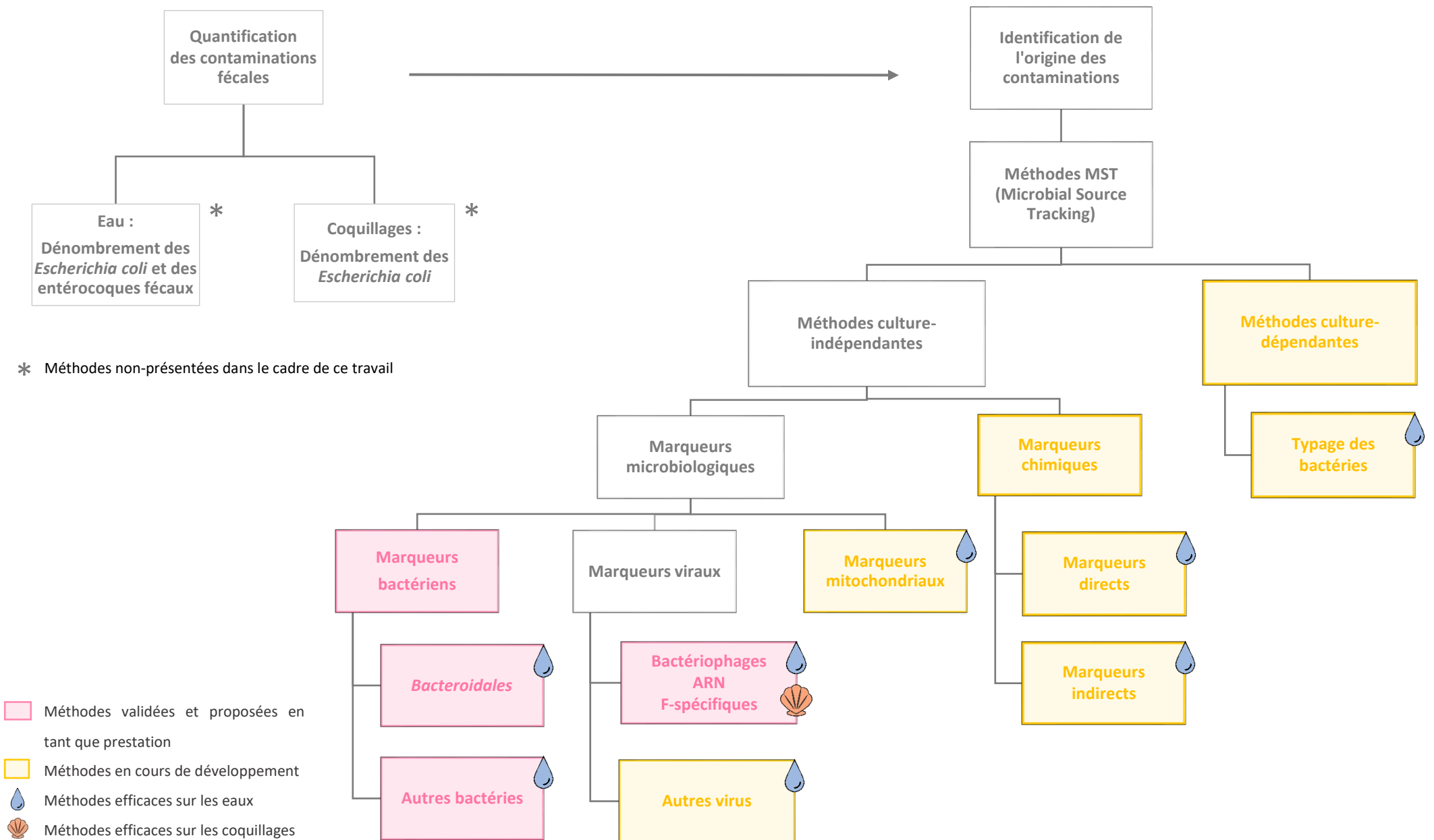


Figure 9. Méthodes d'identification de l'origine des contaminations applicables aux eaux, aux coquillages développées en France.

Il est important de souligner que les différentes méthodes présentées ici ne sont pas normalisées. Les modalités particulières de mise en œuvre à respecter en termes de prélèvement (nombre d'échantillons, ...), d'analyse ou d'exploitation des résultats ne font donc pas toujours l'objet de descriptions précises. Ainsi, cette partie III s'attachera avant tout à décrire le principe de fonctionnement, le mode d'analyse ainsi que les principaux avantages et les principales limites de chaque méthode. Dans la mesure du possible, les coûts liés aux analyses seront également indiqués.

Ces méthodes sont en principe applicables à toutes sortes de matrice contenant les marqueurs. Cependant, la plupart d'entre elles ne se montrent réellement efficaces que sur les eaux, et leur utilisation directement sur les coquillages fait encore l'objet de recherche et de développement (voir partie III.3.).

1. Les méthodes TSM culture-indépendantes

1.1. Les marqueurs microbiologiques

Les marqueurs microbiologiques ciblent l'ADN de bactéries, de virus ou encore de mitochondries. La recherche de ces éléments dans les échantillons de l'environnement est effectuée par amplification génique³ (Gourmelon 2014) et ne nécessite donc aucune étape de culture.

1.1.1. Les marqueurs bactériens : marqueurs *Bacteroidales* et autres marqueurs bactériens

a. Les marqueurs *Bacteroidales*

Principe

Les marqueurs *Bacteroidales* sont les marqueurs les plus connus et les plus utilisés. Les *Bacteroidales* constituent un ordre de bactéries anaérobies majoritaires du tractus digestif de l'Homme et des animaux à sang chaud, excepté les oiseaux (Gourmelon 2014). Leur intérêt réside dans le fait que certaines d'entre elles sont hôte-spécifiques, c'est-à-dire associées à des organismes bien précis, par exemple les hommes, les bovins, les porcins, etc. Les espèces (ou souches) de *Bacteroidales* hôte-spécifiques possèdent chacune des séquences d'ADN qui leur sont propres et qui permettent de les différencier. Ainsi, leur détection dans un prélèvement permet l'identification de l'origine d'une pollution.

L'analyse de ces marqueurs est réalisée *via* la technique de Réaction en Chaîne par Polymérase (PCR), qui permet d'obtenir un très grand nombre de copies d'une séquence d'ADN donnée (Source : Ifremer 2009). Sa mise en œuvre nécessite :

- L'ADN extrait de l'échantillon à tester ;
- Un couple d'amorces spécifiques de la séquence génomique d'intérêt ;
- Une ADN polymérase, enzyme permettant la synthèse de brins d'ADN ;
- Des nucléotides, constituants élémentaires de l'ADN.

Une analyse PCR se compose d'un certain nombre de cycles, eux-mêmes constitués de trois étapes :

- La première étape consiste à dénaturer l'ADN, c'est-à-dire séparer ses deux brins ;
- La deuxième permet l'hybridation des amorces sur les brins séparés ;

³ Amplification génique (ou PCR pour "Polymerase Chain Reaction") : technique permettant de recopier un fragment d'ADN de manière exponentielle (futura-sciences.com).

- Enfin, lors de la troisième étape, deux nouveaux brins d'ADN vont être créés à partir des amorces grâce à l'ADN polymérase (Figure 10).

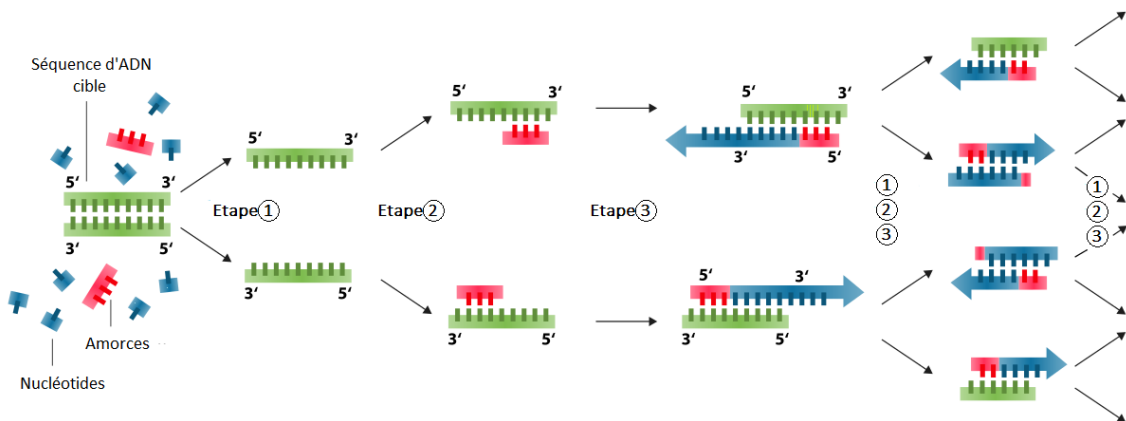


Figure 10. Schéma de principe de la Réaction en Chaîne par Polymérase (Source : réalisation personnelle à partir de smartbiolab.biotechno.org).

La répétition de n cycles de PCR permet la production de 2^n copies de la séquence d'ADN cible, et donc sa détection (Source : Ifremer 2009). Le résultat obtenu *via* la technique est ainsi qualitatif et indique la présence ou l'absence de la séquence cible, et donc de l'espèce de *Bacteroidales* recherchée dans l'échantillon de l'environnement.

En pratique, les marqueurs *Bacteroidales* sont plutôt analysés par PCR en temps réel (ou PCR quantitative qPCR). Cette technique, plus récente, repose sur le même principe que la PCR conventionnelle mais permet généralement d'obtenir des résultats quantitatifs. A la suite d'une qPCR, les séquences d'ADN cibles peuvent ainsi être :

- Quantifiées si leur concentration dans l'échantillon est supérieure à leur limite de quantification⁴ ;
- Détectées mais non-quantifiées si leur concentration est inférieure à leur limite de quantification mais supérieure à leur limite de détection⁵ ;
- Non-détectées si leur concentration est inférieure à leur limite de détection ou si elles sont tout simplement absentes de l'échantillon (Jadas-Hécart *et al.* 2012, Gourmelon 2014).

Les résultats quantifiés sont exprimés en nombre de copies (généralement en logarithme d'Unité Génomique UG) par volume d'eau analysé.

Le terme de "marqueurs" désigne en fait les amorces de PCR qui vont permettre le ciblage des séquences d'ADN recherchées⁶. Ces séquences correspondent le plus souvent à des gènes codant pour l'ARN ribosomique 16S, mais il peut également s'agir de gènes fonctionnels. Différents







⁴ Limite de quantification : concentration minimale à laquelle le paramètre recherché doit être présent dans l'échantillon pour pouvoir être quantifié avec une fidélité suffisante. Cette valeur varie selon les marqueurs.

⁵ Limite de détection : concentration minimale à laquelle le paramètre recherché doit être présent dans l'échantillon pour pouvoir être détecté. Cette valeur varie selon les marqueurs.

⁶ Dans la pratique, le terme "marqueur" peut également désigner directement la séquence d'ADN cible permettant l'identification de l'espèce de *Bacteroidales* en présence.

marqueurs ont été développés pour chaque hôte. A l'heure actuelle, il en existe une multitude, qui permettent notamment de distinguer les contaminations liées : aux hommes, aux ruminants (bovins, ovins, chamois, ...), aux porcs, aux chevaux, aux chiens, à la volaille, etc. (Tableau 4). Et d'autres sont encore en cours de développement (Gourmelon 2014).

Tableau 4. Exemples de marqueurs *Bacteroidales* (Source : Gourmelon 2014).

Cibles		Exemples de marqueurs
	Humains	HF183, BacHum, BsteriF1, BacH, ...
	Ruminants	BacR, Rum2Bac, ...
	Bovins	BacCow, CowM2, ...
	Porcins	Pig2Bac, PF163, PigBac1, ...
	Equins	HorseBac, HoF597, ...
	Canins	DogBact, BacCan, ...

Il existe également des marqueurs généraux qui ciblent l'ensemble des bactéries de l'ordre des *Bacteroidales* (Gourmelon 2014) : les plus courants sont les marqueurs AllBac et GenBac.

Principaux avantages des marqueurs *Bacteroidales* :

- Ils permettent de distinguer un panel très large d'origines de la contamination.
- Les *Bacteroidales* sont présentes en quantité importante dans les fèces de diverses origines (Blais et al. 2015).
- Les *Bacteroidales* ne peuvent pas se multiplier dans l'environnement : cette qualité est essentielle pour éviter tout de risque de biais des résultats d'analyse.
- Un certain nombre de marqueurs se montrent sensibles et spécifiques⁷. Pour valider les marqueurs, le Laboratoire Santé, Environnement et Microbiologie (LSEM) de l'Ifremer exige

⁷ Pour la recherche d'une contamination par un organisme-hôte donné :

- La **sensibilité** est évaluée par le nombre d'échantillons correctement identifiés comme étant contaminés par l'hôte divisé par le nombre total d'échantillons réellement contaminés. Elle peut être traduite par la formule suivante :

$$\text{Sensibilité} = \text{VP} / (\text{FN} + \text{VP}) \text{ (avec VP = Vrais Positifs et FN = Faux Négatifs)}$$

- La **spécificité** est évaluée par le nombre d'échantillons correctement identifiés comme n'étant pas contaminés par l'hôte divisé par le nombre total d'échantillons non-contaminés. Elle peut être traduite par la formule suivante :

$$\text{Spécificité} = \text{VN} / (\text{FP} + \text{VN}) \text{ (avec VN = Vrais Négatifs et FP = Faux Positifs)}$$

par exemple un pourcentage minimum de sensibilité et de spécificité de 90% (Source : entretien Michèle Gourmelon, 12/06/2018).

Cependant, il est important de préciser que la spécificité de ces marqueurs n'est souvent pas totale : en effet, le développement des *Bacteroidales* (et de la flore bactérienne en général) dans le tractus digestif des hommes et des animaux dépend en partie de leur alimentation. Par exemple, des chiens vivant dans des foyers humains vont développer les mêmes bactéries entériques que les hommes en partageant leur régime alimentaire (en consommant les restes de leur repas notamment). Il peut donc y avoir des échanges de bactéries entre organismes-hôtes (Source : entretien Amélie Charrier, 13/07/2018).

- Enfin, certains marqueurs sont applicables sur plusieurs sites. Cela constitue un avantage car beaucoup de marqueurs se montrent territoire-dépendants : ils peuvent ainsi s'avérer efficaces dans une région du monde et présenter des résultats peu probants dans une autre.

Principales limites des marqueurs *Bacteroidales* :

- En cas de contamination mixte, ils ne permettent pas d'estimer la contribution de chaque origine, et ce pour plusieurs raisons :
 - Il n'existe pas de stabilité en termes de concentration en *Bacteroidales* (et autres bactéries) entre les différents organismes-hôtes ;
 - Les différentes espèces/souches de *Bacteroidales* n'évoluent pas forcément de la même façon quand elles se trouvent hors de l'organisme ;
 - Les amorces utilisées pour identifier les diverses origines sont différentes et vont être détectées plus ou moins facilement lors de l'analyse PCR.

De ce fait, les résultats obtenus après analyse de différents marqueurs ne peuvent pas être comparés et ne permettent pas d'incriminer un hôte plus qu'un autre. En revanche, il est tout à fait possible de comparer l'importance d'une contamination liée à une même origine sur différents sites car les résultats reposent sur l'utilisation d'un même marqueur (Source : entretien Gaël Durand, 12/06/2018).

- Les *Bacteroidales* présentent une persistance relativement faible dans l'environnement car il s'agit de bactéries anaérobies : elles ne supportent pas l'oxygène et disparaissent donc très rapidement quand elles se trouvent en-dehors de l'organisme (Source : entretien Michèle Gourmelon, 12/06/2018). Leur survie dans le milieu naturel peut également être limitée par d'autres facteurs tels que la température, la salinité ou encore l'exposition à la lumière. Des études ont ainsi montré que certaines espèces de *Bacteroidales* persistaient moins longtemps dans l'environnement que les *Escherichia coli* et les entérocoques intestinaux (Ballesté & Blanch 2010, Gourmelon 2014).

(Source : Boehm et al. 2013).

Cependant, l'analyse des indicateurs de contamination fécale repose sur le dénombrement des bactéries viables et cultivables tandis que celle des marqueurs se base sur une recherche de l'ADN et prend donc en compte les bactéries cultivables, viables et non-cultivables et les bactéries mortes (Sources : Gourmelon 2014 ; entretien Gaël Durand, 12/06/2018). Le délai d'analyse des marqueurs *Bacteroidales* après prélèvement est ainsi légèrement plus important que celui de l'indicateur *E. coli* (Source : entretien Gaël Durand, 12/06/2018).

Il est important de souligner que les avantages et les limites varient cependant en fonction des marqueurs. En effet :

- Les différents marqueurs sont plus ou moins efficaces, notamment en termes de sensibilité et de spécificité.
- Ils sont également plus ou moins territoire-dépendants.

b. Les autres marqueurs bactériens

Principe

Sur le même principe, d'autres bactéries peuvent être utilisées pour discriminer l'origine des contaminations, par exemple :

- La bactérie *Catellibacterium marimammalium*, spécifique des déjections des oiseaux de bord de mer et des pigeons. Son utilisation est particulièrement pertinente car les *Bacteroidales* sont présentes en très faible quantité dans le tractus digestif de ces oiseaux. Les principaux marqueurs associés à cette bactérie sont les marqueurs Gull2 et LeeSeaGull (Boehm et al. 2013) ;
- La bactérie *Lactobacillus Amylovorus*, spécifique des déjections porcines (Source : entretien Michèle Gourmelon, 12/06/2018) ;
- Les bactéries du genre *Faecalibacterium* pour identifier les contaminations fécales liées aux volailles (Gourmelon 2014) ;
- Les bactéries du genre *Bifidobacteria*, spécifiques de l'Homme (Hartard 2017) ;
- Les Archaeobactéries.

Bien d'autres bactéries peuvent être utilisées dans le cadre du traçage de l'origine des contaminations. Cependant, elles sont généralement présentes en plus faible quantité que les *Bacteroidales* dans le tractus intestinal des animaux à sang chaud, excepté les oiseaux, ce qui limite leur détection lors d'une pollution fécale de l'environnement.

c. Synthèse de l'utilisation des marqueurs bactériens et préconisations des chercheurs

- Conditions de prélèvement et d'analyse des échantillons

L'échantillonnage doit être réalisé en conditions stériles, et les échantillons doivent être analysés le plus rapidement possible après prélèvement pour éviter tout biais des résultats.



Les chercheurs préconisent généralement de mettre en œuvre les analyses de marqueurs si la concentration en *Escherichia coli* dans les eaux est supérieure à 500 UFC/100 ml. Cette valeur seuil a été choisie pour deux raisons :

- Dans la réglementation relative à la qualité des eaux de baignade, il s'agit de la concentration-limite dont le dépassement entraîne un déclassement des eaux d'une "bonne qualité" vers une "qualité insuffisante" (Source : entretien Gaël Durand, 12/06/2018) ;
- Les chercheurs ont estimé qu'au-delà de cette concentration, il existait une probabilité suffisamment importante de détecter les marqueurs et ainsi, d'obtenir des résultats.

En-dessous de cette concentration, il est possible de réaliser des analyses mais le risque de ne pas détecter les marqueurs est significatif. De plus, les résultats obtenus seront moins fiables et présenteront une plus forte variabilité.

L'analyse de la concentration en *E. coli* par méthode culturale nécessite 48h afin d'obtenir un résultat. Pour être préservés, les échantillons destinés aux analyses de marqueurs peuvent alors être soumis à un pré-traitement puis être congelés à -80°C. Après 48h, les résultats du dénombrement de l'indicateur de contamination fécale permettent de lancer ou non les analyses de marqueurs. Les échantillons peuvent être conservés jusqu'à 1 an grâce au pré-traitement puisque les analyses sont basées sur la recherche d'ADN : le fait que les bactéries correspondantes soient mortes ou vivantes n'a donc pas d'importance (Source : entretien Gaël Durand, 12/06/2018).

➤ Bilan

	Principaux avantages 	Principaux inconvénients 
Marqueurs <i>Bacteroidales</i>	<ul style="list-style-type: none"> - Discrimination de nombreux organismes-hôtes - Présence en quantité importante dans les déjections - Pas de multiplication dans l'environnement - Bonne sensibilité et spécificité globales de la méthode 	<ul style="list-style-type: none"> - Pas de quantification de la contribution de chaque origine - Faible persistance dans l'environnement
Autres marqueurs bactériens	<ul style="list-style-type: none"> - Particulièrement avantageux pour détecter les contaminations liées aux oiseaux 	<ul style="list-style-type: none"> - Globalement, présence en plus faible quantité dans les déjections que les <i>Bacteroidales</i>

En 2011, une étude⁸, visant à évaluer l'efficacité de différents Traceurs de Sources Microbiennes, a été menée à l'échelle internationale : 41 méthodes⁹ ont ainsi été testées par 27 laboratoires à travers le monde, dont l'Ifremer en France (Boehm et *al.* 2013). Les échantillons analysés provenant de Californie, le caractère territoire-dépendant des différents marqueurs a également pu être évalué. L'étude a ainsi permis de mettre en avant certains marqueurs particulièrement performants :

- Les marqueurs humains HF183 et BacH ;
- Les marqueurs ruminants Rum2Bac et BacR ;
- Le marqueur porcin Pig2Bac ;
- Le marqueur des oiseaux de bord de mer goéland LeeSeaGull.

A l'heure actuelle, les marqueurs bactériens sont les seuls à être appliqués par la sphère opérationnelle (par le biais de laboratoires d'analyse) (voir partie [IV. Application des méthodes TSM par la sphère opérationnelle](#)). Cependant, la méthode est toujours en cours de développement, notamment pour pouvoir mettre en place de nouveaux marqueurs ciblant de nouveaux marqueurs-hôtes (rongeurs, ...).

➤ Coût des analyses

Le prix d'une analyse de marqueurs dépend des marqueurs utilisés et de leur nombre. Ainsi, pour une analyse par le laboratoire Labocéa, il faut compter entre 190 et 360 euros (si utilisation de l'ensemble des 8 marqueurs proposés) (Source : entretien Gaël Durand, 24/07/2018).

⁸ Evaluation SIPP (State of California Source Identification Pilot Project)

⁹ Une méthode correspondant à l'utilisation d'un traceur.

1.1.2. Les marqueurs viraux : Bactériophages ARN-F spécifiques et autres marqueurs viraux

a. Les bactériophages ARN F-spécifiques

Principe

L'origine des contaminations peut également être déterminée grâce au ciblage de virus, notamment les bactériophages ARN F-spécifiques. Il s'agit de virus qui envahissent spécifiquement les bactéries présentes dans le tube digestif. Il existe différents bactériophages, distincts par leur génogroupe¹⁰ (Ogorzaly 2009, Hartard 2017). L'identification de ce dernier, par génotypage, permet une meilleure caractérisation des pollutions fécales puisque :

- Les bactériophages des génogroupes I et IV ont tendance à indiquer une contamination d'origine animale.
- Les bactériophages des génogroupes II et III ont tendance à indiquer une contamination d'origine humaine.

Les phases d'échantillonnage et d'extraction des phages de la matrice ne sont pas normalisées, contrairement à l'étape de détection et de dénombrement des virus, réalisée *via* la méthode normalisée NF EN ISO 10705-1 (Source : entretien Christophe Gantzer, 30/05/2018). Cette dernière ne permet cependant pas de discriminer les différents génogroupes : pour cela, il faut y associer une méthode moléculaire. Les plages de lyse obtenues suite à l'application de la méthode NF EN ISO 10705-1 sont alors analysées par RT-PCR (Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction).

En effet, le matériel génétique des bactériophages ARN F-spécifiques est l'ARN, et non l'ADN : avant de pouvoir être analysés par PCR, ils vont donc être soumis à une étape préliminaire de rétro-transcription (RT), qui va permettre la synthèse d'un brin d'ADN complémentaire (ADNc) à partir de l'ARN viral. Ce brin d'ADNc va ensuite être amplifié par PCR (conventionnelle ou quantitative) (Ogorzaly 2009). Il est à noter que les phages peuvent également être analysés par RT-PCR sans avoir été isolés au préalable (Source : entretien Christophe Gantzer, 30/05/2018). La quantité de phages de chaque génogroupe présents dans les échantillons analysés permet ainsi de donner une orientation quant à l'origine (ou les origines) des contaminations.

Principaux avantages des bactériophages ARN F-spécifiques

- Il est peu probable que ces virus se multiplient dans l'environnement (Gantzer et *al.* 1998, Ogorzaly 2009).
- Ils présentent globalement une bonne persistance dans l'environnement : leur utilisation peut donc permettre de caractériser des pollutions relativement anciennes.
- Ils permettent d'estimer quelles origine contribue le plus à la contamination (en cas de pollution mixte).

¹⁰ Génogroupe : groupe de germes présentant des spécificités d'un point de vue génétique (Hartard 2017).

- La méthode d'analyse est facile d'application.
- Ils permettent de faire le lien avec la pollution virale : en effet, leur survie dans l'environnement est proche de celle des virus pathogènes humains (Source : entretien Christophe Gantzer, 30/05/2018). Ils représentent ainsi un indicateur de présence virale d'origine humaine et, contrairement à *Escherichia coli*, permettent d'apporter des précisions sur le risque sanitaire lié à la contamination.

Principales limites des bactériophages ARN-F spécifiques

- Ils ne permettent pas d'incriminer des animaux en particulier : en effet, les analyses de bactériophages ARN F-spécifiques indiquent uniquement si la contamination est plutôt d'origine animale ou plutôt d'origine humaine.
- Ils ne présentent pas une bonne spécificité, notamment les bactériophages des génogroupes I et II : en effet, s'ils sont globalement plus présents dans les effluents d'origine animale, les bactériophages de génogroupe I peuvent également être retrouvés dans les effluents d'origine humaine, et inversement pour les bactériophages de génogroupe II (Sources : entretien Christophe Gantzer, 30/05/2018). Ils ne permettent donc pas une discrimination stricte de l'origine de la contamination. Leur utilisation vise plutôt à donner des orientations.
- Les bactériophages des différents génogroupes ne sont pas aussi résistants les uns que les autres : en effet, les bactériophages I et II persistent généralement plus longtemps dans l'environnement. Cette survie variable des phages influe ainsi sur leurs concentrations respectives et peut contribuer à biaiser les résultats des analyses en cas de contamination ancienne (Hartard 2017).

b. Les autres marqueurs viraux

Principe

De nombreux autres virus peuvent être utilisés pour identifier l'origine (humaine ou animale) des contaminations (Ogorzaly 2009), comme par exemple :

- Les phages de *Bacteroides* (notamment de *Bacteroides fragilis*) : ces phages infectent les bactéries du genre *Bacteroides*, spécifiques de certains organismes-hôtes. Ils présentent ainsi une meilleure spécificité que les bactériophages ARN-F spécifiques (Sources : entretien Christophe Gantzer, 30/05/2018 ; Hartard 2017).
- Les polyomavirus
- Les adénovirus (humains, bovins, porcins et ovins) (Ogorzaly 2009, Hartard 2017).
- Les entérovirus
- Les norovirus I et II : ces germes ne sont cependant présents dans les déjections que lorsque des individus sont malades, ce qui limite leur efficacité.

Cependant, la détection de ces virus est généralement plus complexe que celle des bactériophages ARN F-spécifiques car elle nécessite des méthodes de détection cellulaire lourdes (Source : entretien Christophe Gantzer, 30/05/2018).



Remarque : la discrimination de l'origine humaine ou animale des contaminations peut également s'appuyer sur le calcul de ratios des concentrations de différents virus (par exemple, coliphages somatiques et phages de *Bacteroides*) (Yahya et al. 2017).

c. Synthèse de l'utilisation des marqueurs viraux et préconisations des chercheurs

➤ Conditions de prélèvement et d'analyse des échantillons

Pour l'application des marqueurs de bactériophages ARN F-spécifiques, aucune concentration minimale en *Escherichia coli* n'est requise dans la matrice, et ce notamment car les phages sont globalement plus résistants dans l'environnement que l'indicateur de contamination fécale : ainsi, en cas de pollution, les échantillons contiendront probablement plus de phages que de *E. coli* (Source : entretien Christophe Gantzer, 30/05/2018).

➤ Bilan

	Principaux avantages 	Principaux inconvénients 
Bactériophages ARN F-spécifiques	<ul style="list-style-type: none"> - Bonne persistance globale dans l'environnement - Facilité d'application de la méthode - Indication de la pollution virale 	<ul style="list-style-type: none"> - Discrimination Homme/Animal uniquement - Spécificité globale médiocre - Possibilité de biais des résultats du fait d'une résistance variable des phages dans l'environnement
Autres marqueurs viraux	<ul style="list-style-type: none"> - Meilleure spécificité que les bactériophages ARN-F spécifiques (en général) - Détection d'un certain nombre d'organismes-hôtes (pour certains) 	<ul style="list-style-type: none"> - Application complexe de la méthode

➤ Coût des analyses

L'analyse des phages ARN F-spécifiques est proposée par le plateau technique du LCPME, dont les tarifs sont les suivants :

Prestation	Prix unitaire (HT)	
	Pour un organisme public	Pour un organisme privé
• Détection spécifique des phages dans les eaux et les huîtres	145 €	290 €
• Quantification des <u>4 génogroupes</u> de phages dans les eaux et les huîtres	377 €	928 €
• Quantification <u>d'un génogroupe</u> de phages à partir d'ARN	58 €	140 €

Remarque : Il semble donc que ce soit l'étape d'extraction et de concentration de l'ARN contenu dans les matrices qui rend l'application de la méthode si onéreuse, et pas l'analyse en elle-même.

1.1.3. Les marqueurs mitochondriaux

Principe

Les marqueurs mitochondriaux sont encore en cours de développement dans le cadre, par exemple, du projet BacTrac (voir partie [IV.1. Transfert de connaissances du monde de la recherche vers la sphère opérationnelle](#)). Ces marqueurs ciblant l'ADN mitochondrial des cellules eucaryotes présentent un grand intérêt car les cellules épithéliales qui composent la paroi de l'intestin sont retrouvées en grande quantité dans les fèces.

L'ADN mitochondrial est similaire chez tous les animaux d'un point de vue structurel ([Figure 11](#)) mais il existe des différences génétiques entre les espèces qui permettent de les différencier (Blais 2014). Les marqueurs mitochondriaux sont ainsi capables de cibler une multitude d'espèces animales.

La méthode est basée sur le même principe que celle des marqueurs bactériens : des amorces de PCR sont développées pour permettre l'amplification et donc la détection de séquences spécifiques du génome mitochondrial, conduisant ainsi à l'identification des organismes associés, à l'origine de la pollution. Les analyses sont réalisées par qPCR et permettent l'obtention de résultats exprimés en nombre de copies d'ADN/volume d'eau.

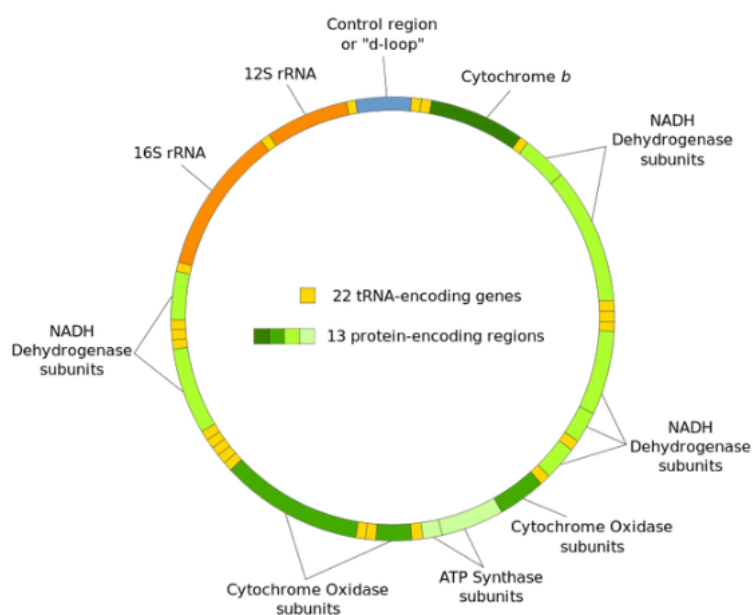


Figure 11. Structure du génome mitochondrial humain (Source : Blais 2014).

L'ADN mitochondrial est préféré à l'ADN génomique pour deux raisons principales :

- Premièrement, lors de l'apoptose¹¹ de la cellule, l'ADN génomique est détruit beaucoup plus rapidement que l'ADN mitochondrial.
- Deuxièmement, chaque cellule possède entre 7 000 et 22 000 copies de l'ADN mitochondrial, ce qui facilite sa détection (Blais 2014).

¹¹ Apoptose : mort cellulaire.

Principaux avantages des marqueurs mitochondriaux :

- Ils présentent une grande spécificité car l'ADN mitochondrial est propre à chaque espèce animale (Blais et *al.* 2015).
- Ils permettent le ciblage d'espèces précises (et non de groupes d'espèces).
- L'ADN mitochondrial est présent dans l'organisme de tous les animaux, contrairement aux bactéries et aux virus, qui peuvent être absents chez certaines espèces (par exemple, les *Bacteroidales* sont généralement trouvées en très faible quantité dans le tractus digestif des oiseaux).
- La concentration en ADN mitochondrial dans les fèces est assez stable d'une espèce à l'autre, ce qui pourrait éventuellement permettre d'estimer la contribution de chaque origine de contamination en cas de pollution mixte ou au moins, à défaut d'un résultat précis, d'indiquer quelle est l'origine la plus contributrice (ce point reste cependant à développer) (Source : entretien Amélie Charrier, 13/07/2018).

Principales limites des marqueurs mitochondriaux :

- Ils sont présents en plus faible quantité dans les fèces que les marqueurs *Bacteroidales* par exemple (Gourmelon 2014, Blais et *al.* 2015), et sont ainsi plus difficiles à détecter lors d'une pollution fécale de l'environnement.
- La présence d'ADN mitochondrial dans l'environnement n'indique pas forcément une contamination fécale car les cellules peuvent ne pas être d'origine intestinale : elles peuvent par exemple provenir du cuir chevelu, etc. (Blais et *al.* 2015).
- En cas de consommation de produits d'origine animale (notamment la viande), l'Homme peut excréter des cellules issues de l'animal en question (Gourmelon 2014) : par exemple, une consommation de porc par les hommes entraînera la présence de traces d'ADN porcin dans les déjections humaines, etc. Cependant, ces traces émettent un signal très faible lors de l'analyse par PCR et ne semblent donc pas constituer un problème majeur (Source : entretien Amélie Charrier, 13/07/2018).

Synthèse de l'utilisation des marqueurs mitochondriaux et préconisations des chercheurs



➤ Conditions de prélèvement et d'analyse des échantillons

Tout comme pour les marqueurs bactériens, les chercheurs préconisent de réaliser les analyses de marqueurs mitochondriaux si la concentration en *Escherichia coli* dans les eaux est supérieure à 500 UFC/100 ml. Cette valeur devrait en effet permettre une bonne détection des marqueurs (même si leur concentration n'est pas corrélée à la concentration en *E. coli* dans les eaux) (Source : entretien Amélie Charrier, 13/07/2018).

La méthode étant encore en cours de développement, un certain nombre de règles relatives à l'exploitation des résultats restent à définir (Source : entretien Amélie Charrier, 13/07/2018), notamment :

- Le nombre de copies d'ADN nécessaire pour qu'un résultat d'analyse soit considéré comme fiable (il faudra déterminer un nombre pour chaque marqueur).
- Ou encore, le nombre d'analyses minimum à réaliser par point de prélèvement pour permettre une bonne interprétation des résultats.

➤ Bilan

	Principaux avantages 	Principaux inconvénients 
Marqueurs mitochondriaux	<ul style="list-style-type: none"> - Détection d'espèces précises d'organismes-hôtes - Grande spécificité - Présence chez <u>tous</u> les animaux - Quantification de la contribution de chaque origine <u>envisageable</u> 	<ul style="list-style-type: none"> - Présence en plus faible quantité dans les déjections

➤ Coût des analyses

Le prix d'une analyse de marqueurs mitochondriaux n'a pour l'instant pas encore été défini.

1.2. Les marqueurs chimiques

Principe

Les origines des contaminations microbiologiques peuvent également être identifiées *via* la détection de composés chimiques dans les matrices à analyser. Il est possible de distinguer deux grandes catégories de marqueurs chimiques :

- Les marqueurs directs. Il s'agit de composés naturellement produits et sécrétés par les organismes. Les plus utilisés sont les stanols fécaux, composés constitutifs des déjections.
- Les marqueurs indirects. Ces éléments sont utilisés pour identifier les contaminations d'origine humaine et peuvent être :
 - o Des composés ingérés, par exemple, la caféine, le tabac ou encore les produits pharmaceutiques.
 - o Des composés générés par les activités anthropiques tels que les détergents, les agents blanchissants, les parfums, les additifs alimentaires, etc.

Ces marqueurs chimiques sont principalement détectés par chromatographie (en phase liquide ou gazeuse) et spectrométrie de masse.

- La chromatographie est une technique visant à séparer des substances chimiques présentes dans un mélange, qui peut être liquide ou gazeux.
- La spectrométrie de masse est une technique d'analyse permettant la détermination de la masse, l'identification ainsi que la quantification d'éléments chimiques (Menet 2011).

➤ Les marqueurs chimiques directs

Les principaux marqueurs directs sont les stanols fécaux. Ces molécules, retrouvées dans les déjections, sont formées dans le système digestif à partir des stérols, composés ingérés par les organismes *via* leur alimentation. Chez les animaux, le stérol majoritaire est le cholestérol (Derrien 2011). La transformation des stérols en stanols implique le remplacement d'une double liaison par un groupement Hydrogène : en fonction des germes présents dans le tube digestif et du régime alimentaire, ce groupement H peut être placé de diverses façons, conduisant à la formation de stanols différents. Ainsi, à partir d'un stérol, il est possible d'obtenir quatre stanols distincts (Figure 12) (Source : entretien Emilie Jardé, 11/06/2018).

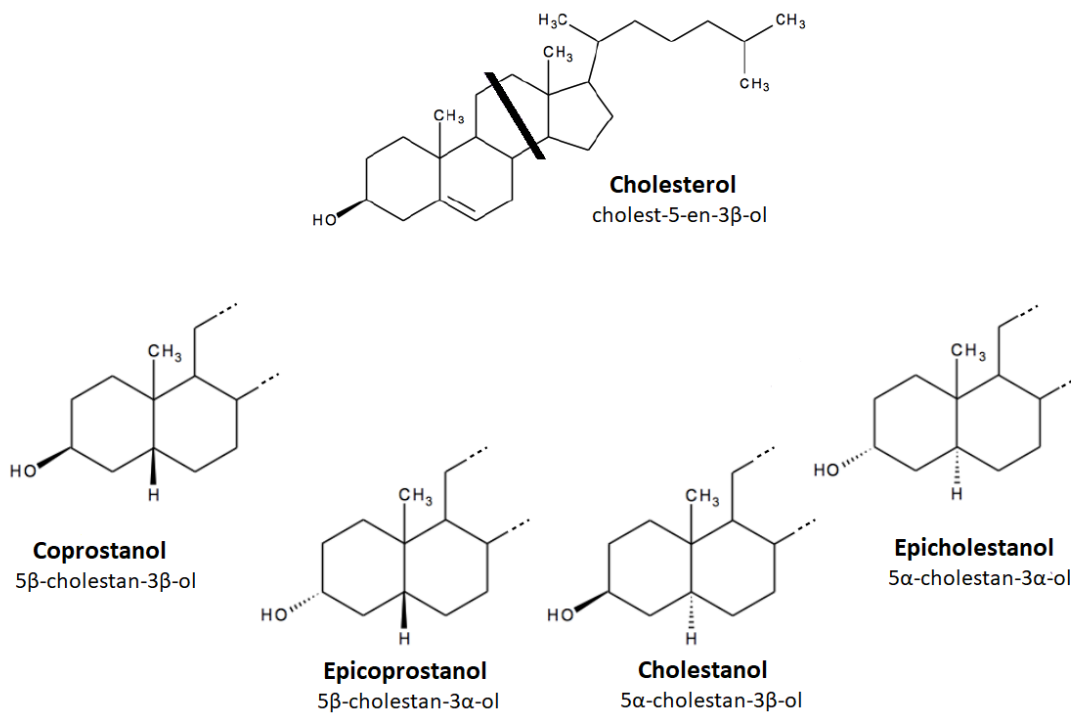


Figure 12. Exemples de stanols formés à partir d'une molécule de cholestérol (Source : Derrien 2011).

L'"empreinte stanols" (ou "profil de stanols") des déjections diffère selon les organismes-hôtes, comme le montre la **Figure 13**. L'origine d'une contamination peut ainsi être déterminée par analyse de l'abondance de différents stanols dans les eaux polluées, puisque la distribution de ces molécules est propre à chaque type d'effluent. $\beta\alpha$

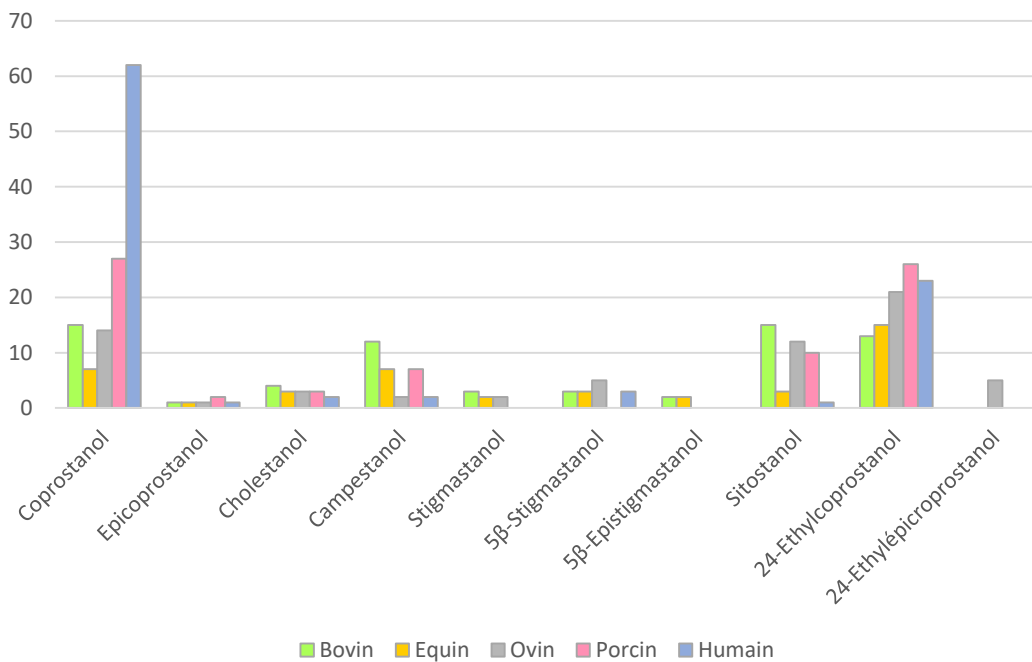


Figure 13. Exemple de distribution (en %) de différents stanols dans les déjections de cinq espèces (Source : Derrien 2011, d'après Leeming et al. 1996).

L'analyse nécessite de quantifier au moins 6 stanols. Pour ce faire, les échantillons subissent tout d'abord une série de traitements visant à isoler les molécules, comprenant une étape de filtration, une étape d'extraction sur phase solide et une étape d'élution avec un solvant organique (Source : entretien Emilie Jardé, 11/06/2018). Afin de pouvoir identifier et quantifier les molécules, des standards sont ajoutés dans les échantillons de départ. Les composés sont ensuite analysés par chromatographie (en phase liquide ou gazeuse) et spectrométrie de masse, ce qui conduit à l'obtention d'un graphique représentant la distribution des stanols dans les différents échantillons étudiés.

Les différentes distributions de stanols obtenues sont ensuite exploitées *via* l'application d'une Analyse en Composantes Principales (ACP), une méthode de traitement statistique permettant l'analyse de données complexes présentant un nombre important de variables quantitatives, et leur représentation graphique dans un espace à deux dimensions (Derrien 2011, Pourcher *et al.* 2012) (Figure 14). Cette méthode permet d'identifier trois pôles, associés aux origines humaine, porcine et bovine, et chaque échantillon analysé est représenté par un point appartenant à l'un de ces trois pôles. Un point situé entre les pôles désigne une pollution d'origine mixte : dans ce cas, le pourcentage de contribution de chaque origine peut être déterminé par application d'une équation de mélange.

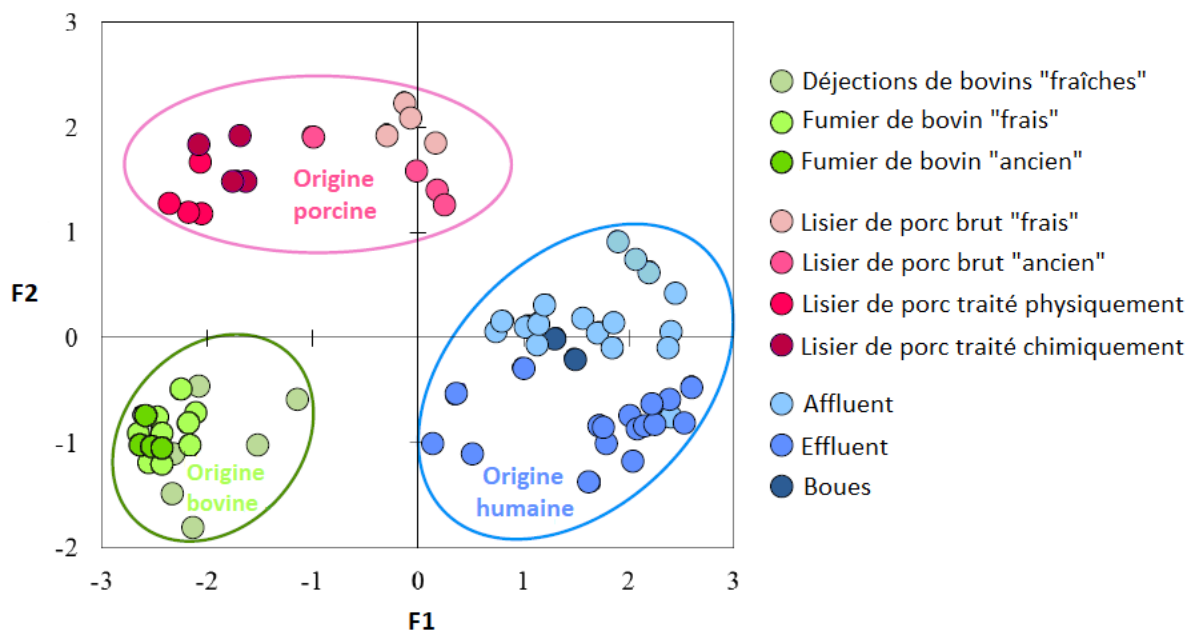


Figure 14. Exemple de graphique obtenu suite au traitement par ACP des distributions de stanols dans des échantillons d'origine connue (Source : Derrien 2011).

Cette méthode fait actuellement l'objet de projets de recherche (Source : entretien Emilie Jardé, 11/06/2018) puisqu'il semblerait que, pour une même origine, les abondances en stanols diffèrent en fonction de la nature des effluents, par exemple des déjections brutes, compostées, etc. L'utilisation de ces composés pourrait donc potentiellement permettre un apport d'informations non-négligeable quant à la provenance exacte des pollutions.

Remarque : l'origine des contaminations peut aussi être estimée grâce au calcul de ratios de molécules contenues dans les matrices polluées, en particulier les stérols et les stanols. Cependant, la spécificité de cette méthode a été remise en cause, notamment du fait d'une mauvaise distinction entre les origines bovine et porcine (Derrien et *al.* 2012 , Blais et *al.* 2015).

Les acides biliaires, retrouvés dans les déjections, peuvent également être utilisés pour déterminer la provenance des pollutions. Cependant, leur extraction et leur analyse sont plus coûteuses, plus complexes et plus longues que celles des stanols, avec une perte d'environ 70% des molécules lors de l'analyse. De plus, les informations issues de l'étude de ces molécules ne sont pas probantes (Source : entretien Emilie Jardé, 11/06/2018).

➤ Les marqueurs chimiques indirects

Comme expliqué précédemment, les origines de contamination peuvent également être identifiées *via* la recherche de marqueurs indirects dans les eaux, qui peuvent être :

- Des composés (naturels ou de synthèse) ingérés par les organismes et excrétés dans leurs fèces du fait d'une métabolisation incomplète au sein du tractus digestif, comme par exemple la caféine, les dérivés du tabac, les additifs alimentaires ou encore les produits pharmaceutiques (diclofenac, ibuprofen, carbamazépine, ...) dans le cas de contaminations d'origine humaine.
- Des composés (de synthèse) associés aux eaux usées des stations d'épuration, comme les produits d'hygiène et d'entretien, les parfums, etc. (Jadas-Hécart et *al.* 2012, Derrien 2011). Leur présence dans l'environnement permet de conclure à une pollution d'origine humaine.

Principaux avantages des marqueurs chimiques

- Les composés chimiques ne peuvent pas se multiplier dans l'environnement, ce qui est un critère essentiel pour constituer un bon traceur.
- L'utilisation des stanols fécaux peut permettre d'estimer la contribution de chaque origine de contamination en cas de pollution mixte (Source : entretien Emilie Jardé, 11/06/2018).
- En théorie, l'utilisation des stanols pourrait permettre de discriminer de nombreuses origines de pollution (même si, pour l'instant, seules les méthodes permettant de distinguer les origines humaine, bovine et porcine ont été validées) (Source : entretien Emilie Jardé, 11/06/2018).

Principaux inconvénients des marqueurs chimiques



- Les méthodes basées sur l'analyse de composés chimiques nécessitent un matériel analytique spécifique et onéreux, notamment un chromatographe et un spectromètre. Elles ne sont donc pas facilement exportables. De plus, ces analyses sont plus longues et plus complexes à mettre en œuvre que les analyses par PCR (Source : entretien Emilie Jardé, 11/06/2018).
- Les concentrations minimales permettant la quantification des marqueurs dans les échantillons (limites de quantification) sont globalement plus importantes pour les marqueurs chimiques que pour les marqueurs microbiologiques (*Bacteroidales*, ...): ainsi, pour pouvoir être quantifiés, les composés chimiques doivent être présents à des taux relativement élevés dans l'environnement. Par ailleurs, il faut qu'au moins 6 stanols différents soient quantifiés dans les prélèvements pour que l'analyse soit probante et apporte des résultats fiables.
- L'interprétation des résultats est également complexe et nécessite l'établissement d'une base de données importante.

Synthèse de l'utilisation des marqueurs chimiques et préconisations des chercheurs

➤ Conditions de prélèvement et d'analyse des échantillons

Le prélèvement doit être réalisé en conditions stériles et les échantillons doivent être conservés à basse température (entre 4°C et 8°C). Les étapes de filtration et d'extraction des composés chimiques doivent être effectuées le plus rapidement possible (moins de 48h) après le prélèvement afin d'éviter que leur concentration ne soit affectée par les bactéries présentes dans les échantillons, qui continuent d'évoluer.

➤ Bilan

	Principaux avantages 	Principaux inconvénients 
Stanols fécaux	<ul style="list-style-type: none">- Absence de multiplication des marqueurs dans l'environnement- Quantification de la contribution de chaque origine possible- Discrimination de nombreuses origines (en théorie)	<ul style="list-style-type: none">- Mise en œuvre de la méthode relativement longue et complexe- Quantification des stanols plus limitée que celle des marqueurs microbiologiques en général-Dépendance à une base de données

➤ Coût des analyses

Aucun laboratoire prestataire ne semble proposer d'analyser des composés chimiques dans le cadre du Traçage des Sources Microbiennes. Néanmoins, certains organismes de recherche peuvent réaliser des prestations sur demande des gestionnaires. A titre d'exemple, une analyse de stanols par le CNRS (comprenant le traitement de l'échantillon et son analyse au sens propre) coûte entre 36 et 120 euros selon le caractère public ou privé de l'organisme demandeur. De façon générale, les organismes de recherche restent cependant rarement sollicités pour ce genre de prestations, qui ne constituent pas leur activité principale.

2. Les méthodes TSM cultures-dépendantes : le typage des bactéries

Principe

Les méthodes culture-dépendantes sont les premières à avoir été développées en vue d'identifier l'origine des contaminations fécales dans les matrices polluées (Blais et *al.* 2015). Elles reposent principalement sur l'étude des communautés bactériennes (Gourmelon 2014) présentes dans les effluents contaminés.

Dans le cadre du projet BacTrac, actuellement en cours (voir partie [IV.1. Transfert de connaissances du monde de la recherche vers la sphère opérationnelle](#)), les chercheurs ont justement travaillé sur le développement d'une méthode de typage des bactéries : cette méthode consiste à isoler des bactéries issues d'échantillons de l'environnement et à les génotyper, afin de permettre la visualisation d'un spectre de bande (ou "code-barre") par bactérie (Jadas-Hécart et *al.* 2012). Ces empreintes génétiques, obtenues par séparation de fragments d'ADN, sont ensuite comparés à celles issues d'échantillons de référence, soit des fèces dont l'origine est connue. La méthode implique ainsi de collecter des bactéries de diverses origines afin de constituer une "souchothèque" permettant la comparaison : à titre d'exemple, la "souchothèque" établie dans le cadre du projet BacTrac comprend entre 5000 et 6000 souches bactériennes différentes. Les bactéries cibles sont essentiellement des *Escherichia coli* et des entérocoques (Source : entretien Isabelle Vitte, 24/07/2018).

L'isolement des bactéries sur des géloses chromogènes β -oxydase (qui vont mettre en évidence les colonies bactériennes en les colorant) permet d'obtenir 24 isolats par échantillon (Source : entretien Isabelle Vitte, 24/07/2018), chacun correspondant à une origine de contamination. Cependant, l'interprétation des résultats est basée sur la notion de "souche majoritaire" : ainsi, la seule origine retenue et désignée comme responsable de la pollution sera celle de la souche prédominante. Le résultat obtenu par l'application de cette méthode est donc qualitatif et non quantitatif.

A l'échelle internationale, le développement des méthodes culture-dépendantes a été abandonné. En France, les recherches ont également été arrêtées pour le moment car la méthode n'est pas assez probante et ne seront probablement pas reprises (Source : entretien Isabelle Vitte, 24/07/2018).

Principaux avantages de la méthode de typage

- Le principal avantage de la méthode est qu'elle permet, en théorie, de rechercher n'importe quelle origine de contamination. En effet, pour savoir si une espèce est responsable d'une pollution fécale des eaux sur un site, il suffit en effet d'échantillonner les déjections de cette espèce, d'isoler et de génotyper les bactéries qu'elles contiennent et de comparer les résultats à ceux des échantillons de l'environnement (Source : entretien Isabelle Vitte, 24/07/2018). Cette méthode pourrait ainsi permettre de discriminer un panel beaucoup plus vaste d'origines de contamination que les autres méthodes de traçage.

Principales limites de la méthode de typage



- La méthode est lourde en termes de temps de mise en œuvre et nécessite la collection d'un grand nombre de souches bactériennes (Sources : entretien Isabelle Vitte, 24/07/2018 ; Gourmelon 2014, Blais et *al.* 2015).
- Du fait de l'étape de culture, la méthode ne s'appuie que sur la détection des bactéries facilement cultivables, ce qui peut induire un biais dans la représentation de la population microbienne présente dans la matrice (Blais et *al.* 2015).
- La méthode ne permet pas d'estimer la contribution des différentes origines dans le cas d'une pollution mixte (seule une origine peut d'ailleurs être identifiée par échantillon) (Source : entretien Isabelle Vitte, 24/07/2018).
- Le traitement statistique des résultats est assez complexe : notamment, la méthode statistique qui permettrait une interprétation la plus fiable possible des résultats n'a pas encore été déterminée (Sources : entretien Isabelle Vitte, 24/07/2018 ; Blais et *al.* 2015).

Synthèse de l'utilisation des marqueurs chimiques et préconisations des chercheurs

➤ Conditions de prélèvement et d'analyse des échantillons

Comme pour les autres marqueurs, les prélèvements doivent être réalisés en conditions stériles et il a été décidé que la méthode ne devait être appliquée qu'en cas de dépassement de la concentration seuil en *E. coli* de 500 UFC/100 ml (Source : Isabelle Vitte, 24/07/2018).

➤ Bilan

	Principaux avantages 	Principaux inconvénients 
Méthode de typage des bactéries	- Discrimination de tous les organismes-hôtes possible (en théorie)	- Mise en œuvre longue - Dépendance à une base de données de souches bactériennes de référence - Manque de spécificité des résultats - Identification d'une seule origine par échantillon - Traitement statistique des résultats complexe

➤ Coût des analyses

Le prix d'une analyse par méthode de typage n'a pas été défini. La méthode est longue à mettre en œuvre mais n'implique cependant pas l'utilisation de matériel analytique lourd : les analyses par typage des bactéries pourraient donc vraisemblablement coûter moins cher que les analyses par PCR.

3. Applicabilité dans les eaux et les coquillages

En théorie, les méthodes citées précédemment sont applicables à tous types de matrice : eau (eau douce et eau de mer), coquillages et sédiments. Cependant, leur utilisation sur les coquillages ne conduit pas forcément à l'obtention de résultats probants.

- En effet, des expériences menées notamment par le LSEM ont montré que les marqueurs bactériens étaient rarement détectés dans les coquillages (Sources : Gourmelon 2014 ; entretien Catherine Ponthoreau, 18/06/2018). Cette faible sensibilité de la méthode s'explique principalement par un problème de rendement lors de la phase d'extraction de l'ADN des bactéries puisque, contrairement à l'eau, les coquillages constituent une matrice chargée, contenant des molécules inhibitrices de PCR qui peuvent perturber l'analyse (Source : entretien Gaël Durand, 12/06/2018). Afin de minimiser l'impact de ces molécules, les échantillons doivent être dilués. Cependant, cette dilution entraîne également une diminution de la concentration en marqueurs, qui est alors souvent inférieure à la valeur seuil permettant leur détection par PCR (Source : entretien Michèle Gourmelon, 12/06/2018).

Récemment, le laboratoire Labocéa a cependant mis en place des prestations d'analyse de marqueurs bactériens dans les huîtres. Ces analyses, réalisées dans la chair et le liquide intervalvaire des huîtres, semble permettre l'obtention de résultats satisfaisants. Néanmoins, le laboratoire continue à mener des essais en parallèle pour conforter et optimiser la méthode d'une part, et pour développer des méthodes applicables aux autres coquillages d'autre part (Source : entretien Gaël Durand, 12/06/2018).

- La recherche des stanols dans les coquillages n'a pas non plus amené de résultats concluants.
- En revanche, les virus entériques humains et les bactériophages, recherchés par RT-PCR, semblent être détectés plus facilement dans les coquillages et ainsi permettre une bonne discrimination des origines humaine et animale des contaminations les affectant (Source : Hartard 2017).
- Enfin, en ce qui concerne les marqueurs mitochondriaux, développés dans le cadre du projet BacTrac, ils n'ont pour l'instant été testés que sur les eaux. Cependant, des développements supplémentaires visant à les appliquer sur d'autres types de matrice pourraient éventuellement être envisagés par les organismes de recherche s'il existe une demande de la part des acteurs territoriaux (Source : entretien Amélie Charrier, 13/07/2018).

4. Synthèse de l'analyse comparative des différentes méthodes TSM

Les différents avantages et inconvénients identifiés pour chaque méthode décrite permettent d'établir le profil de la méthode idéale, qui devrait ainsi :

- Se montrer sensible et spécifique ;
- Reposer sur la détection de cibles persistantes et qui ne se multiplient pas dans l'environnement ;
- Discriminer de façon précise les organismes à l'origine des pollutions et être capable d'estimer la contribution de chacun d'eux ;
- Etre facile et rapide d'application, abordable en termes de coût et ne pas nécessiter la constitution d'une base de données de référence ;
- Se montrer efficace pour l'analyse de matrices autres que l'eau, notamment les coquillages.

Les méthodes inventoriées dans le cadre de cette étude ont donc été comparées sur la base de tous ces critères, d'après les informations recueillies par l'étude bibliographique et les entretiens menés auprès des chercheurs (Tableau 5. Tableau simplifié des avantages et limites des différentes méthodes identifiées dans le cadre de cette étude.). Afin de simplifier le tableau, les marqueurs bactériens, viraux et chimiques seront respectivement représentés par les *Bacteroidales*, les bactériophages ARN F-spécifiques et les stanols fécaux, car il semble que ces marqueurs soient les plus utilisés.

Il est toutefois important de souligner que la réponse ou non des différentes méthodes aux critères identifiés est assez relative. Ainsi :

- La sensibilité et la spécificité de chaque méthode ont été globalement estimées à partir de la littérature, sur la base de résultats obtenus dans le cadre d'études indépendantes. Ainsi :
 - Toutes les méthodes semblent présenter une bonne sensibilité (Derrien 2011, Boehm et al. 2013, Garabetian et al. 2013, Blais et al. 2015, Hartard 2017) ;
 - Les marqueurs *Bacteroidales*, mitochondriaux et les stanols fécaux semblent également présenter une bonne spécificité (Derrien 2011, Boehm et al. 2013, Blais et al. 2015) ;
 - En revanche, certaines études, notamment l'étude interlaboratoire SIPP menée en 2011, indiquent une spécificité plus faible des phages ARN F-spécifiques (Boehm et al. 2013, Blais et al. 2015).

Cependant, les études peuvent présenter des résultats contradictoires entre elles (Blais et al. 2015). Pour pouvoir réellement comparer la sensibilité et la spécificité des différentes méthodes, il serait donc nécessaire de réaliser une expérience d'intercalibration, dans laquelle divers laboratoires les testeraient sur les mêmes échantillons et selon les mêmes protocoles.

Remarque : ces deux critères varient également entre marqueurs du même type : certains marqueurs *Bacteroidales* se montrent plus sensibles/spécifiques que d'autres, etc.

- Les marqueurs *Bacteroidales* présentent globalement une faible **persistance** en dehors de l'organisme, parfois même inférieure à celle des *Escherichia coli* et des entérocoques intestinaux, ce qui a été identifiée comme une limite à leur utilisation par certains acteurs rencontrés (Sources : entretien Christophe Gantzer, 30/05/2018 ; entretien Catherine Ponthoreau, 18/06/2018 ; Ballesté & Blanch 2010 ; Gourmelon 2014). De ce fait, les marqueurs dont la durée de vie dans l'environnement est équivalente ou supérieure à celle des indicateurs de contamination fécale sont donc considérés comme persistants (Solecki et al. 2011, Derrien 2011).

Remarque : la persistance des marqueurs dépend d'un certain nombre de paramètres, auxquels ils vont être plus ou moins sensibles : lumière, salinité, ...


- La **précision des résultats** fait référence à leur "capacité" de discrimination, autrement dit au niveau de détail avec lequel ils précisent l'origine des contaminations : ainsi, les résultats issus de l'analyse des bactériophages ARN F-spécifiques sont considérés comme "imprécis" car ils ne discriminent que l'origine humaine ou animale des contaminations, tandis que les autres méthodes peuvent en principe conduire à l'identification de la famille d'animaux (voire de l'espèce) à l'origine d'une pollution.
- Les notions de **facilité d'application** et de **coût** sont très subjectives puisqu'elles se basent essentiellement sur le ressenti des acteurs interrogés. En effet :
 - Les méthodes s'appuyant sur l'analyse directe par technique PCR sont considérées comme faciles et rapides à mettre en œuvre par les acteurs du monde de la recherche, contrairement aux méthodes :
 - comprenant une étape d'isolement des germes par culture ;
 - nécessitant le recours à plusieurs appareils d'analyse (chromatographes, spectromètres, etc.) ;
 - nécessitant l'établissement d'une base de données de référence.
 - Les acteurs de la sphère opérationnelle estiment que les analyses de marqueurs bactériens sont trop coûteuses (voir partie [IV.4.2](#)). De ce fait, il sera considéré que les méthodes dont le prix d'application :
 - équivaut ou excède ce prix ne répondent pas au critère "coût" ;
 - est inférieur à ce prix répondent au critère "coût"¹².


Tableau 5. Tableau simplifié des avantages et limites des différentes méthodes identifiées dans le cadre de cette étude.

¹² Remarque : Les coûts indiqués dans ce rapport sont ceux appliqués par des organismes précis, à savoir Labocéa, le LPCME et le CNRS.

Méthode	Sensibilité	Spécificité	Persistence des marqueurs dans l'environnement	Absence de multiplication des marqueurs dans l'environnement	Précision des résultats (identification d'un large panel d'organismes-hôtes)	Estimation de l'importance relative de chaque origine	Indépendance à une base de données	Facilité d'application	Coût	Efficacité pour l'analyse des coquillages
Marqueurs Bacteroidales										
Marqueurs Bactériophages ARN F-Spécifiques										
Marqueurs mitochondriaux			?			?			?	?
Stanols fécaux										
Typage des communautés bactériennes		?	/						?	?

 Réponse au critère

 Absence de réponse au critère

 Pas d'informations

IV. Application des méthodes TSM par la sphère opérationnelle

1. Transfert de connaissances du monde de la recherche vers la sphère opérationnelle

Globalement, le transfert des connaissances du monde de la recherche vers la sphère opérationnelle s'effectue *via* :

- La publication d'articles scientifiques par les organismes de recherche, qui sont en principe facilement accessibles aux maîtrises d'ouvrage. Dans ces publications, les protocoles expérimentaux sont normalement décrits de façon à ce que les lecteurs puissent les appliquer (Source : ...).
- La collaboration entre chercheurs et maîtres d'ouvrage dans le cadre de projets expérimentaux. En effet, les chercheurs peuvent inclure les acteurs locaux lorsqu'ils mènent des expérimentations sur des territoires précis. Les projets de recherche peuvent même naître à la demande de ces acteurs. Cette collaboration est bénéfique pour les deux partis puisqu'elle permet :
 - o Au chercheurs de valider leurs méthodes en s'appuyant sur les bonnes connaissances du territoire des gestionnaires.
 - o Aux gestionnaires d'obtenir davantage d'informations sur leur territoire d'action.

Ces dernières années, un certain nombre de projets visant à développer des méthodes TSM a été mené en associant différents types d'acteurs, notamment :

- Le projet Marquopoleau (2009-2013) : ce projet regroupait des organismes de recherche (Ifremer, CNRS, Irstea¹³, Université d'Angers), des laboratoires d'analyse (Labocéa, Eurofins (Expertises Environnementales et Hydrologie)) et des acteurs de l'eau (Brest Métropole, Agence de l'Eau Loire-Bretagne et ARS). Il avait pour optique de développer et valider une boîte à outils¹⁴ composée de marqueurs chimiques et microbiologiques et permettant la discrimination des principales origines de contamination trouvées en Bretagne (humaine, bovine et porcine). La "robustesse" des méthodes a été évaluée *via* l'application des marqueurs au niveau du bassin versant de l'Elorn pendant un an et la conduite d'essais interlaboratoires, le but étant de transférer les plus performantes d'entre elles à des laboratoires d'analyse des eaux à l'issue du projet.
- Le projet Interreg IVA RiskManche (2013-2015) : il s'agit d'un projet inter-régional mené à l'échelle européenne, et donc le but était d'identifier les germes et les origines associées aux contaminations affectant des zones conchylicoles du nord-ouest de la France et de Grande-Bretagne, *via* l'application de marqueurs TSM (Lapegue et *al.* 2016).

¹³ Institut National de Recherche en Sciences et Techniques pour l'Environnement et l'Agriculture (anciennement Cemagref).

¹⁴ Association de différents marqueurs

- Le projet BacTrac (2016-2019) : ce projet, toujours en cours, a également pour objet de développer une boîte à outils destinée à l'analyse des eaux de baignade et des eaux de rivière (Source : entretien Isabelle Vitte, 24/07/2018), et s'intéresse à la fois aux méthodes "culture-dépendantes" et "culture-indépendantes". Il associe de nombreux acteurs, notamment les Laboratoires des Pyrénées et des Landes, le laboratoire EPOC¹⁵, la Communauté d'Agglomération du Pays Basque (CAPB) ou encore le Syndicat Intercommunal du Bassin d'Arcachon. Les méthodes développées pourront normalement être utilisées par les acteurs territoriaux à partir de l'été 2019 (Source : entretien Amélie Charrier, 13/07/2018).

Il est à noter que, en raison du caractère parfois territoire-dépendant des marqueurs, les projets de recherche se concentrent souvent sur le développement de traceurs applicables à un territoire précis : par exemple, dans le cadre du projet BacTrac, les chercheurs travaillent en priorité sur des marqueurs applicables au sud-ouest de la France.

Les résultats de ces "projets-partenariats" sont présentés aux gestionnaires des eaux et aux collectivités par le biais de réunions ou de colloques. Dans le cadre de certains projets, les chercheurs doivent même fournir des livrables aux acteurs territoriaux, comprenant notamment les résultats des analyses et les cartes de localisation des points de prélèvement.

Remarque : la diffusion des méthodes passe également par un phénomène de "mimétisme" entre les différentes maîtrises d'ouvrage, qui échangent entre elles et s'inspirent beaucoup les unes des autres en termes d'actions menées.

2. Les acteurs opérationnels départementaux impliqués dans la réduction des contaminations des eaux littorales

Cette étude s'intéresse aux contaminations microbiennes des eaux estuariennes, littorales, des zones de production conchylicole et des sites de pêche à pied récréative. Ainsi, seules les activités des **8** maîtrises d'ouvrage intervenant tout ou partie dans le Morbihan, compétentes dans le domaine de l'eau et dont le territoire d'action présente une façade maritime, ont été prospectées (Figure 15. Maîtres d'ouvrage morbihannais chargés de la gestion de la qualité des eaux littorales (Source : Conseil Départemental 56)). **6** de ces structures ont déjà été amenées à évaluer la qualité microbiologique des eaux (Figure) :

- Le Syndicat Mixte Ellé Isole Laïta (SMEIL)
- Le Syndicat Mixte de la Ria d'Etel (SMRE)
- Le Syndicat Mixte de gestion du Parc Naturel Régional (PNR) du Golfe du Morbihan
- Le Syndicat Mixte du Loc'h et du Sal (SMLS)
- L'Établissement Public Territorial du Bassin (EPTB) de la Vilaine
- Cap Atlantique

¹⁵ Environnements et Paléoenvironnements Océaniques et Continentaux



Figure 15. Maîtrises d'ouvrage morbihannaises chargées de la gestion de la qualité des eaux littorales (Source : Conseil Départemental 56).

Cette évaluation de la qualité s'appuie sur la quantification de l'indicateur de contamination fécale *Escherichia coli* dans les eaux. Certains maîtres d'ouvrage dont le territoire comprend des zones de production conchylicole ont également réalisé des analyses *E. coli* dans les coquillages.

Il est à noter que la délégation territoriale de l'ARS ainsi que la structure en charge du REMI (en l'occurrence, le LDA56) assurent également un contrôle de la qualité microbiologique des eaux et des coquillages au niveau des sites de baignade, des zones de production conchylicole et des zones de pêche à pied récréative.

Remarque : Le contexte de l'étude est particulièrement singulier puisqu'elle intervient en plein transfert de compétences : en effet, la loi NOTRe (loi du 7 Août 2015, portant sur la nouvelle organisation territoriale de la République) impose le transfert de la compétence GEMAPI et des compétences relatives à la lutte contre les pollutions diffuses aux Etablissements Publics de Coopération Intercommunale (EPCI), et ce avant le 1^{er} janvier 2020.

Jusqu'alors, ces compétences étaient principalement exercées par des syndicats mixtes sur le territoire du Morbihan. Demain, elles pourraient être exercées par les EPCI à fiscalité propre (Communautés de Communes, Communautés d'Agglomération) ou transférées à des syndicats mixtes, existants, ou nouveaux.

Ainsi, cet inventaire des différents maîtres d'ouvrage assurant un suivi de la qualité microbiologique des eaux à ce jour ne sera certainement plus d'actualité prochainement.

3. Les actions menées par les maîtrises d'ouvrage pour identifier l'origine des contaminations

3.1. Structures porteuses et modalités d'analyse

a. Structures porteuses, nombre d'études réalisées et méthode appliquée

➤ Dans le Morbihan

Seuls deux des maîtres d'ouvrage cités précédemment ont réalisé des campagnes d'analyse visant à identifier l'origine des contaminations des eaux sur le territoire départemental en s'appuyant sur des méthodes TSM : il s'agit du **SMLS** et du **PNR Golfe du Morbihan**. Cap Atlantique et le SMEIL ont également mené des analyses de ce type mais les points de prélèvement étaient situés respectivement en Loire-Atlantique et dans le Finistère.

Il est important de bien faire la distinction entre les analyses de concentration en *Escherichia coli* et les analyses TSM. En effet :

- Les analyses *E. coli* visent à évaluer la qualité des eaux et des coquillages et à détecter d'éventuelles contaminations par des matières fécales. La qualité de ces matrices est toujours susceptible d'évoluer : ces analyses peuvent donc être appliquées de façon régulière sur du long terme, dans le cadre de suivis ou de surveillances par exemple. Un certain nombre de maîtres d'ouvrage disposent ainsi de réseaux de suivi de la qualité des cours d'eau impliquant des analyses régulières d'*E. coli*, ce qui leur permet de déceler les pollutions.
- Les analyses TSM sont quant à elles utilisées à des fins différentes, puisqu'elles visent à fournir des informations sur la provenance des pollutions. Ainsi, quand l'origine d'une contamination a été identifiée sur un secteur, elles n'ont plus lieu d'être. Ces analyses n'ont donc pas vocation à être appliquées dans le cadre d'un suivi régulier sur du long terme comme les analyses *E. coli* mais font plutôt l'objet d'**études**¹⁶ délimitées dans le temps, qui visent soit à identifier les origines des pollutions quand elles ne sont pas connues, soit à conforter des suppositions.

Ainsi, à ce jour, dans le département, seules deux études visant à identifier l'origine de contaminations ont été menées :

¹⁶ Le terme d'étude peut être défini de plusieurs façons. Ici, il correspondra à l'analyse d'un ensemble de points (même situés sur des secteurs géographiques différents) sur une période de temps donnée.

- Une étude globale¹⁷ concernant les secteurs de la rivière d'Auray, la rivière de Crac'h et l'Anse du Men Du, conduite par le SMLS de 2016 à 2017 (Source : entretien Floriane De Luca, SMLS, 18/05/2018).
- Une étude concernant la rivière de Pénerf, conduite par le PNR du Golfe du Morbihan de 2011 à 2014 (Source : entretien Camille Simon, PNR Golfe du Morbihan, 25/05/2018).

➤ Dans les autres départements

Afin d'acquérir davantage d'informations sur l'utilisation des méthodes de TSM par la sphère opérationnelle, des prospections ont été menées :

- dans les autres départements bretons dans un premier temps.
- Puis ailleurs en France dans un second temps.

Cependant, contrairement à celles conduites dans le Morbihan, ces recherches n'avaient pas pour but d'établir un état des lieux exhaustif des pratiques mises en œuvre sur ces territoires. Outre le SMEIL et Cap Atlantique, d'autres maîtrises d'ouvrage ayant appliqué les méthodes TSM ont ainsi été interrogées :

- La Communauté de Communes du Pays d'Iroise (CCPI) ;
- Brest Métropole (BM) ;
- Le Syndicat Intercommunal de la Vallée de l'Odet (Sivalodet) ;
- La Communauté de Communes du Pays Fouesnantais (CCPF) ;
- L'Agglomération de La Rochelle (Agglo La Rochelle) ;
- Et enfin, le Syndicat Mixte du Bassin de Thou (SMBT).

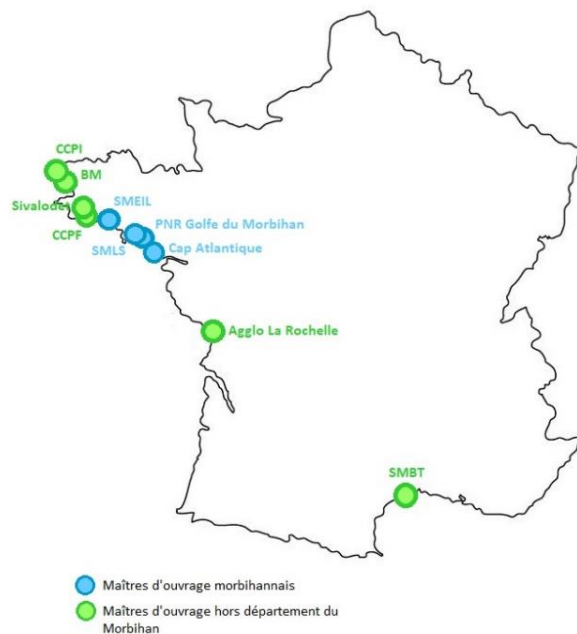


Figure 16. Localisation des différents maîtres d'ouvrage interrogés dans le cadre de l'étude.

La localisation de ces différents gestionnaires en charge de la qualité des eaux est représentée sur la Figure 16. Localisation des différents maîtres d'ouvrage interrogés dans le cadre de l'étude.

Les enquêtes menées auprès des acteurs de l'eau ont révélé qu'un seul type de marqueurs semblait être appliqué par le volet opérationnel à l'heure actuelle : les **marqueurs bactériens**.

¹⁷ L'étude menée par le SMLS n'a pas pu aboutir, notamment en raison du contexte actuel de transfert des compétences.

Remarque : certains maîtres d’ouvrage ont également appliqué des méthodes TSM directement dans la chair ou le liquide intervalvaire de coquillages. Cependant, ces analyses ont toutes été conduites de façon ponctuelle dans le cadre de projets expérimentaux en collaboration avec des organismes de recherche (Source : entretien Michèle Gourmelon, 12/06/2018 ; entretien Catherine Ponthoreau, Cap Atlantique, 18/05/2018). A l’heure actuelle, seules les analyses d’eau semblent être réellement applicables par la sphère opérationnelle. Cette partie IV ne s’intéressera donc qu’à la recherche de l’origine des contaminations par les acteurs territoriaux **dans la matrice "Eau"**.

b. Principaux résultats relatifs aux pratiques opérationnelles

Les résultats présentés dans cette partie sont essentiellement issus des entretiens menés auprès des maîtrises d’ouvrage et des laboratoires d’analyses, sur la base d’une trame de questionnaire ([Annexe 4 : Trame d’entretien à destination des maîtres d’ouvrage](#) ; [Annexe 5 : Trame d’entretien à destination des laboratoires d’analyse](#)), ainsi que des rapports d’étude que certains ont pu fournir par la suite.

Les différentes fiches visibles en [Annexe 6 : Fiches-résumés des analyses menées par chaque maître d’ouvrage interrogé](#) décrivent brièvement, pour chaque maître d’ouvrage interrogé (et chaque étude menée dans le cas du Sivalodet) :

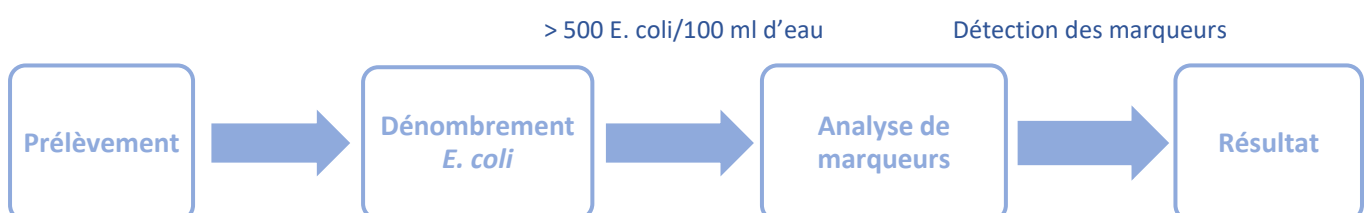
- Le secteur étudié ;
- Le contexte ayant conduit à la réalisation des analyses TSM ;
- Les objectifs visés à travers ces analyses ;
- Les modalités de prélèvement : nombre et localisation des points de prélèvement, nombre de résultats obtenus par point, fréquence et conditions de prélèvement ;
- La méthode utilisée et le prestataire des analyses.

Chaque fiche contient également une carte localisant les points de prélèvement.

Remarque : il est important de bien faire la distinction entre :

- Le nombre de prélèvements effectués par point ;
- Le nombre d’analyses réalisées ;
- Le nombre de résultats obtenus.

En effet, un prélèvement ne pourra faire l’objet d’une analyse de marqueurs que s’il présente une concentration en *Escherichia coli* supérieure à 500 UFC/100 ml. Par ailleurs, une analyse ne conduit pas forcément à l’obtention d’un résultat puisque les marqueurs peuvent ne pas être détectés ([Figure 17](#)).



c. Analyse descriptive et principaux enseignements

Tous les gestionnaires interrogés appliquent ainsi la même méthode d'identification et la plupart ont fait appel au même laboratoire prestataire pour les analyses. Les seuls points de divergence sur lesquels il semble possible de discuter concernent principalement la mise en œuvre de l'échantillonnage, et plus précisément :

- La localisation des points de prélèvement ;
- La fréquence d'échantillonnage ;
- Le nombre de résultats souhaités/obtenus par point ;
- Ou encore les conditions requises pour le prélèvement, notamment les conditions météorologiques et de marée.

➤ Localisation des points de prélèvement

Même si ces milieux font l'objet de la présente étude, en pratique, les points de prélèvement ne se situent pas exclusivement au niveau des estuaires et des littoraux, mais plutôt au niveau des cours d'eau qui les alimentent et drainent potentiellement les pollutions. Il est possible de distinguer deux grandes tendances en ce qui concerne la localisation de ces points. Ainsi, certaines maîtrises d'ouvrage n'échantillonnent globalement qu'en aval de bassin versant tandis que d'autres préfèrent également échantillonner plus en amont. Cette dichotomie dans le choix des points de prélèvement est clairement visible en [Figure 18](#) et peut être reliée à plusieurs éléments :

- Tout d'abord, les difficultés d'interprétation des résultats : les analyses menées en aval de bassin versant indiquent souvent une origine mixte des contaminations, puisque cette zone concentre l'ensemble des pollutions du bassin, même celles issues des secteurs les plus en amont. En effet, le T90¹⁸ des microorganismes pouvant aller de quelques heures à quelques jours (suivant les conditions physico-chimiques) (Idhesa 2013, Gourmelon 2014), il est tout à fait possible qu'une pollution causée en amont de bassin versant impacte le milieu littoral. Face à cette information, les avis des acteurs divergent : certains estiment ainsi que les points situés les plus en aval sont les plus appropriés pour le prélèvement car ils fournissent une vision globale des contaminations qui touchent l'ensemble du bassin versant. A l'inverse, d'autres doutent de la pertinence de ces analyses, notamment car les marqueurs ne sont pas quantifiables (voir partie [III.1.1.1.](#)) et ne permettent donc pas de hiérarchiser les contaminations selon leur importance. De ce fait, ces acteurs ont tendance à localiser les points de prélèvement de façon à découper le territoire en différents sous-secteurs, dans l'optique de déterminer plus précisément la provenance des pollutions. Pour ce faire, certains s'appuient sur des analyses préalables de concentration en *E. coli* dans les eaux afin

¹⁸ Le T90 correspond au temps nécessaire pour que 90% des germes ne soient plus détectés par culture (Gourmelon 2014).

d'identifier les principaux foyers de contamination du territoire et donc affiner la recherche des sources de pollution. Dans le cadre de l'étude menée par le SMEIL, cette stratégie a ainsi permis de mettre en évidence deux cours d'eau particulièrement problématiques (le Dourdu et le Frou), sur lesquels les analyses de marqueurs ont été concentrées (Sources : entretien Romain Suaudeau, 31/05/2018 ; Labocéa 2015).

Par ailleurs, il est important de noter que le niveau de difficulté relatif à l'interprétation des résultats est très certainement lié à la taille du bassin versant concerné et à la complexité de son chevelu hydrographique : la localisation des sources de contamination ou des secteurs les plus contributifs en termes de pollution est probablement facilitée quand le territoire présente un réseau de cours d'eau relativement simple, comme la CCPI par exemple ([Annexe 6 : Fiches-résumés des analyses menées par chaque maître d'ouvrage interrogé, Fiche n°8](#)), ce qui peut justifier la mise en œuvre des prélèvements au niveau des points les plus en aval. Au contraire, dans le cas d'un territoire plus complexe comme le bassin versant de l'Odette ([Annexe 6 : Fiches-résumés des analyses menées par chaque maître d'ouvrage interrogé Fiche n°6](#)), la localisation des points de prélèvements se doit d'être plus stratégique pour permettre une bonne interprétation des résultats d'analyse. La structure des bassins versants influe donc également sur le choix des sites d'échantillonnage.

- Ensuite, le prix : les analyses de marqueurs bactériens coûtent relativement cher (voir partie [III.1.1.1](#)). Les maîtrises d'ouvrage disposent généralement d'un budget limité alloué à l'identification de l'origine des contaminations, leur permettant de conduire un nombre plus ou moins important d'analyses. De ce fait, certains gestionnaires peuvent réaliser des analyses sur un grand nombre de points, et ainsi couvrir une vaste étendue de territoire, aussi bien en amont qu'en aval de bassin versant, tandis que d'autres ne peuvent suivre qu'un nombre de points restreint, dont la position doit alors être choisie minutieusement de façon à obtenir un maximum de résultats.
- Enfin, le contexte des analyses : les entretiens menés auprès des maîtres d'ouvrage ont permis de distinguer deux grands "types" de contexte ayant conduit à la mise en œuvre des analyses de marqueurs même si, globalement, la finalité de tous les acteurs était de répondre à des problématiques de contamination microbienne affectant des zones de production conchylicole ou des sites de baignade. La plupart des opérateurs interrogés ont ainsi mené ces analyses dans le but d'apporter des informations complémentaires dans le cadre d'études de secteurs bien définis : c'est notamment le cas du PNR Golfe du Morbihan à l'échelle de la rivière de Pénerf, du SMEIL à l'échelle de l'estuaire de la Laïta ou encore de la CCPI au niveau des sites de baignade de qualité suffisante ou insuffisante. D'autres acteurs, tels que le SMLS et Cap Atlantique, assurent quant à eux une veille de la qualité des eaux *via* un réseau de suivi de la concentration en *E. coli* et ont déclenché des analyses de marqueurs quand l'existence d'une contamination était avérée mais que les connaissances de terrain, notamment l'occupation des sols, ne permettait pas d'en identifier l'origine (Sources : entretien Floriane De Luca, 18/05/2018 ; entretien Catherine Ponthoreau, 18/06/2018). Dans ce cas, la localisation des points de prélèvement n'est pas choisie directement par les gestionnaires puisqu'il s'agit simplement des points du réseau de suivi qui posent un questionnement.

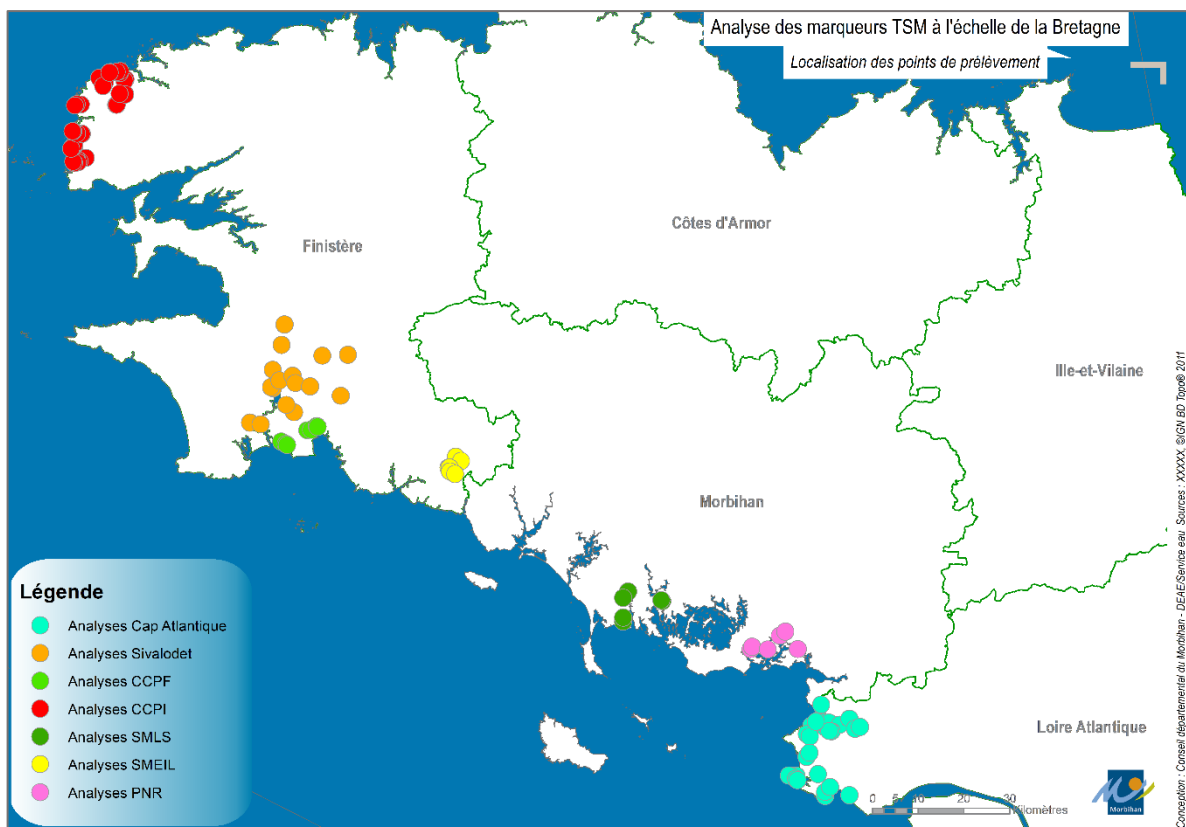


Figure 18. Localisation des points de prélèvement en vue des analyses TSM de différents maîtres d'ouvrage interrogés (Source : enquête auprès des maîtres d'ouvrage).

Tous les points représentés sur la figure sont des points d'eau douce ou d'eau saumâtre. L'eau de mer n'a pas été analysée, et ce pour deux raisons principales :

- Premièrement, certaines études/analyses datent d'il y a quelques années, et la méthode des marqueurs bactériens n'était pas encore adaptée à cette matrice (Source : entretien Camille Simon, 25/05/2018).
- Ensuite, il est plus difficile d'atteindre la concentration seuil de 500 *E. coli*/100 ml dans l'eau de mer, notamment en raison de la faible persistance des bactéries dans ce milieu (du fait de la salinité, de la lumière, ...) (Gourmelon 2014).

➤ Conditions de prélèvement

Les conditions requises pour le prélèvement diffèrent également selon les maîtres d'ouvrage. Ainsi, parmi les acteurs interrogés :

- Certains se réfèrent à la pluviométrie :
 - La plupart des maîtrises d'ouvrage prélèvent suite à un épisode pluvieux, généralement d'au moins 10 mm/24 h, car ces conditions sont les plus propices à l'apparition des contaminations et permettent d'atteindre la valeur seuil de concentration en *E. coli* nécessaire aux analyses.
 - Dans le cadre de son étude sur le bassin versant de l'Odet, le Sivalodet a essayé de réaliser des analyses à la fois par temps sec et par temps de pluie, afin de bien caractériser les contaminations et de déterminer quelles étaient les origines des contaminations de fond¹⁹ et quelles origines apparaissaient lors des pluies (Sources : Idhesa 2013 ; entretien Anne-Sophie Blanchard, 22/06/2018). Cependant, il est plus difficile d'obtenir des résultats par temps sec car les concentrations en *E. coli* dans les eaux sont souvent insuffisantes pour permettre l'analyse.
- D'autres se réfèrent plutôt aux conditions de marée :
 - Cap Atlantique réalise les analyses en période de vives-eaux car ces conditions permettent de drainer les contaminations de l'ensemble du bassin versant, y compris celles se trouvant dans la partie amont. La pluviométrie n'est pas prise en compte car, selon la structure, la qualité des eaux est davantage liée à l'ouverture des maisons secondaires et aux activités agricoles qu'aux pluies (Source : entretien Catherine Ponthoreau, 18/06/2018).
 - Lors du suivi des contaminations en rivière de Pénerf, le PNR Golfe du Morbihan a choisi de prélever à la fois en période de vives-eaux et en période de mortes-eaux faisant suite si possible à un épisode pluvieux d'au moins 10 mm/24h pour favoriser l'atteinte de la valeur seuil en *E. coli* permettant les analyses, fixée à 1000 *E. coli*/100 ml dans le cadre de cette étude.

¹⁹ Les contaminations de fond peuvent être définies comme des pollutions chroniques qui n'entraînent pas de valeurs de concentration en *E. coli* excessives dans les eaux. Cette notion s'oppose aux pics de contaminations, qui correspondent à des contaminations plus ponctuelles et plus importantes en termes d'impact sur la qualité des eaux (et des coquillages).

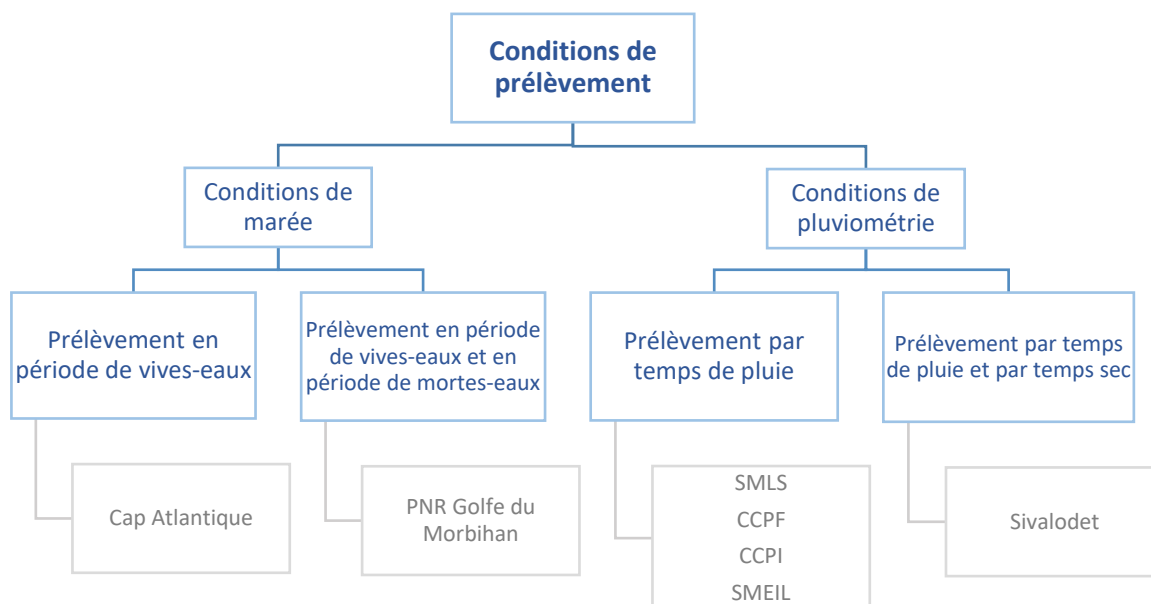


Figure 19. Synthèse des conditions privilégiées par les maîtres d'ouvrage pour la réalisation des prélèvements.

Globalement, il est donc possible de faire la distinction entre :

- Les structures qui prélèvent sous toutes les conditions (pluviométriques ou de marée), pour caractériser au mieux les contaminations.
- Les structures qui prélèvent lorsque les conditions sont propices à l'apparition de contaminations, pour maximiser la probabilité d'atteindre la valeur seuil de concentration en *E. coli* requise pour les analyses (de 500 UFC/100 ml, voire de 1000 UFC/100 ml).

➤ Fréquence d'échantillonnage ou d'analyse

La conduite des analyses de marqueurs est dépendante de la concentration en *E. coli* dans les eaux. Ainsi, la fréquence d'échantillonnage diffère souvent de la fréquence d'analyse. Les entretiens menés auprès des maîtrises d'ouvrage ont montré que certaines d'entre elles réalisaient les prélèvements selon un calendrier bien défini, sur une certaine période de temps ou de façon à obtenir un certain nombre de résultats. C'est notamment le cas :

- Du PNR Golfe du Morbihan dans le cadre de son étude sur la rivière de Pénerf, qui a échantillonné chaque point environ une fois par mois pendant 3 ans dans le but d'obtenir au moins 5 résultats par point et par an (Source : entretien Camille Simon, 25/05/2018).
- Du Sivalodet dans le cadre de son étude sur le bassin de l'Odet, qui a réalisé des prélèvements sur tous les points chaque mois pendant 1 an (Idhesa 2013).
- Ou encore de Cap Atlantique, qui échantillonne les points suivis chaque mois jusqu'à l'obtention de 6 résultats par point (Source : entretien Catherine Ponthoreau, 18/06/2018).

Du fait de leur récurrence dans le temps et de leur caractère "anticipé", ces prélèvements peuvent être qualifié de réguliers. A l'inverse, d'autres structures réalisent des analyses de façon beaucoup plus ponctuelle :

- Soit quand les conditions météorologiques ou le budget s'y prêtent, comme par exemple :
 - o La CCPF, qui réalise entre 1 et 3 analyses de chaque point suivi par an (Source : entretien Antoine Blouin, 27/06/2018).
 - o La CCPI, qui, depuis 2016, a obtenu un résultat d'analyse par point suivi et par an (Source : entretien Anne Danse et Aude Mahot, 19/07/2018).
- Soit dans le cadre d'études à court terme, comme celle menée par le SMEIL au niveau de l'estuaire de la Laïta, dans laquelle les 6 points suivis ont été analysés 2 fois (en octobre 2014 et janvier 2015) (Sources : Labocéa 2015 ; entretien Romain Suaudeau, 31/05/2018), ou encore celle menée par le SMBT au niveau d'une zone conchylicole de l'Etang de Thau, dans laquelle le point problématique a été analysé 3 fois avec un pas de temps de 3-4 jours entre chaque analyse (Source : entretien Stéphane Roumeau, 24/08/2018).

Le nombre de campagnes²⁰ menées par étude est donc très hétérogène et va de 1 dans le cadre de l'étude conduite par le Sivalodet sur le cours d'eau du Quinquis à 23 dans l'étude conduite par le PNR Golfe du Morbihan sur la rivière de Pénerf. La durée²¹ des études est également variable, puisqu'elles peuvent s'étendre de quelques jours (étude du SMBT) à quelques années (étude du PNR Golfe du Morbihan). Enfin, le nombre de résultats obtenus par point est aussi très fluctuant, même dans les limites d'une même étude. Un exemple parlant est celui de l'étude des contaminations du bassin de l'Odet, menée par le Sivalodet : dans ce cadre, chaque point suivi a été échantillonné chaque mois pendant 13 mois, ce qui a permis l'obtention de 13 résultats d'analyse pour un point tandis qu'un autre point, situé dans l'estuaire de l'Odet, n'a pas pu être analysé une seule fois en raison de taux trop faibles en *E. coli* (Idhesa 2013).

Ainsi, il semble plus difficile de dégager des grandes tendances en ce qui concerne les fréquences d'échantillonnage et d'analyse de marqueurs. Cependant, certains acteurs préconisent tout de même un suivi sur le long terme avec la réalisation d'analyses espacées dans le temps afin de mieux appréhender l'évolution de la contamination tandis que d'autres estiment que des analyses menées sur une courte période et espacées de quelques jours permettent l'obtention d'informations suffisantes sur les pollutions.

Il est à noter que, tout comme la localisation et le nombre de points de prélèvement, le nombre d'analyses réalisées par point ainsi que la fréquence d'analyse sont dépendantes du budget que les maîtrises d'ouvrage consacrent à l'identification de l'origine des contaminations.

Remarque : en ce qui concerne le prélèvement en lui-même, aucune préconisation spécifique n'a été formulée en vue des analyses de marqueurs : il s'agit d'un prélèvement d'eau classique. Il doit notamment être réalisé en conditions stériles, directement dans l'eau ou à la perche.

²⁰ Le terme de "campagne" peut être défini de plusieurs façons mais dans le cadre de cette étude, il désigne une journée/date à laquelle ont été réalisés un ensemble de prélèvements par un gestionnaire donné.

²¹ Ici, la durée d'une étude correspond à la période de temps qui s'étend entre la première analyse de marqueurs et la dernière.

➤ Cas particulier de Cap Atlantique

L'EPCI Cap Atlantique est un organisme précurseur en termes d'utilisation des marqueurs bactériens puisqu'il a proposé des sites pilotes sur son territoire d'action à Ifremer dans le cadre de projets expérimentaux visant à développer la méthode pour l'analyse d'eaux et de coquillages, et travaille sur le sujet avec le laboratoire Labocéa de Plouzané depuis le début des années 2010 (Source : entretien Catherine Ponthoreau, 18/06/2018).

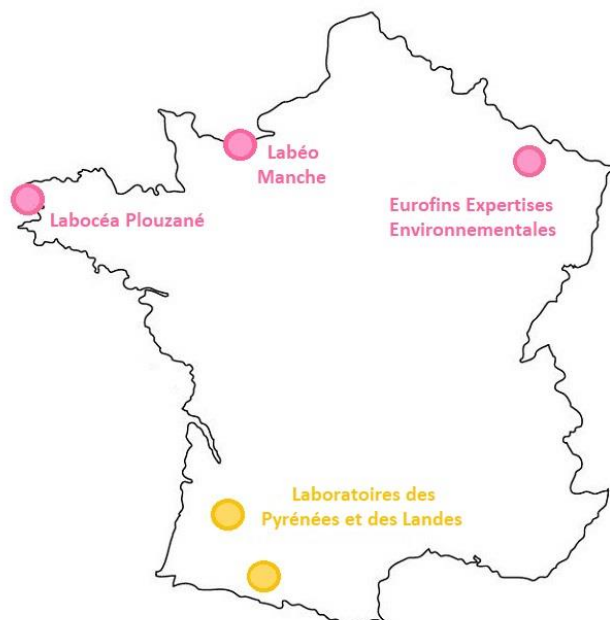
Cap Atlantique utilise très fréquemment cette méthode pour déterminer l'origine des contaminations des eaux sur son territoire et présente une façon de procéder bien définie : en effet, la structure possède un réseau de suivi de la qualité des eaux basé sur des analyses régulières de concentration en *E. coli* et déclenche les analyses de marqueurs quand le suivi révèle un taux d'*E. coli* supérieur à 500 UFC/100 ml dans les eaux, ce qui traduit une contamination, et que l'occupation des sols aux points problématiques ne permet pas de l'expliquer.

Cap Atlantique essaye d'obtenir 6 résultats par point pour pouvoir valider les conclusions issues de la conduite des analyses (Source : entretien Catherine Ponthoreau, 18/06/2018). Dans cette optique, les points qui posent un questionnement sont analysés une fois par mois, pendant une période de temps pouvant aller de 6 mois à 1 an puisque les analyses de marqueurs dépendent de la concentration en *E. coli* dans les eaux. Cependant, cette règle peut être dérogée dans certains cas : en effet, les points peuvent n'être analysés que 2 ou 3 fois dans le cas où les résultats obtenus correspondent bien à l'occupation du sol ou permettent un apport suffisant d'informations. A l'inverse, une occupation des sols complexe peut nécessiter plus de 6 analyses par point (Source : entretien Catherine Ponthoreau, 18/06/2018). Par ailleurs, les analyses ne sont pas forcément réalisées tous les mois : en effet, certains secteurs ne sont sensibles aux contaminations qu'à certaines périodes de l'année. Les analyses peuvent alors être arrêtées pendant un temps puis reprises plus tard.

Enfin, Cap Atlantique présente la particularité de disposer de son propre laboratoire, qui lui permet de réaliser lui-même les analyses *E. coli*. En vue d'une analyse de marqueurs, la structure réalise alors un double flaconnage : l'un destiné à l'analyse *E. coli* et l'autre envoyé au laboratoire prestataire des analyses TSM. En cas de dépassement de la valeur seuil de concentration en *E. coli* définie dans les eaux, Cap Atlantique peut alors demander à son prestataire de déclencher cette seconde analyse.

d. Prestataire des analyses

Les entretiens menés auprès de la sphère opérationnelle ont permis d'identifier quatre laboratoires prestataires des



● Laboratoires prestataires des analyses de marqueurs
● Laboratoires potentiellement futurs prestataires

analyses de marqueurs sur le territoire français²² (Figure 20) :

- Les laboratoires ayant participé au développement des marqueurs (bactériens, viraux et chimiques) dans le cadre du projet Marquopoleau :

- Le laboratoire Labocéa situé à Plouzané (29) réalise des analyses de marqueurs bactériens dans les eaux et, depuis le printemps 2018, dans la chair et le liquide intervalvaire des huîtres. Il propose 8 marqueurs bactériens différents : un marqueur général et 7 marqueurs spécifiques permettant l'identification des contaminations provenant de l'Homme, des ruminants (à savoir les bovins, les ovins et les caprins), des porcs, des équins (les chevaux, les ânes et les poneys), des chiens, des oiseaux marins et des volailles (Source : entretien Gaël Durand, 12/06/2018).

Figure 20. Localisation des laboratoires prestataires et des potentiels futurs prestataires des analyses TSM en France.

- Le laboratoire Eurofins Expertises Environnementales situé à Maxéville (54) n'applique la méthode que dans les eaux et propose 8 marqueurs différents : un marqueur général et 7 marqueurs spécifiques de l'Homme, de la mouette, du chien, des ruminants et de l'Oie du Canada (Source : Florence Gosselin).

- Des laboratoires ayant acquis les marqueurs validés (marqueurs bactériens Humains, Ruminants, Porcs et phages ARN F-spécifiques) sous forme de "kits" à l'issue du projet Marquopoleau, tels que :

- Labéo Manche ;
- Qualyse (anciennement LASAT²³).

Les Laboratoires des Pyrénées et des Landes LPL, localisés dans le sud-ouest de la France, participent actuellement au développement de méthodes TSM dans le cadre du projet BacTrac et pourraient potentiellement devenir prestataire des analyses d'ici fin 2019 (Sources : entretien Amélie Charrier, 13/07/2018 ; entretien Isabelle Vitte, 24/07/2018).

Remarque : les laboratoires prestataires identifiés ont proposé l'analyse des phages ARN F-spécifiques pendant un temps, mais ne le font plus maintenant. Aujourd'hui, seul le **plateau technique Biologie Moléculaire Environnementale (BME) du LCPME** semble proposer ces marqueurs dans le cadre du Traçage des Sources Microbiennes.

La structure chargée de la phase de prélèvement, qui peut être la maîtrise d'ouvrage ou le laboratoire prestataire, doit réaliser un double flaconnage, avec un échantillon destiné à l'analyse *E. coli* et un autre destiné à l'analyse de marqueurs. La méthode normée permet de quantifier les *E. coli* avec un résultat définitif à 48h. Dans l'attente de ces résultats, le deuxième échantillon est alors soumis à un pré-traitement puis congelé à - 80°C (Source : entretien Gaël Durand, 12/06/2018), et son analyse est déclenchée en cas de contamination. La réalisation de l'étape de pré-traitement par Labocéa coûte environ une quarantaine d'euros.

²² La liste des laboratoires prestataires n'est sûrement pas exhaustive.

²³ Laboratoire d'Analyses Sèvres-Atlantique

Remarque : deux cas de figure s’opposent en termes d’échantillonnage lors d’épisodes de pollution ponctuels :

- En effet, certains acteurs mettent en œuvre des analyses *E. coli* puis, 48h plus tard, si les résultats révèlent une contamination importante, demandent des analyses de marqueurs. Le problème lié à cette démarche est qu’entre les premières analyses et les secondes, la masse d’eau ne sera plus la même au niveau des points de prélèvement, entraînant potentiellement un changement de nature de la contamination.
- A l’inverse, d’autres acteurs anticipent les analyses de marqueurs en réalisant le double flaconnage dès qu’une forte contamination est suspectée. Cette façon de procéder est fortement recommandée car, même si elle implique un coût supplémentaire du fait du pré-traitement des échantillons, elle assure de ne pas manquer de résultats permettant un apport significatif d’informations sur la provenance des pollutions

En cas de dépassement de la valeur seuil de concentration en *E. coli* fixée par le laboratoire prestataire (en général 500 UFC/100 ml), l’ADN présent dans les échantillons est extrait, amplifié et quantifié par PCR en temps réel (voir partie III.1.1.1). Les marqueurs utilisés sont généralement ciblés en fonction des facteurs de pression existants au niveau des points de prélèvement. Les laboratoires conseillent d’analyser systématiquement un marqueur général (AllBac ou GenBac) afin de confirmer l’origine fécale de la contamination si aucun autre marqueur choisi n’est détecté. Les résultats sont exprimés en nombre de copies de la séquence d’ADN recherchée par volume d’eau (Tableau 6).

Tableau 6. Exemple de résultats transmis par Labocéa au SMLS suite à l’analyse de marqueurs bactériens (Source : SMLS).

Paramètres analysés	Résultats			Unité
	Echantillon 1	Echantillon 2	Echantillon 3	
- Général	Confirmé (6.9)	Confirmé (6.6)	Confirmé (6.9)	Interprétation (Log ₁₀ UG/100mL)
- Humain	<i>Suspecté (<1.9)</i>	Confirmé (3.8)	Confirmé (3.7)	Interprétation (Log ₁₀ UG/100mL)
- Ruminant	Confirmé (2.9)	Confirmé (2.4)	Confirmé (3.7)	Interprétation (Log ₁₀ UG/100mL)
- Porcin	Non détecté	-	-	Interprétation (Log ₁₀ UG/100mL)
- Equin	Non détecté	-	-	Interprétation (Log ₁₀ UG/100mL)

Les analyses de marqueurs peuvent être demandées de manière ponctuelle par les maîtres d’ouvrage ou être contractualisées par un cahier des charges (ou un mémoire technique), spécifiant par exemple :

- Le nombre de points de prélèvement et leur localisation ;
- Les marqueurs à appliquer ;

- Les contraintes techniques et météorologiques à respecter pour le prélèvement ;
- Le délai de transmission des résultats ;
- Le budget à ne pas dépasser ;
- Le nombre minimal et maximal d'analyses mensuel/annuel/...

Remarque : les laboratoires peuvent proposer de mener l'étude eux-mêmes, de la phase de diagnostic, visant à cibler les marqueurs les plus pertinents pour l'analyse, à l'interprétation des résultats, en passant par l'étape de prélèvement.

e. Synthèse de la mise en œuvre des prélèvements et des analyses par la sphère opérationnelle

Maîtrise d'ouvrage	Nombre d'études réalisées dans le cadre du TSM et date	Nombre de campagnes de prélèvement ²⁴	Nombre de points de prélèvement – Matrice analysée	Localisation des points de prélèvement	Fréquence des analyses	Conditions à respecter pour le prélèvement	Prestataire des analyses	Méthode d'analyse et marqueurs utilisés
Département morbihannais								
PNR Golfe du Morbihan	1 étude, au niveau de la rivière de Pénerf. Novembre 2011 – Octobre 2014	23	6 points – Eau douce	Exutoires des principaux cours d'eau alimentant la rivière de Pénerf	Régulière ≈ 1 fois/mois	- En période de vives-eaux ET - En période de mortes-eaux, faisant suite si possible à un épisode pluvieux d'au moins 10 mm/24h	Eurofins Expertises Environnementales	Marqueurs bactériens : Humains, Ruminants, Porcs ²⁵
SMLS	1 étude globale, au niveau de l'Anse du Men Du, de la Rivière de Crac'h et de la rivière d'Auray 07/2016 – 09/2017	5	6 points – Eau douce	Exutoires de cours d'eau problématiques se jetant dans l'Anse du Men Du, la Rivière de Crac'h et la Rivière d'Auray	Ponctuelle	Suite à un épisode pluvieux	Labocéa	Marqueurs bactériens : Humains, Ruminants, Porcs, Equins et Oiseaux marins
Hors département morbihannais								
Agglo La Rochelle	1 étude – Juillet-Août 2015	5	3 points – ?	?	Ponctuelle	?	Labocéa	Marqueurs bactériens : Humains, Ruminants, Porcs, Equins et Oiseaux de mer
Cap Atlantique	/ - de 2013 à 2018		27 points – ?	Points problématiques identifiés <i>via</i> des analyses <i>E. coli</i>	Régulière ≈ 1 fois/mois	En période de vives-eaux	Labocéa	Marqueurs bactériens : Humains, Ruminants, Porcs, Equins, Canins, Oiseaux Marins et Volailles
CCPF	/ - De 2012 à 2018	?	7 points – ?	Exutoires des sous-BV littoraux	Ponctuelle ≈ entre 1 et 3 analyses/point/an	Suite à un épisode pluvieux d'au moins 10 mm/24 h	Labocéa	Marqueurs bactériens : Humains, Ruminants, Porcs, Equins et Volailles

²⁴ Tous les points de l'étude ne sont pas forcément analysés lors de chaque campagne, soit parce que la concentration en *Escherichia coli* ne le permet pas, soit par choix du maître d'ouvrage.

²⁵ Les résultats obtenus lors de cette étude semblent avoir été validés par l'utilisation de bactériophages ARN F-spécifiques et de la bactérie *L. Amylovorus*.

Maîtrise d'ouvrage	Nombre d'études réalisées dans le cadre du TSM et date	Nombre de campagnes de prélèvement	Nombre de points de prélèvement – Matrice analysée	Localisation des points de prélèvement	Fréquence des analyses	Conditions à respecter pour le prélèvement	Prestataire des analyses	Méthode d'analyse et marqueurs utilisés ²⁶
CCPI	1 étude globale des plages de qualité suffisante et insuffisante du Pays d'Iroise – 2016 et 2017	2	35 points (24 en 2016 + 11 en 2017)	Confluences des principaux bras des cours d'eau alimentant les plages de qualité suffisante et insuffisante	Ponctuelle (1 analyse/an)	Suite à un épisode pluvieux de 10 mm/24h	Labocéa	Marqueurs bactériens : Humains, Ruminants, Porcs, Equins et Volailles
Sivalodet	1 étude globale au niveau du BV de l'Odet Mars 2012 – Février 2013	13	16 points – Eau douce et estuarienne	2 points au niveau de l'estuaire + 8 points aux exutoires de chaque sous-BV + 6 points en amont des exutoires sur les différents sous-BV	Régulière ≈ 1 fois/mois	- Par temps sec ET - Par temps de pluie (+ En marée descendante pour les points estuariens)	Labocéa	Marqueurs bactériens : Humains, Ruminants et Porcs
	1 étude au niveau du sous-BV du Quinquis Novembre 2015	1	6 points – Eau douce	Le long du cours d'eau étudié, de façon à prendre en compte les diverses entreprises potentiellement impactantes	Ponctuelle	- Par temps de pluie		
SMBT	1 étude, au niveau d'une zone conchylicole de l'étang de Thau. Mars 2017	3	1 point – ?	Zone conchylicole problématique de l'étang de Thau	Ponctuelle (Intervalle de 3-4 jours entre les prélèvements)	?	Labocéa	Marqueurs bactériens : Humains et Oiseaux marins
SMEIL	1 étude, au niveau du BV Ellé – Isole – Laïta Octobre 2014 – Janvier 2015	2	6 points – Eau douce	Points au niveau de BV problématiques identifiés <i>via</i> des analyses <i>E. coli</i>	Ponctuelle	Suite à un épisode pluvieux	Labocéa	Marqueurs bactériens : Humains, Ruminants et Porcs

²⁶ Cette information est à relier à l'année à laquelle a été menée l'étude concernée puisque de nouveaux marqueurs ont été développés au fil des ans : ainsi, au début des années 2010, seuls les marqueurs humains, bovins et porcins étaient proposés par les laboratoires d'analyse.

Ce tableau de synthèse traduit bien les limites de l'offre disponible sur le territoire français en termes de prestations d'analyse TSM.

3.2. Valorisation des résultats obtenus

Après analyse, les laboratoires prestataires peuvent transmettre les résultats bruts aux maîtrises d'ouvrage, qui se chargent alors de leur interprétation, ou les exploiter eux-mêmes en les contextualisant dans le cadre d'une étude globale du territoire concerné.

Quelques acteurs parmi ceux interrogés ont bien relié les résultats des analyses aux concentrations ou aux débits des flux d'*E. coli* dans les eaux, et ce notamment afin de distinguer l'origine des contaminations de fond de celle des pics de contamination. En revanche, seule l'étude menée par le Sivalodet en 2012-2013 semble avoir vraiment pris en compte les conditions pluviométriques et de marée lors du prélèvement dans l'interprétation des résultats (Idhesa 2013). Or, ces dernières (et particulièrement la pluviométrie) peuvent avoir une forte influence sur la qualité des eaux en favorisant l'arrivée des pollutions dans le milieu naturel et permettent de tirer des conclusions plus précises quant à leur origine : il semble donc important de les considérer. Enfin, cette étude a également pris en compte la date du prélèvement, notamment pour pouvoir potentiellement corrélérer de mauvais résultats d'analyse aux périodes d'autorisation d'épandage (Idhesa 2013) ([Annexe 7 : Exemple de calendrier d'épandage](#)).

Dans l'optique de permettre une meilleure interprétation des résultats, certains acteurs ont aussi associé les analyses à des études complémentaires. C'est notamment le cas du PNR Golfe du Morbihan, qui a construit un modèle hydrodynamique visant à appréhender la dynamique et établir une hiérarchisation des flux bactériens arrivant dans l'estuaire de Pénerf (Source : entretien Camille Simon, 25/05/2018). Face aux résultats indiquant une contamination liée aux oiseaux de bord de mer, le SMBT a également mis en œuvre une étude scientifique basée sur l'écoute de ces animaux, avec pour objectifs d'identifier leur espèce et d'estimer leur nombre (Source : entretien Stéphane Roumeau, 24/08/2018) : les résultats de cette recherche ont montré que la zone d'étude était surtout occupée par des goélands, information qui n'aurait pas pu être déduite d'après les résultats des analyses de marqueurs.

Les maîtrises d'ouvrage communiquent ou présentent ensuite ces résultats (sous forme de synthèses, rapports d'activité, ...) à différents types d'acteurs concernés par la problématique des contaminations des eaux littorales, notamment à d'autres gestionnaires, aux élus, aux partenaires financiers ou techniques, comme la Chambre d'Agriculture par exemple, à la Commission Locale de l'Eau (CLE) ou encore aux agriculteurs et conchyliculteurs. Cette transmission des résultats permet principalement aux acteurs désignés comme étant potentiellement impliqués dans les pollutions de prendre les mesures nécessaires pour limiter le déversement d'effluents contaminés dans le milieu naturel.

Les analyses de marqueurs menées en Bretagne présentent une certaine dichotomie au niveau des résultats, qui indiquent le plus souvent des contaminations "d'origine agricole" d'une part (liées aux bovins, aux ovins, aux porcs ou encore à la volaille) et d'origine humaine d'autre part. Les entretiens conduits auprès des maîtres d'ouvrage ont permis de montrer que ces résultats menaient souvent à

la mise en place des mêmes types d'action, dont quelques exemples sont répertoriés dans le Tableau 7.

Tableau 7. Exemples d'actions mises en place suite aux analyses de marqueurs.

<u>Maîtres d'ouvrage concernés</u>	<u>Origine de la contamination</u>	<u>Exemples d'actions mises en place</u>
Cap Atlantique Sivalodet	• Humaine	Travail de concertation avec les structures en charge de l'assainissement (collectif ou non-collectif), par exemple les communes, notamment pour optimiser l'abattage des germes lors du traitement des effluents urbains (certaines structures peuvent d'ailleurs faire pression sur les STEPs pour qu'elles mettent en place des traitements répondant aux problématiques bactériologiques) ²⁷
CCPI		Mise en œuvre de campagnes de contrôle des branchements du réseau d'assainissement (de façon à vérifier notamment que les eaux usées ne se déversent pas dans le réseau d'eaux pluviales ou directement dans l'environnement)
Brest Métropole Cap Atlantique CCPI PNR Golfe du Morbihan	• Bovine ou Porcine (ou plus rarement, liée à la volaille)	Travail avec la Chambre d'Agriculture pour la réalisation de diagnostics des exploitations agricoles, visant à identifier les facteurs de risque pouvant entraîner une contamination des eaux
Cap Atlantique Sivalodet SMEIL		Travail de collaboration avec les agriculteurs sur la base du volontariat pour mettre en place des actions simples et peu onéreuses, comme par exemple aménager des abreuvoirs, des pompes de prairies, des clôtures ou encore éviter le pâturage sur certaines zones dites "à risque" (terrains en pente, ...), etc. Certains maîtres d'ouvrage peuvent même subventionner les agriculteurs souhaitant réaliser des travaux dans l'optique de réduire les contaminations.
Cap Atlantique	• Canine	Communication vis-à-vis des propriétaires de chiens, par exemple <i>via</i> des bulletins municipaux
SMBT	• Liée aux oiseaux marins	Mise en place de techniques d'effarouchage (par exemple, des canons effaroucheurs) pour éloigner les oiseaux

²⁷ Certains acteurs ont cependant évoqué la difficulté d'agir sur l'assainissement non-collectif.

Outre ces actions, les résultats des analyses de marqueurs ont également participé :

- Au lancement de programmes, par exemple :
 - o Le programme 2014-2018 du PNR Golfe du Morbihan, qui avait pour objectifs de cibler des actions à mener et de prioriser des secteurs d'intervention dans le cadre de la réduction des contaminations microbiologiques des eaux (Source : entretien Camille Simon, 25/05/2018).
 - o La « Charte pour la reconquête de la qualité bactériologique des zones conchylicoles et de pêche à pied des Traicts du Croizic et des Barres de Pen Bron » mise en place par Cap Atlantique, qui répertorie les actions que chaque type d'acteur doit mettre en œuvre pour améliorer la qualité bactériologique des eaux au niveau de ces secteurs. Cette charte a permis d'investir de nombreux acteurs institutionnels, ainsi que les représentants des professionnels de la conchyliculture (Source : entretien Catherine Ponthoreau, 18/06/2018).
- A l'évolution de documents de planification, tels que le SAGE de l'Odet : en effet, la dernière version de ce document, approuvé en février 2017, impose la mise aux normes des installations agricoles puisqu'elle devient une obligation réglementaire. Cette nouvelle règle sera mise en application en 2019, afin de laisser le temps aux agriculteurs de réaliser les travaux nécessaires, et entraînera la verbalisation des exploitants dont les installations ne seront pas conformes (Source : entretien Anne-Sophie Blanchard, 22/06/2018).
- A l'élaboration de profils conchylicoles (Source : entretien Antoine Blouin, 27/06/2018) ou de profils de baignade.
- Ou encore, à la caractérisation des risques sanitaires liés aux pollutions : l'étude menée par le SMBT a ainsi montré que les oiseaux marins étaient responsables des contaminations au niveau d'une zone conchylicole de l'Étang de Thau. Ces résultats ont permis d'identifier l'existence d'un danger pour la santé des consommateurs de coquillages puisque certains pathogènes portés par les oiseaux peuvent contaminer les humains (Source : Stéphane Roumeau, 24/08/2018).

Les entretiens ont tout de même permis de mettre en évidence une certaine hétérogénéité des pratiques en ce qui concerne la bancarisation des résultats, que ce soit des analyses *E. coli* ou des analyses de marqueurs. En effet, les maîtres d'ouvrage ne bancarisent pas tous ces données d'une part, et d'autre part, ceux qui le font peuvent utiliser des plateformes différentes :

- Certains disposent ainsi d'une base de données propre à leur structure.
- D'autres bancarisent sur des bases de données à portée régionale, voire nationale, telles que la base de données OSUR de l'Agence de l'Eau, qui répertorie les informations obtenues dans le cadre de la surveillance de la qualité des eaux de surface à l'échelle du bassin Loire-Bretagne (eau-loire-bretagne.fr).
- Enfin, d'autres encore peuvent avoir mis en place des bases de données spécifiques à un territoire : c'est notamment le cas du PNR Golfe du Morbihan, qui a créé un outil de bancarisation des données relatives à l'assainissement et à la qualité des eaux de surface au

niveau du bassin versant de Pénerf, le Web-SIG Cabestan (Source : entretien Camille Simon, 25/05/2018).

Par ailleurs, les entretiens ont également montré que, outre les résultats, la bancarisation des éléments relatifs au prélèvement était aussi très variable selon les acteurs : notamment, les conditions pluviométriques et de marée lors de l'échantillonnage ne semblent pas avoir été bancarisées par un grand nombre de gestionnaires.

4. Avantages et limites de l'approche d'identification par traceurs de sources microbiennes selon les acteurs opérationnels

Lors des entretiens, les différents acteurs rencontrés ont émis leur ressenti vis-à-vis de l'utilisation des marqueurs bactériens dans une optique de réduction des contaminations bactériologiques des eaux et ont exprimé quels étaient, selon eux, les principaux avantages et les principales limites de la méthode.

4.1. Avantages de la méthode

Selon les acteurs territoriaux, le principal avantage des résultats issus des analyses de marqueurs est qu'ils constituent des outils :

- D'information et d'enseignements : en effet, ils apportent des éléments de compréhension dans le cadre de l'étude des contaminations, puisqu'ils permettent l'identification des différentes activités potentiellement à l'origine des pollutions sur le territoire. L'exemple de l'étude menée au niveau de l'Etang de Thau montre que les résultats permettent également, dans une certaine mesure, de préciser le risque sanitaire auquel sont soumis les baigneurs et les consommateurs de coquillages.
- D'aide à la décision : les résultats des analyses confirment ou infirment les hypothèses émises quant à l'origine des contaminations, qui incriminent souvent les systèmes d'assainissement et les activités agricoles. Certaines études ont ainsi permis de "disculper" ces acteurs en indiquant une provenance tout autre des pollutions. Les résultats fournissent donc des pistes de réflexion aux gestionnaires, en particulier quand les observations de terrain ne suffisent pas à identifier l'origine des contaminations, et permettent de :
 - o cibler les actions adéquates à mener afin de répondre aux problèmes de qualité microbiologique des eaux ;
 - o identifier des zones plus problématiques que d'autres et prioriser les secteurs d'intervention. Par exemple, dans le cadre de son projet de contrôle de 2000 points de branchement du réseau d'assainissement sur un an, la CCPI a pu compter sur la méthode pour pouvoir hiérarchiser les secteurs à examiner en priorité (Source : entretien Anne Danse et Aude Mahot, 19/07/2018).
- De communication : enfin, les résultats permettent d'ouvrir la discussion avec les différents acteurs impliqués dans les contaminations, les autres maîtrises d'ouvrage du territoire ou encore les divers partenaires techniques et financiers (Chambre d'Agriculture, ...). Ils

représentent un argument de poids pour convaincre, puisqu'ils montrent assez clairement, de manière neutre et objective, qui sont les contributeurs et apportent du crédit aux observations de terrain, ce qui permet à chaque acteur désigné de prendre ses responsabilités.

4.2.Limites de la méthode

Les acteurs ont également identifié un certain nombre de limites liées à l'utilisation des marqueurs, avec en premier lieu le prix des analyses : en effet, il faut compter au minimum 190 euros pour l'analyse d'un échantillon (Source : entretien Gaël Durand, 24/07/2018), en sachant qu'il faut réaliser plusieurs analyses par point pour permettre une interprétation fiable des résultats. Beaucoup d'acteurs estiment ainsi qu'il existe un déséquilibre entre le coût d'application de la méthode et sa plus-value. Par ailleurs, il est important de rappeler que les maîtres d'ouvrage disposent d'un budget restreint dédié à la problématique de contamination des eaux qui, souvent, ne leur permet pas de mener un grand nombre d'analyses.

Certains acteurs regrettent aussi que la méthode ne permette pas d'estimer la contribution de chaque origine de contamination identifiée. En effet, il leur semble complexe de déterminer quelles actions mettre en œuvre en priorité sans avoir connaissance de l'origine la plus contributrice

Remarque : d'autres maîtrises d'ouvrage, à l'inverse, ne partagent pas ce point de vue : selon elles, si la quantification des contributions était possible, les gestionnaires auraient tendance à concentrer les efforts sur l'origine la plus problématique au risque de négliger les autres.

Le manque de précision des résultats vis-à-vis des origines de contamination apparaît également comme un facteur limitant l'utilisation de la méthode par les acteurs de l'eau : en effet, les marqueurs bactériens ciblent des groupes d'espèces et non des espèces précises (par exemple, les marqueurs porcins ciblent les germes issus des cochons sauvages et domestiques, etc.). De plus, certaines origines, comme les rongeurs, ne sont pas encore identifiables²⁸.

Enfin, les acteurs ont aussi évoqué le fait que :

- La méthode n'est pas applicable directement dans les coquillages.
- Les marqueurs présentent une faible persistance dans l'environnement : ainsi, si l'échantillonnage est réalisé au lendemain d'une forte contamination et pas le jour même, les marqueurs ne seront probablement pas détectés lors de l'analyse par PCR.

²⁸ Cependant, les laboratoires peuvent éventuellement développer des marqueurs spécifiques à la demande de maîtres d'ouvrage : Cap Atlantique a ainsi demandé à Labocéa de développer des amorces ciblant les rongeurs (Source : entretien Catherine Ponthoreau, 18/06/2016 ; entretien Gaël Durand, 12/06/2018).

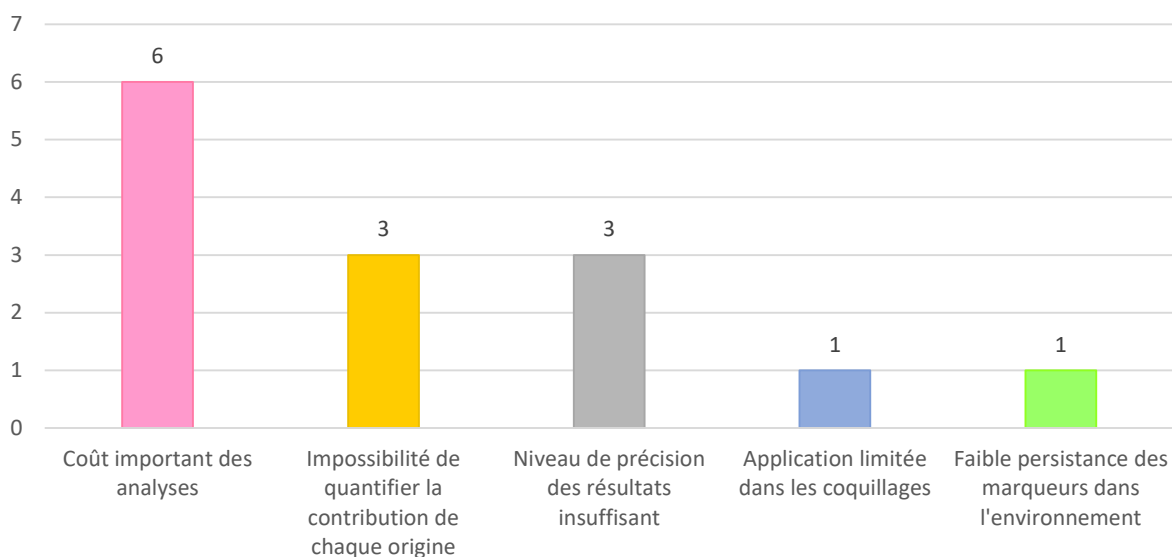




Figure 21. Principales limites citées par les acteurs interrogés.

4.3.Synthèse

Principaux avantages des marqueurs bactériens selon les acteurs 	Principaux inconvénients des marqueurs bactériens selon les acteurs 	Préconisations formulées par les acteurs
<ul style="list-style-type: none"> - Outil : * d'information * d'aide à la décision * de communication 	<ul style="list-style-type: none"> - Coût important des analyses - Impossibilité de quantifier la contribution de chaque origine - Niveau de précision des résultats insuffisant - Application limitée dans les coquillages - Faible persistance des marqueurs dans l'environnement 	<ul style="list-style-type: none"> - Choisir les points de prélèvement soigneusement et de façon stratégique - Cibler les marqueurs à appliquer en fonction de l'occupation des sols, des profils d'élevage et des profils d'épandage (notamment pour limiter les coûts) - Réaliser plusieurs analyses par point entre 2 et 6) pour asseoir et pouvoir traiter statistiquement les résultats - Mener des études ou des diagnostics territoriaux pour : * Se faire une idée préalable des sources potentielles de contamination * Conforter les résultats des analyses

V. Recommandations et perspectives sur l'utilisation des méthodes d'identification de l'origine des contaminations

1. Principales recommandations issues de l'analyse

Les enseignements tirés de l'étude, notamment des entretiens avec les acteurs de la sphère opérationnelle, ont permis d'aboutir à un certain nombre de recommandations, concernant à la fois :

- L'amélioration du transfert de connaissances ;
- La définition précise des modalités de mise en œuvre ;
- L'élaboration d'un guide technique à destination des maîtres d'ouvrage.

1.1. Améliorer le transfert des connaissances

1.1.1. Optimiser l'information et la communication du monde de la recherche vers la sphère opérationnelle

Les résultats de l'étude mettent en évidence que les méthodes analytiques permettant d'identifier l'origine des contaminations sont relativement peu utilisées par la sphère opérationnelle. Ce phénomène s'explique d'une part par une offre très restreinte en termes de prestation par les laboratoires d'analyse sur le territoire français, mais également par une méconnaissance de ces procédés du côté des maîtres d'ouvrage (un certain nombre d'entre eux ont par ailleurs expliqué avoir utilisé ces méthodes du fait d'un phénomène de "mimétisme" vis-à-vis des autres gestionnaires, sans en connaître forcément les avantages et les inconvénients).

Ainsi, il pourrait être bénéfique de développer davantage la communication entre ces deux parties, notamment en favorisant :

- L'intégration des acteurs territoriaux dans les projets expérimentaux menés sur site par les chercheurs ;
- La mise en place de colloques de présentation des projets de R&D ;
- Et éventuellement, la rédaction de publications de recherche accessibles à la compréhension d'un plus vaste public, qui ne possède pas forcément de connaissances scientifiques "poussées".

Le développement des échanges entre ces deux sphères pourrait s'avérer également bénéfique puisqu'il permettrait aux acteurs du territoire de prendre connaissance de méthodes qui pourraient éventuellement leur apporter des réponses dans le cadre de leurs activités. Par ailleurs, une meilleure compréhension du principe de fonctionnement des méthodes devrait également conduire à une meilleure compréhension, et donc une meilleure interprétation, des résultats obtenus.

1.1.2. Mettre en lumière les retours d'expérience des maîtrises d'ouvrage

Dans une optique d'amélioration de la connaissance de la sphère opérationnelle, il pourrait également être intéressant de développer les échanges entre les maîtres d'ouvrage "néophytes" en ce qui concerne l'application des méthodes analytiques et ceux qui possèdent davantage d'expérience dans ce domaine.

Du fait de leur approche plus "pratique" des méthodes, les acteurs territoriaux pourraient également présenter leurs retours d'expérience aux chercheurs, ce qui permettrait à ces-derniers de mieux cerner les attentes de la sphère opérationnelle, ainsi que les limites auxquelles elle est confrontée dans le cadre de la mise en œuvre d'études et projets, d'ordre budgétaire notamment : ces notions sont en effet peut-être plus difficilement appréhendables par les acteurs du monde de la recherche.

1.2. Définir précisément les modalités de mise en œuvre

1.2.1. Bien identifier les objectifs de suivi

Afin de tirer le meilleur profit possible des résultats, il semble essentiel que les maîtres d'ouvrage définissent clairement les objectifs qu'ils cherchent à atteindre à travers la réalisation des analyses de marqueurs. Notamment, d'après les entretiens menés auprès des acteurs territoriaux, il n'est pas rare que ces analyses indiquent une origine mixte de la contamination (sans toutefois permettre d'estimer la contribution de chaque origine). Ainsi, la méthode d'identification doit être appliquée en vue de répondre à des questions précises et déterminées au préalable.

1.2.2. Caractériser les contaminations préalablement à la mise en œuvre de la recherche des origines

Avant application de la méthode, il est essentiel de bien caractériser les contaminations, notamment pour réduire une première fois le champ des recherches quant à leur origine potentielle et ainsi mieux cibler les analyses, que ce soit dans l'espace ou dans le temps.

- Via la réalisation d'analyses *E. coli*

L'évaluation de la concentration en *E. coli* et des flux bactériens à divers points stratégiques le long du réseau hydrographique (principales confluences, exutoires des sous-BV, ...) fournit en effet un certain nombre d'informations sur les pollutions, et permet notamment de déterminer :

- La localisation des foyers de contamination ;
- Les périodes propices à l'apparition des contaminations.

Ces données conduisent à l'identification des principaux sous-secteurs problématiques du territoire d'étude, sur lesquels concentrer les recherches des sources de contamination.

- [Via la conduite de diagnostics territoriaux](#)

La réalisation de diagnostics territoriaux a pour principal objectif d'identifier des sources potentielles de contamination sur le territoire, notamment pour pouvoir cibler par la suite les marqueurs bactériens à utiliser dans le cadre de l'analyse.

Le croisement des données obtenues *via* les analyses *E. coli* et les diagnostics territoriaux peut permettre de formuler des hypothèses quant à l'origine des contaminations, qui seront alors confirmées ou infirmées par la conduite d'analyses de marqueurs. Une perspective intéressante serait ainsi d'élaborer un protocole de recherche et d'enquête, à mettre en œuvre avant l'application des méthodes TSM pour formuler des suppositions relatives à la provenance des pollutions.

Remarque : La réalisation d'analyses *E. coli* le long du réseau de cours d'eau associée à une bonne connaissance des facteurs de pression au niveau des foyers de contamination identifiés peut potentiellement permettre d'identifier les origines probables de contamination. En termes de coût lié aux analyses, cette méthode s'avère beaucoup plus économique que la mise en œuvre d'analyses de traceurs puisqu'un dénombrement *E. coli* coûte globalement entre 15 et 25 euros selon les laboratoires (Source : entretien Floriane De Luca, 18/05/2018). En revanche, elle est plus coûteuse du point de vue du temps et des moyens humains mobilisés. Par ailleurs, ce procédé mène à la formulation d'hypothèses, et non à l'obtention de résultats chiffrés comme les analyses de traceurs, ce qui peut potentiellement entraver la conduite des discussions avec les acteurs incriminés.

1.2.3. [Adapter les modalités de prélèvement et d'analyse aux objectifs](#)

a. [Anticiper les analyses de marqueurs dans le cas de pollutions ponctuelles](#)²⁹

Un suivi régulier de la concentration en *Escherichia coli* dans les eaux au niveau des secteurs problématiques pourrait potentiellement permettre de caractériser les contaminations, et notamment d'identifier les conditions qui favorisent leur occurrence : en principe, il serait donc possible de prévoir l'apparition d'une pollution qui survient de manière ponctuelle.

Dans le cas où les maîtres d'ouvrage cherchent à déterminer l'origine d'une pollution ponctuelle, il est important que les analyses de marqueurs portent bien sur la masse d'eau qui porte cette contamination et pas sur une autre, qui pourrait par exemple être contaminée de façon moins importante : les acteurs opérationnels doivent donc anticiper la survenue de cette pollution et réaliser un double flaconnage (avec un échantillon destiné à l'analyse *E. coli* et un échantillon destiné à l'analyse de marqueurs) au moment approprié. Le prélèvement sera soumis à un pré-traitement puis analysé si les résultats de l'analyse *E. coli* montrent bien une contamination³⁰.

²⁹ Ponctuelles dans le temps, par opposition aux pollutions continues.

b. Adapter la localisation des points de prélèvement

• A la taille du territoire

La réalisation d'analyses *E. coli* préalablement à la conduite de l'étude est préconisée pour identifier les sous-secteurs problématiques où concentrer les analyses de traceurs. Cependant, cette recommandation est à nuancer puisque la localisation des points de prélèvement peut également s'adapter aux caractéristiques du territoire, notamment à sa taille et à la densité de son chevelu hydrographique. Il est ainsi possible de distinguer :

- Les territoires de petite taille présentant un chevelu hydrographique relativement simple (Figure 22. Localisation des points de prélèvement de la CCPF.). Sur ces territoires, il peut sembler pertinent de ne réaliser les prélèvements qu'au niveau des zones les plus en aval puisque les actions à visée correctives pourront être mises en place sur l'ensemble du secteur, au vu de sa taille raisonnable, et il ne semble pas nécessaire de délimiter des sous-secteurs plus problématiques. De même, la "simplicité" du réseau hydrographique pourra potentiellement permettre une identification rapide des problèmes à l'origine des pollutions.
- Les territoires de grande taille et à réseau hydrographique dense (Figure 23). Les actions visant à réduire les pollutions peuvent difficilement être conduites sur l'ensemble de ces territoires, du fait de leur taille conséquente ou de la complexité de leur réseau de cours d'eau, qui entraîne une démultiplication des sources potentielles de contamination. Dans ce cas, il vaut donc mieux s'appuyer sur les résultats des analyses *E. coli* pour localiser les foyers de contamination avant de débiter les analyses de traceurs.

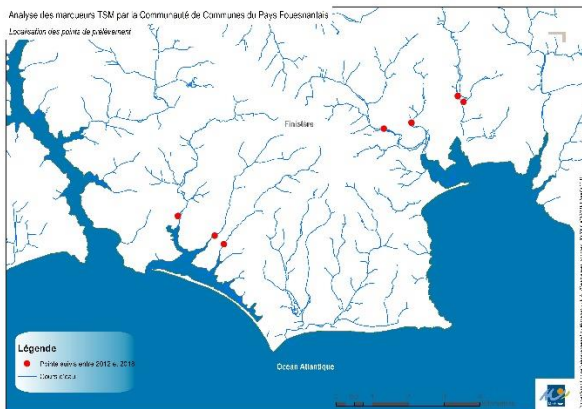


Figure 22. Localisation des points de prélèvement de la CCPF.

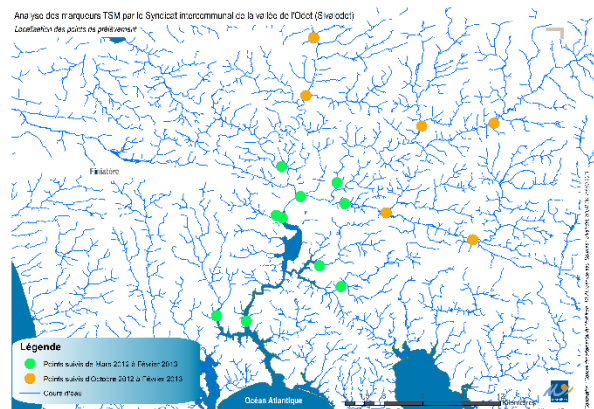


Figure 23. Localisation des points de prélèvement du Sivalodet dans le cadre de l'étude du bassin versant de l'Odet (Source : ...).

La distinction faite entre ces deux types de territoire dépend donc principalement de la possibilité de mettre en œuvre des actions adaptées sur leur ensemble ou non.

• Aux facteurs de pression du territoire

De même, il pourrait éventuellement être intéressant de localiser les points de prélèvement de façon à prendre en compte les potentielles sources de contamination, telles que les points de rejet des

stations d'épuration (urbaines et industrielles), les postes de relevage, les zones d'épandage, les points d'abreuvement direct aux cours d'eau, etc., et ainsi déterminer si elles contribuent aux pollutions ou pas ([Annexe 8 : Carte d'occupation du sol localisant les potentielles sources de contamination](#)).

c. [Réaliser les prélèvements de façon espacée dans le temps et sous différentes conditions](#)

Tout comme les analyses *E. coli*, les analyses de traceurs devraient être conduites sur une certaine durée, notamment afin de :

- Suivre l'évolution des contaminations dans le temps ;
- Réaliser des prélèvements sous différentes conditions (de pluviométrie, de marée, ...) (voir partie 2.4.a.) (dans la mesure du possible car certaines contaminations n'apparaissent que sous des conditions particulières) ;
- Ou encore prendre en compte des événements potentiellement impactants pour la qualité des eaux, comme les épandages de lisiers/fumiers, l'ouverture des maisons secondaires en période estivale, la présence de manifestations (hippiques, ...), etc.

A titre d'exemple, le LSEM de l'Ifremer, qui a grandement participé au développement des méthodes TSM en France, réalise généralement des études sur 1 ou 2 ans, avec des prélèvements une fois par mois (Gourmelon 2014).

d. [Ajuster le nombre d'analyses](#)

Chaque point de prélèvement doit faire l'objet d'un certain nombre d'analyses de marqueurs, notamment pour :

- Permettre une bonne interprétation et valider statistiquement les résultats obtenus. En effet, ces-derniers peuvent se montrer très variables d'une analyse à l'autre : cette variabilité est bien illustrée par le [Tableau 8](#), qui regroupe les résultats de l'étude menée par le PNR Golfe du Morbihan sur la rivière de Pénerf. Par ailleurs, rappelons que la méthode ne permet pas de quantifier la contribution de chaque origine détectée. Ainsi, il est possible qu'un marqueur apparaisse dans les résultats alors qu'il correspond à une contamination ponctuelle de faible importance : cependant, sa contribution ne pouvant pas être déterminée, seule la réalisation d'autres analyses permettra d'aboutir à cette conclusion.
- Evaluer la récurrence en termes de détection des différentes origines. Cette information permet ainsi d'estimer les origines des pollutions dites ponctuelles, c'est-à-dire qui surviennent de temps à autre, et celles des pollutions continues.

Tableau 8. Exemples de résultats obtenus pour deux points de prélèvement de l'étude de la rivière de Pénerf (Source : PNR Golfe du Morbihan).

	Juin 2013	Juil. 2013	Août 2013	Sept. 2013	Oct. 2013	Nov. 2013	Déc. 2013	Mai 2014	Juin 2014	Août 2014
Point n°1										
Marqueur humain	ND	ND					Déecté	Quantifié	ND	ND
Marqueur ruminant	ND	ND					Quantifié	ND	ND	Quantifié
Marqueur porcin	ND	ND					Quantifié	Déecté	ND	ND
Point n°2										
Marqueur humain	ND			Quantifié	ND		Déecté	ND		
Marqueur ruminant	Quantifié			ND	ND		Quantifié	Quantifié		
Marqueur porcin	ND			ND	Quantifié		Quantifié	ND		

Les acteurs ont globalement préconisé de réaliser entre 3 et 6 analyses par point.

1.2.4. Optimiser la gestion, l'interprétation et la valorisation des résultats

a. Corréler les résultats

Les résultats des analyses de marqueurs ne se suffisent pas à eux-mêmes et doivent être corrélés à d'autres éléments, notamment :

- Au taux d'*Escherichia coli* dans les eaux

Puisque les marqueurs ne peuvent pas être quantifiés, il est primordial de bien associer les résultats d'analyse aux concentrations en *E. coli* dans les eaux. En effet, ces données permettent de distinguer les origines des pics de contamination et celles des contaminations de fond :

- Les origines des pics de contamination seront ainsi celles qui apparaîtront uniquement quand les taux d'*E. coli* seront les plus importants ;
- A l'inverse, les origines des contaminations de fond seront celles détectées même quand les taux d'*E. coli* dans les eaux seront plus faibles.

Les résultats des analyses *E. coli* permettent donc une certaine hiérarchisation des origines de contamination en termes d'impact sur la qualité des cours d'eau, ainsi que l'identification des origines les plus problématiques.

- [Aux conditions pluviométriques](#)

Une bonne connaissance des conditions pluviométriques auxquelles surviennent les contaminations permet d'en apprendre beaucoup sur leur provenance. Par exemple, il est possible de supposer qu'une contamination qui n'apparaît que par temps de pluie est due au ruissellement sur des parcelles portant des déjections ou encore à une surcharge des systèmes d'assainissements. Au contraire, une contamination qui survient par tous les temps pourrait s'expliquer par le rejet direct des germes dans le milieu naturel, *via* l'abreuvement du bétail dans les cours d'eau par exemple, à des défaillances en ce qui concerne le traitement des effluents dans les stations d'épuration, aux déjections d'oiseaux dans le milieu, etc. Il est donc également nécessaire de raccorder ces paramètres aux résultats des analyses de marqueurs dans le cadre de l'étude des origines de pollution.

- [Aux conditions de marée/de débit](#)

Les conditions de débit et de marée présentent aussi un impact sur la qualité des eaux. En effet, au niveau des cours d'eau, les contaminations vont être favorisées par de faibles débits, en période d'étiage notamment, du fait d'une dilution moindre des eaux. Au niveau des exutoires en revanche, ce sont les périodes de vives-eaux qui, du fait des forts coefficients de marée, sont les plus propices à l'apparition des pollutions. Ces conditions doivent donc être associées aux taux d'*E. coli* dans les eaux et aux résultats des analyses de marqueurs pour bien déterminer l'importance relative des différentes origines de contamination.

- [A la localisation des sources potentielles de contamination sur le territoire](#)

- [A la date de prélèvement](#)

Enfin, la date du prélèvement peut également avoir son importance dans l'interprétation des résultats des analyses de marqueurs, puisque ces-derniers peuvent par exemple être corrélés :

- aux périodes d'épandage autorisé dans le cas de pollutions d'origine bovine ou porcine³¹ ;
- A la période estivale dans le cas de pollutions d'origine humaine ;
- ou à l'occurrence d'autres événements.

Remarque : L'identification des origines des contaminations passe donc par un **travail de déduction**, qui nécessite de corréler des informations de diverses natures (résultats d'analyse, observations de terrain, ...) et ne se base pas uniquement sur les résultats issus des analyses de marqueurs.

³¹ Il faut également prendre connaissance des types de déjections (bovines, porcines) à partir desquelles sont créés les lisiers et les fumiers sur le territoire (Idhesa 2013).

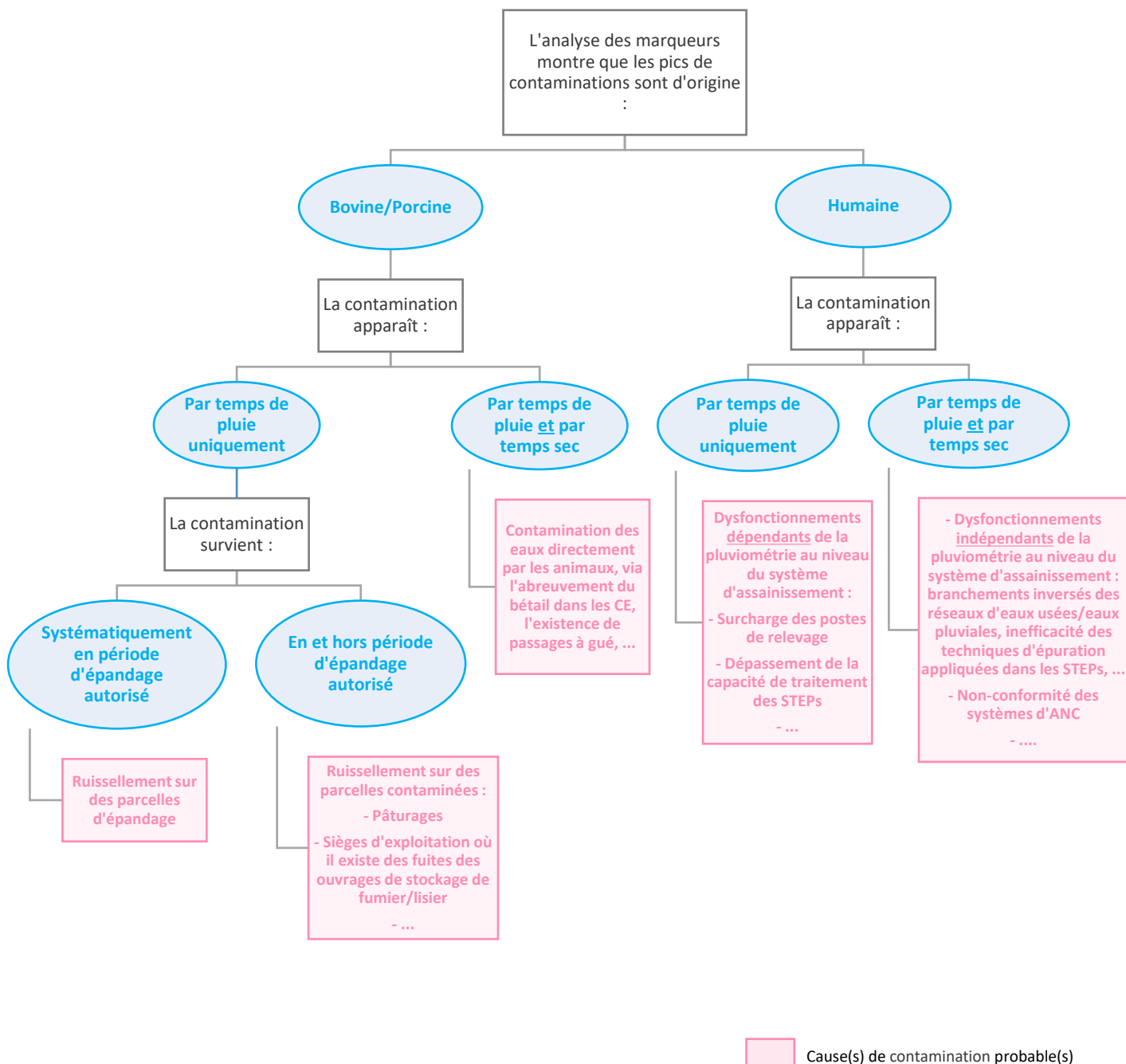


Figure 24. Exemple de réflexion permettant de préciser la cause d'une pollution microbologique des eaux.

Tout ce travail ne permettra pas d'identifier de façon précise la source de la contamination mais permettra au moins d'éliminer des sources potentielles pour pouvoir cibler des actions à mettre en œuvre.

b. Améliorer et étoffer la bancarisation des données

En vue de corrélérer les diverses informations disponibles pour préciser au mieux la provenance des contaminations (voir partie a), une bancarisation rigoureuse des données est nécessaire. Les acteurs sont ainsi encouragés à bancariser un certain nombre d'éléments lors de chaque prélèvement et chaque analyse, notamment : les résultats des analyses de marqueurs, le taux d'*E. coli* dans les eaux, la pluviométrie, le débit et le coefficient de marée lors de l'échantillonnage, ou encore la date du prélèvement. Les modalités de bancarisation pourraient éventuellement être formalisées au sein d'un protocole commun aux acteurs du territoire.

L'optimisation de la bancarisation permettrait également de faciliter le transfert des informations entre opérateurs d'une même structure, entre différents maîtres d'ouvrage, etc.

c. Centraliser les données

Comme l'ont montré les entretiens, les maîtres d'ouvrage ne bancarisent pas tous sur la même base de données : certains disposent en effet de leur base de données personnelle, d'autres utilisent des bases de données "collectives", etc. Il pourrait ainsi être intéressant qu'une structure unique centralise les données issues des études menées par les gestionnaires, à l'échelle du département par exemple, en vue notamment de les rendre plus accessibles : dans l'optique de l'impliquer davantage dans les actions menées par la sphère opérationnelle, cette structure pourrait être le Conseil Départemental du Morbihan.

Cette mutualisation des données serait d'autant plus bénéfique que certains maîtres d'ouvrage ont des portions de leurs territoires d'action en commun, comme le montre la [Figure 15](#).

d. Mettre en valeur les actions via la conduite d'analyses bactériologiques avant et après travaux

Enfin, l'efficacité des actions mises en œuvre dans une optique de réduction des contaminations microbiennes des eaux pourrait être valorisée à travers la conduite d'analyses bactériologiques avant et après travaux : des analyses *E. coli* mais également des analyses TSM. En effet, si les analyses de marqueurs ne permettent pas de déterminer l'abondance d'un marqueur par rapport à un autre, il est en revanche possible de comparer les concentrations d'un même marqueur et ainsi, par exemple, de suivre l'évolution du taux de marqueurs humains ou bovins/porcins dans les eaux après la conduite de travaux liés à l'assainissement ou aux activités agricoles, respectivement.

1.3. Mettre en place un guide technique visant à homogénéiser et aider les pratiques sur le territoire

L'élaboration d'un guide technique visant à homogénéiser les modalités de mise en œuvre des analyses TSM à l'échelle du département pourrait constituer une perspective intéressante à envisager. Ce guide constituerait une aide à la fois pour l'identification des objectifs et des éléments de protocole à mettre en œuvre, apportant par exemple des conseils aux maîtres d'ouvrage vis-à-vis

de la localisation des points de prélèvement, des conditions (pluviométriques, de débit, ...) et de la fréquence d'échantillonnage ou encore du nombre d'analyses à mener par point pour valider l'interprétation des résultats. Ce document fournirait cependant des indications globales qu'il conviendrait d'adapter à chaque contexte : en effet, chaque étude doit s'adapter au territoire concerné et aux contaminations qui en font l'objet.

En ce qui concerne la conduite des analyses à proprement parler, elle est pour l'instant très similaire entre les différentes maîtrises d'ouvrage, puisque presque tous les acteurs interrogés ont fait appel au même laboratoire prestataire (Labocéa). Cependant, si de nouveaux prestataires venaient à apparaître sur le marché, il serait nécessaire d'harmoniser les protocoles d'analyse afin que les différents acteurs opérationnels puissent obtenir des résultats comparables.

Ainsi, pour conclure :

Principales recommandations issues de l'étude			
1.1. Améliorer le transfert des connaissances			
Optimiser l'information et la communication du monde de la recherche vers la sphère opérationnelle		Mettre en lumière les retours d'expérience des maîtrises d'ouvrage	
1.2. Définir précisément les modalités de mise en œuvre			
Bien identifier les objectifs de suivi	Caractériser les contaminations préalablement à la mise en œuvre des analyses :	Adapter les modalités de prélèvement et d'analyse aux objectifs	Optimiser la gestion, l'interprétation et la valorisation des résultats
	<ul style="list-style-type: none"> * <i>Via</i> la réalisation d'analyses <i>E. coli</i> * <i>Via</i> la conduite de diagnostics territoriaux 	<ul style="list-style-type: none"> * Anticiper les analyses * Adapter la localisation des points de prélèvement * Réaliser les prélèvements de façon espacée dans le temps et sous différentes conditions * Ajuster le nombre d'analyses 	<ul style="list-style-type: none"> * Corréler les résultats * Améliorer et renforcer la bancarisation des données * Centraliser les données * Mettre en valeur les actions <i>via</i> la conduite d'analyses bactériologiques avant et après travaux
1.3. Mettre en place un guide technique visant à homogénéiser et aider les pratiques sur le territoire			

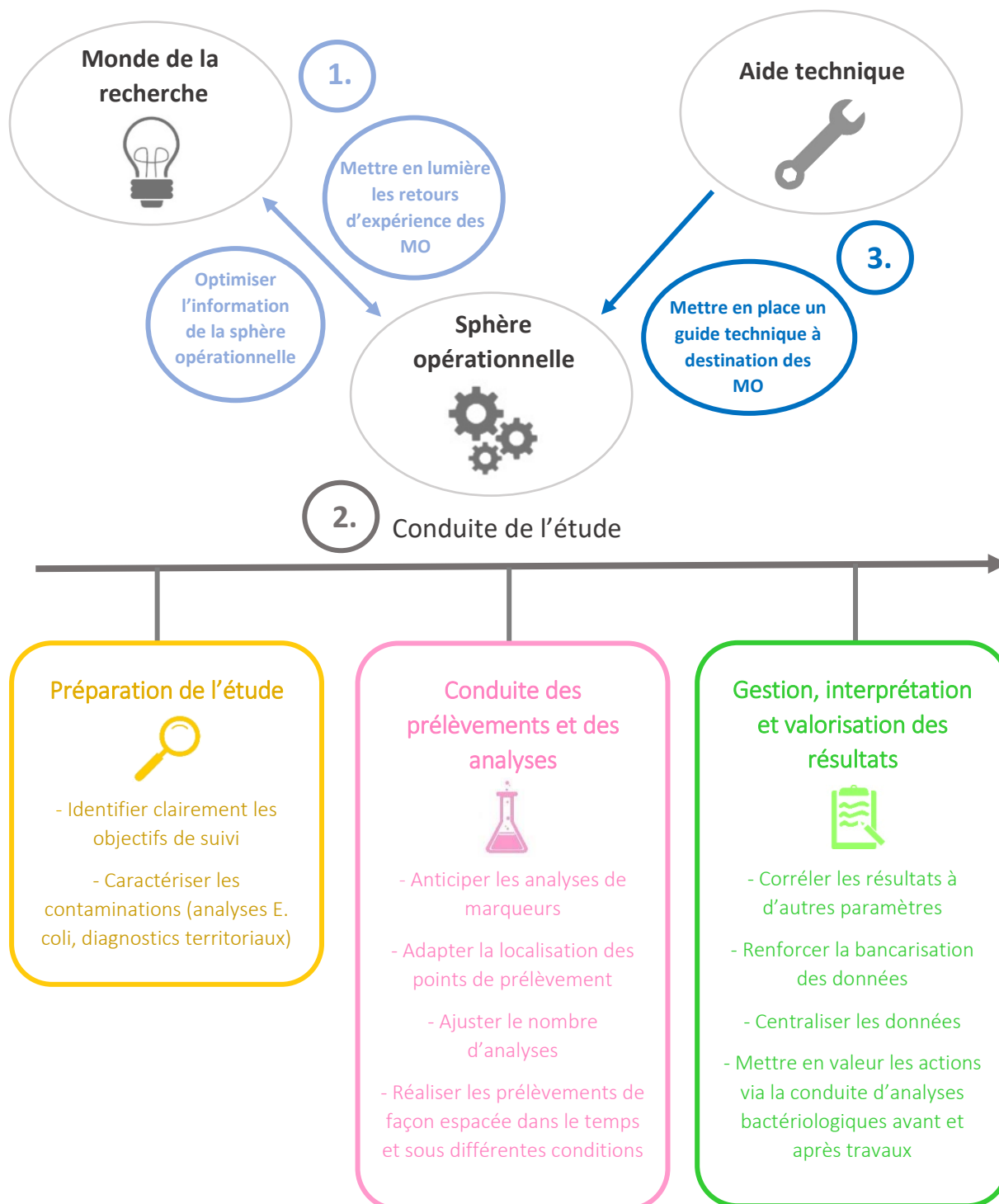


Figure 25. Schéma synoptique des recommandations formulées à l'issue de l'étude.

2. Perspectives

2.1. Association de différents marqueurs dans des boîtes à outils

A ce jour, les marqueurs bactériens semblent être les plus performants pour déterminer l'origine des contaminations. Cependant, l'analyse comparative des différentes méthodes TSM (voir partie [III.4.](#)) a montré que chacune d'elles présentaient des avantages et des limites, et qu'il n'existait pas de méthode "parfaite".

Afin de prévenir ces limites et d'accroître leur pouvoir discriminant, les différents marqueurs peuvent être utilisés de façon combinée, constituant ainsi une boîte à outils (ou "MST Toolbox") (Gourmelon 2014, Pourcher et *al.* 2012, Jardé et *al.* 2018). Le projet BacTrac (voir partie [IV.1.](#) **Transfert de connaissances du monde de la recherche vers la sphère opérationnelle**) porte justement sur le développement de boîtes à outils, associant notamment des marqueurs bactériens et mitochondriaux (Source : entretien Amélie Charrier, 13/07/2018). Ces deux types de marqueurs semblent en effet particulièrement complémentaires puisque :

- D'une part, les marqueurs bactériens sont plus facilement détectés dans l'environnement que les marqueurs mitochondriaux, du fait de leur présence en quantité importante dans les fèces ;
- D'autre part, les marqueurs mitochondriaux sont plus spécifiques que les marqueurs bactériens, et permettent de préciser davantage l'origine de la contamination.

Cependant, l'analyse d'une boîte à outils coûterait probablement encore plus cher que celle de marqueurs bactériens seuls (Source : entretien Isabelle Vitte, 24/07/2018), ce qui constitue un frein de première importance pour les acteurs de la sphère opérationnelle.

2.2. Optimisation des protocoles d'analyse

En vue d'optimiser l'efficacité des méthodes, la sphère scientifique travaille actuellement sur l'amélioration des différentes étapes de l'analyse, et plus spécialement sur la phase d'extraction de l'ADN, qui pose problème pour l'analyse de matrices autres que l'eau.

Certains laboratoires commencent également à contrôler la qualité de mise en œuvre des méthodes. Ce contrôle passe par l'ajout d'une bactérie spécifique dans l'eau à prélever à une concentration connue : la bactérie est filtrée en même temps que les marqueurs TSM puis analysée par PCR, en sachant que les inhibiteurs de PCR vont l'impacter de la même façon que les marqueurs. De cette façon, il est ainsi possible de prendre connaissance du rendement du protocole et ainsi comparer entre eux différents échantillons analysés. Ce procédé permet notamment de confirmer que l'absence de marqueurs dans l'eau est bien due à une absence de contamination et non pas à un dysfonctionnement au niveau de l'application de la méthode (Source : entretien Amélie Charrier, 13/07/2018).

2.3. Développement de méthodes alternatives basées sur la spectrométrie

Les méthodes microbiologiques d'identification présentées dans cette étude se basent toutes sur la caractérisation de l'ADN (ou l'ARN) des germes contenus dans les prélèvements. Ces méthodes font cependant face à des limites pour l'analyse des coquillages, du fait de la difficulté à extraire le matériel génétique de cette matrice.

Pour répondre à ce problème, les recherches se penchent vers de nouvelles méthodes, qui impliquent :

- Dans un premier temps, l'isolement des bactéries présentes dans les échantillons par culture, ce qui permet de s'affranchir de la matrice ;
- Dans un second temps, l'analyse de la composition protéique des colonies bactériennes isolées par spectrométrie.

La caractérisation des protéines contenues dans les germes va en effet permettre de déterminer le genre et l'espèce de certaines bactéries, et ainsi relier la pollution à une origine particulière si ces bactéries sont hôte-spécifiques (Sources : Cariello & Tissières Lovey 2012 ; entretien Guenhaëlle Le Jeune, 29/05/2018). Néanmoins, tout comme la méthode de typage des bactéries (voir partie III.2.), ces méthodes nécessitent la constitution d'une base de données conséquente puisque le "spectre de molécules" obtenu suite à l'analyse doit être comparé à ceux de bactéries connues (Source : Polet, Botteldoorn & Dierick 2015). Deux de ces méthodes ont été abordées par les acteurs au cours de l'étude :

- **La méthode d'analyse par spectrométrie de masse MALDI-TOF** (Matrix-Assisted Laser Desorption-Ionization – Time Of Flight), qui fait actuellement l'objet de développements par le laboratoire Qualyse (17) (Source : entretien Michael Treilles, 20/09/2018).
- **La méthode développée par le PNR Golfe du Morbihan et l'Institut de Recherche Dupuy de Lôme de l'UBS³²**, qui vise à analyser les composantes membranaires des bactéries par spectrométrie infrarouge (Source : Camille Simon).

Ces méthodes font encore l'objet d'expérimentations mais peuvent compléter le schéma de la partie III ([Figure 26](#)).

³² Université de Bretagne-Sud

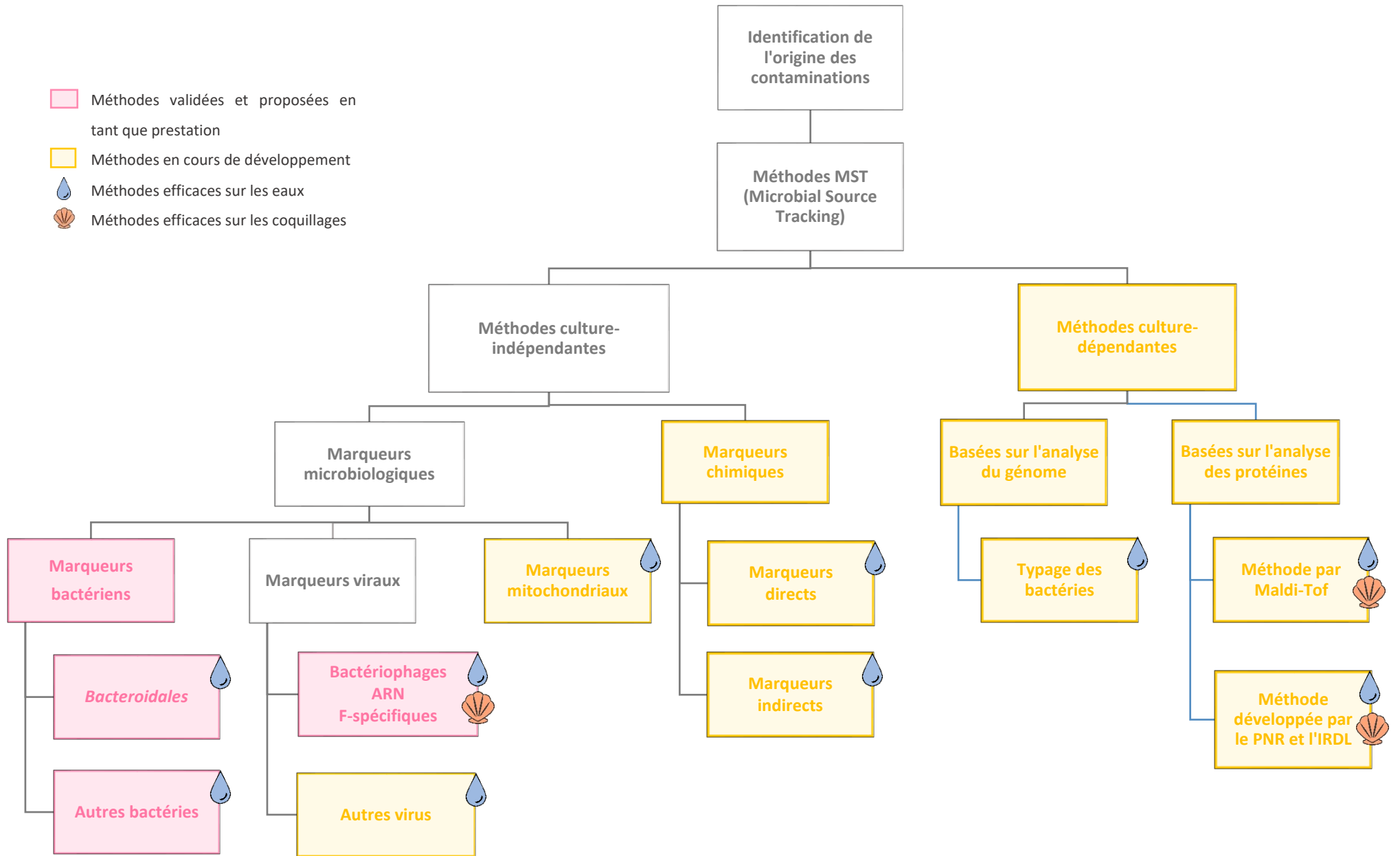


Figure 26. Synthèse des méthodes identifiées dans le cadre de cette étude.

Discussion

L'inventaire des différentes méthodes d'identification réalisé dans le cadre de cette étude ne visait pas l'exhaustivité. En effet, de nombreuses méthodes, plus ou moins efficaces, ont été développées depuis les années 1990. Celles décrites dans ce rapport ont ainsi été choisies du fait de leur caractère "prometteur" ou parce qu'elles font l'objet de projets de recherche actuellement.

Il en va de même pour l'état des pratiques mises en œuvre par les maîtres d'ouvrage : en effet, l'étude avait pour but d'aboutir à une vision précise des actions menées à l'échelle du Morbihan uniquement. Cependant, au vu du faible nombre de gestionnaires ayant utilisé les méthodes TSM dans le département, les recherches ont été étendues au reste du territoire français, mais ce avant tout dans le but d'apporter davantage de matière en vue de l'analyse.

Par ailleurs, il faut souligner que l'analyse présentée ici dépend fortement des données et des informations que les acteurs du territoire étaient en capacité de fournir. En effet, certaines études menées par les acteurs ont fait l'objet de rapports détaillés (rédigés par le maître d'ouvrage ou le laboratoire prestataire), contrairement à d'autres, dont les résultats ou encore les modalités de prélèvement n'ont pas forcément été bancarisés. Selon les acteurs, le niveau de précision des informations récoltées pouvait ainsi être variable.

Il faut également prendre en compte le fait que certaines études ont été conduites au tout début des années 2010, au moment où la méthode commençait à peine à être proposée par les laboratoires, voire même avant dans le cadre de projets expérimentaux : cette information contribue à expliquer les différences observées dans la façon de procéder entre les acteurs.

Enfin, l'analyse présente également une part de subjectivité, puisqu'elle s'appuie notamment sur le ressenti des maîtres d'ouvrage vis-à-vis de l'application de la méthode.

Conclusion

L'étude a permis de mettre en évidence l'utilisation encore peu répandue des méthodes TSM par les acteurs en charge de la gestion de la qualité des eaux. En effet, seul un nombre restreint de maîtres d'ouvrage semble appliquer ces méthodes, que ce soit dans le Morbihan ou ailleurs en France, et généralement, ces analyses prennent place dans le cadre d'études ponctuelles. Plusieurs raisons peuvent expliquer cette situation.

Tout d'abord, les méthodes MST n'ont été développées que très récemment. En effet, si les premiers travaux sur le sujet ont été initiés à la fin des années 1960 (Hartard 2017), l'analyse de marqueurs bactériens (les seuls utilisés par la sphère opérationnelle) n'est proposée par les laboratoires d'analyse des eaux que depuis le début des années 2010, à la suite du projet Marquopoleau.

Ensuite, l'offre en termes de prestation d'analyse est actuellement très limitée sur le territoire français, notamment du fait d'une absence de demande de la part des gestionnaires territoriaux. Or, celle-ci semble s'expliquer principalement par une méconnaissance des maîtres d'ouvrage en ce qui concerne les dernières méthodes développées, qui pourrait être due à un transfert insuffisant des savoirs du monde de la recherche vers la sphère opérationnelle mais également, dans une certaine mesure, au caractère restreint de l'offre sur le marché. De façon très simplifiée, la situation peut être résumée par le schéma suivant :



Les résultats obtenus par l'analyse des marqueurs bactériens apportent pourtant des informations précieuses pour lutter contre les contaminations des eaux. En effet, sur les territoires complexes soumis à de nombreux facteurs de pression, la localisation des foyers de contamination par le biais d'analyses *Escherichia coli* associée à la réalisation de diagnostics territoriaux ne suffit généralement pas pour déterminer d'où proviennent les pollutions. Les marqueurs bactériens présentent ainsi l'avantage de mettre en évidence, de manière factuelle et dans un délai relativement court, l'implication de certaines origines dans les contaminations, ce qui participe grandement à faire avancer les discussions entre les divers acteurs concernés.

Cependant, ces marqueurs montrent également quelques limites qui freinent leur utilisation par les acteurs de la sphère opérationnelle, notamment le prix des analyses. Néanmoins, cette limite est à relativiser : en effet, même si le prix d'un dénombrement bactérien est plus faible, l'identification des origines de contamination par la méthode associant des prospections de terrain et des analyses de concentration en *E. coli* le long du réseau de cours d'eau est un travail fastidieux et coûteux en termes de main d'œuvre, tandis que la méthode TSM nécessite de réaliser relativement peu

d'analyses pour acquérir des informations exploitables et ainsi mettre en place des actions correctives adaptées.

Ensuite, il est important de rappeler que les résultats des analyses apportent bien des indications sur l'origine des contaminations, mais ne permettent pas de déterminer précisément leur(s) source(s). Ainsi, ils doivent impérativement être couplés à d'autres données pour pouvoir être interprétés correctement : ces données peuvent être les taux d'*E. coli* dans les eaux au moment du prélèvement, les conditions pluviométriques auxquelles ressortent les contaminations ou encore d'autres éléments contextuels (période d'épandage autorisé, etc.).

Enfin, les différentes méthodes TSM, y compris celle s'appuyant sur les marqueurs bactériens, ne sont pas normalisées : elles ne font donc pas l'objet de protocoles définis, ce qui peut compliquer leur application par les acteurs de la sphère opérationnelle. Cette étude avait ainsi pour projet d'optimiser l'utilisation des marqueurs bactériens en formulant des recommandations à l'égard des maîtres d'ouvrage en charge de la gestion de la qualité des eaux. Ces derniers sont donc notamment encouragés à :

- Mener des études préalablement à l'application des marqueurs, pour caractériser au mieux les pollutions, identifier les objectifs à atteindre à travers les analyses et adapter les modalités de prélèvement de façon à échantillonner aux endroits et aux moments propices ;
- Associer les résultats des analyses à d'autres éléments ;
- Optimiser la gestion et la valorisation des résultats obtenus, notamment en assurant une bancarisation plus rigoureuse des données.

Ces différentes recommandations pourraient notamment être regroupées au sein d'un guide technique, qui viserait à conseiller les maîtres d'ouvrage dans la mise en œuvre de la méthode des marqueurs bactériens, en particulier dans la phase de collecte des échantillons.

Les marqueurs bactériens représentent ainsi un outil supplémentaire mis à disposition des acteurs de la sphère opérationnelle pour cibler les problèmes à l'origine des contaminations des eaux. Si actuellement, cette méthode est la seule proposée par les laboratoires d'analyse, l'offre devrait néanmoins se développer davantage dans les années à venir, avec l'apparition de nouvelles méthodes et de nouveaux prestataires sur le marché.

Bibliographie

Agence de l'Eau Loire-Bretagne (2013). *Réduction des pollutions bactériologiques sur les bassins versants littoraux*, 102 p.

Agence Française de Sécurité Sanitaire de l'Environnement et du Travail (AFSSET) (2007). *Qualité microbiologique des eaux de baignade – Classement de la qualité des eaux de baignade à l'échelon national par la méthode de la nouvelle directive européenne 2006/7/CE – Méthode et résultats généraux*, 17 p.

Agence Régionale de Santé Bretagne (ARS) (2012). *Qualité des eaux de baignade dans le Morbihan*, 26 p.

Agence Régionale de Santé Bretagne (ARS) & Ifremer (2016). *L'ARS Bretagne fait campagne pour une pratique responsable de la pêche à pied de loisir ... en toute sécurité sanitaire*, 4 p.

Agence Régionale de Santé Nouvelle Aquitaine (2016). *Contrôle sanitaire des eaux de baignade - Département de la Dordogne*, 12 p.

Allenou, J. P., Treguier, C., Manach, S., Piquet, J. C., & Cochenec-Laureau, N. (2015). Etude sanitaire de la presqu'île de Quiberon-Département du Morbihan.

Ballesté, E., & Blanch, A. R. (2010). Persistence of Bacteroides species populations in a river as measured by molecular and culture techniques. *Applied and environmental microbiology*, 76(22), 7608-7616.

Béoutis, A., Jean, P., & Colas, S. (2009). L'observatoire du littoral: Démographie et économie du littoral.

Blais, M. A. (2014). *Suivi de la contamination fécale dans la grande région de Montréal* (Doctoral dissertation, Université du Québec, Institut National de la Recherche Scientifique).

Blais, M.-A., Côté, C., Villemur, R., Généreux, M., Cantin, P., Villion, M. (2015). Revue des méthodes de détermination des sources de contamination fécale de l'eau, 40 p.

Blanch, A. R., Belanche-Muñoz, L., Bonjoch, X., Ebdon, J., Gantzer, C., Lucena, F., Ottoson, J., Kourtis, C., Iversen, A., Kühn, I., & Moce, L. (2004). Tracking the origin of faecal pollution in surface water: an ongoing project within the European Union research programme. *Journal of water and health*, 2(4), 249-260.

Boehm, A. B., Van De Werfhorst, L. C., Griffith, J. F., Holden, P. A., Jay, J. A., Shanks, O. C., Wang, D., & Weisberg, S. B. (2013). Performance of forty-one microbial source tracking methods: a twenty-seven lab evaluation study. *Water Research*, 47(18), 6812-6828.

Bordage, L. (2009). Le développement durable des filières de la conchyliculture et de la pêche dans les Pertuis Charentais: évaluation et gestion du risque sanitaire lié à l'environnement.

Briand, C. (2014). *Approche multi-traceurs pour la détermination de l'origine des nitrates dans les eaux souterraines: exemple d'une source karstique dans les Landes* (Doctoral dissertation, Université Pierre et Marie Curie-Paris VI).

Derrien, M. (2011). Validation of the use of steroids as a tool for tracing the origin of faecal contamination on surface water. Rennes-1 Univ., Rennes, 284 p.

Derrien, M., Jardé, E., Gruau, G., Pourcher, A. M., Gourmelon, M., Jadas-Hécart, A., & Wickmann, A. P. (2012). Origin of fecal contamination in waters from contrasted areas : Stanols as Microbial Source Tracking markers. *Water research*, 46(13), 4009-4016.

Direction régionale de l'Alimentation, de l'Agriculture et de la Forêt (DRAAF) (2016). *Tableaux de l'agriculture bretonne*, 87 p.

Eurofins Expertises Environnementales (2012). *Diagnostic d'origine de contamination fécale sur le bassin versant de Pénerf – Suivi 2012*, 23p.

Favre, P., & Amouroux, I. (2009). Paquet hygiène et surveillance REMI-surveillance microbiologique des zones de production conchylicoles. In *Colloque Dégradation des eaux littorales et temps de pluie. Syndicat Mixte des Bassins Granvillais (SMBV), Granville, 30 septembre et 1er octobre 2009*.

Gantzer, C., Lucena, F., Schwartzbrod, L., & Jofre, J. (1998). Indicateurs de contamination virale du milieu hydrique: mythe ou réalité ?. *Virologie*, 2(2), 117-25.

Garabetian, F., Lyautey, E., Bourasseau, L., Daffe, G., Girault, E., Jude-Lemeilleur, F., Leconte, M., Persilie, E., Raymond, N., Thevand, A., & Vitte, I. (2013). Identification des sources de contamination fécales en milieu côtier (IDFEC)-Validation d'une base de données de Microbial Source Tracking pour le bassin d'Arcachon. *Techniques Sciences Méthodes*, (4), 38-49.

Gourmelon, M. (2014). Etude de la contamination microbiologique du milieu littoral: identification des sources de contamination fécale et évaluation de la persistance des bactéries entériques dans l'environnement.

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

Hartard, C. (2017) Les bactériophages ARN F-spécifiques comme indicateurs du danger viral lié à la pollution fécale des matrices hydriques et alimentaires. *Virologie*. Université de Lorraine, 242 p.

Hervio-Heath D., Gourmelon M., & Martial, C. (2012). Contamination des coquillages par des bactéries pathogènes pour l'homme. Sous-région marine Méditerranée occidentale. Evaluation initiale DCSMM. MEDDE, AAMP, Ifremer, Réf. DCSMM/EI/PI/MO/28/2012, 7 p.

Idhesa (2013). Rapport d'Etude Sivalodet. Suivi de la qualité des eaux & étude de la discrimination des contaminations bactériologiques du bassin versant de l'Odet - Période de Mars 2012 à Février 2013, 110 p.

Ifremer (2009). *Principe de l'amplification par PCR*, 4 p.

Ifremer (2015). *Evaluation de la qualité des zones de production conchylicole - Département du Calvados*, 46 p.

Jadas-Hécart, A., Jeanneau, L., La Carbona, S., Ogorzaly, L., & Rincé, A. (2012). Revue des principales méthodes d'identification des sources de pollutions fécales des eaux et coquillages. *Techniques Sciences Méthodes*, (3), 16-35.

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

Labocéa (2015). *Syndicat Mixte Ellé – Isole - Laïta – Suivi de la qualité bactériologique des eaux du bassin versant Ellé – Isole – Laïta – Année 3 (2013-2014)*, 70p.

Labocéa (2017). *Commune de Douarnenez – Révision du profil des eaux de baignade de la plage du Ris*, 87p.

Lapegue, S., Renault, T., Bechemin, C., Le Guyader, S., Stavrakakis, C., & Rivet, F. (2016). Rapport d'activités 2015 de l'Unité SG2M: Santé, Génétique et Microbiologie des Mollusques.

Menet, M. C. (2011). Principes de la spectrométrie de masse. *Revue francophone des laboratoires*, 2011(437), 41-53.

Mieszkin, S. (2010). *Diagnostic moléculaire de l'origine des contaminations fécales dans l'environnement littoral-Développement de marqueurs Bacteroidales spécifiques de l'hôte* (Thèse de doctorat, Université de Bretagne Occidentale), 344 p.

Morbihan Tourisme (2014). Les chiffres clés du tourisme en Morbihan, Edition 2014, 15 p.

Morin, J., Richard, B., & Treguier, C. (2017). Qualité sanitaire des gisements naturels de coquillages. Morbihan. Pêche à pied récréative. Année 2017.

Observatoire de l'Eau du Morbihan 2013-2015 (2016). 50 p.

ODEM (2010). *Atlas de l'Environnement du Morbihan. Activités humaines et pressions sur l'environnement*, 112 p.

Ogorzaly, L. (2009). *Intérêt du géotypage des phages ARN F-spécifiques pour estimer la pollution fécale et virale des eaux*. Thèse de Doctorat, Nancy 1, 233p.

Pourcher, A. M., Jardé, E., Caprais, M. P., & Jaffrézic, A. (2010). Développement de marqueurs spécifiques de contamination fécale: application aux profils de baignade. In *Les rencontres scientifiques de l'ANSES*.

Pourcher, A. M., Solecki, O., Jardé, É., Jeanneau, L., Jadas-Hécart, A., Caprais, M. P., Gourmelon M., & Durand, G. (2012). Des micro-organismes et des composés chimiques pour identifier les sources de contamination fécale: étude de leur persistance en microcosmes et de leur présence dans les eaux à l'échelle d'un bassin versant. *Sciences Eaux and Territoires: la Revue de l'IRSTEA*, 92 p.

Sivalodet (2015). Bassin versant de l'Odet – Suivi de la qualité de l'eau – Bilan 2015, 77p.

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

Syndicat Mixte de la Ria d'Étel (2012). *Atlas Microbiologie 2011*, 98 p.

Syndicat Mixte Ellé Isole Laïta (2015). *Diagnostic bactériologique de l'estuaire de la Laïta*, 65p.

Treguier, C., Stanisiere, J. Y., Allenou, J. P., & Manach, S. (2010). Recherche de l'origine des sources de contamination microbiologique en rivière de Pénerf. Etat des lieux et proposition de suivi complémentaire.

Treguier, C., & Hitier, B. (2013). Recherche de l'origine des sources de contamination microbiologique en rivière de Pénerf. Partie 2, Hiérarchisation des flux et modélisation de la contamination.

Treguier, C., Manach, S., Gabellec, R., Retho, M., Dalle, C., & Cochenec-Laureau, N. (2017). *Evaluation de la qualité des zones de production conchylicole - Département du Morbihan - Edition 2017*.

Treguier, C. & Cochenec-Laureau N. (2017). *Etude sanitaire du golfe du Morbihan. Zone N° 56.13. 1. Département du Morbihan*.

Yahya, M., Blanch, A. R., Meijer, W. G., Antoniou, K., Hmaied, F., & Ballesté, E. (2017). Comparison of the performance of different microbial source tracking markers among European and North African Regions. *Journal of environmental quality*, 46(4), 760-766.

Sitographie

Agence de l'eau Loire-Bretagne (Juillet 2018), Osur Web – Mesures de la qualité des eaux de surface, [en ligne], disponible sur : http://www.eau-loire-bretagne.fr/informations_et_donnees/donnees_brutes/osur_web, Consulté le [22/08/2018].

Commissariat Général à l'Égalité des Territoires CGET (Juin 2014), Liste des Communes classées en Loi Littoral, [en ligne], disponible sur : <http://www.observatoire-des-territoires.gouv.fr/observatoire-des-territoires/fr/liste-des-communes-class-es-en-loi-littoral>, Consulté le [11/04/2018].

Conseil Départemental du Morbihan, Le Morbihan en chiffres, [en ligne], disponible sur : <https://www.morbihan.fr/departement-du-morbihan/histoire-et-geographie/presentation-du-morbihan/le-morbihan-en-chiffres/>, Consulté le [11/04/2018].

Ifremer, Agence Régional de la Santé (Mars 2017), Définition et types de contamination, [en ligne], disponible sur : <http://www.pecheapied-responsable.fr/Quels-sont-les-risques-sanitaires/Definition-et-types-de-contamination>, Consulté le [13/04/2018].

Ministère de l'Agriculture et de l'Alimentation (Juin 2018), La réglementation sur l'hygiène des aliments, [en ligne], disponible sur : <http://agriculture.gouv.fr/la-reglementation-sur-lhygiene-des-aliments>, Consulté le [25/07/2018].

Observatoire National de la Biodiversité, Biodiversité & milieux marins et littoraux, [en ligne], disponible sur : <http://indicateurs-biodiversite.naturefrance.fr/fr/thematiques/biodiversite-milieux-marins-et-littoraux>, Consulté le [22/08/2018].

Liste des sigles utilisés

ANC : Assainissement non-collectif

ARS : Agence Régionale de Santé

BM : Brest Métropole

CLE : Commission Locale de l'Eau

CLI : Chair et Liquide Intervalvaire

CTBV : Contrats Territoriaux de Bassin Versant

DCE : Directive Cadre sur l'Eau

DDTM : Direction Départementale des Territoires et de la Mer

DREAL : Direction Régionale de l'Environnement, de l'Aménagement et du Logement

EPCI : Etablissement Public de Coopération Intercommunal

EPTB Vilaine : Etablissement Public Territorial du Bassin de la Vilaine

GEMAPI : Gestion des Milieux Aquatiques et Prévention des Inondations

Ifremer : Institut Français de Recherche pour l'Exploitation de la Mer

INSEE : Institut National de la Statistique et des Etudes Economiques

PCR : Réaction en Chaîne par Polymérase ou Polymerase Chain Reaction

PIB : Produit Intérieur Brut

PNR : Parc Naturel Régional

REMI : REseau de contrôle Microbiologique des zones de production conchylicole

SAGE : Schéma d'Aménagement et de Gestion des Eaux

SDAGE : Schéma Directeur d'Aménagement et de Gestion des Eaux

SMBT : Syndicat Mixte du Bassin de Thau

SMEIL : Syndicat Mixte Ellé Isole Laïta

SMLS : Syndicat Mixte du Loc'h et du Sal

SMRE : Syndicat mixte de la Ria d'Etel

SPANC : Service Public D'Assainissement Non-Collectif

STEP : Station d'Épuration

UFC : Unité Formant Colonie

TSM : Typage/Traçage des Sources Microbiennes

Annexe 1 : transposition des directives européennes en droit français

- **Directive 2006/7/CE du 15 février 2006 relative à la qualité des eaux de baignade.**

Textes de transposition :

- Loi n° 2006-1772 du 30 décembre 2006 sur l'eau et les milieux aquatiques
- Arrêté du 15 mai 2007 fixant les modalités de réalisation du premier recensement des eaux de baignade par les communes
- Décret n° 2007-983 du 15 mai 2007 relatif au premier recensement des eaux de baignade par les communes
- Décret n° 2008-990 du 18 septembre 2008 relatif à la gestion de la qualité des eaux de baignade et des piscines

Annexe 2 : Personnes Ressources

Organisme(s)	Nom
Volet opérationnel	
Morbihan	
Conseil Départemental du Morbihan	Jean-Louis Belloncle
	Romain Chauvière
Auray Quiberon Terre Atlantique (AQTA)	Aurélie Burguin-Guillas
Parc Naturel du Golfe du Morbihan	Camille Simon
Cap Atlantique	Catherine Ponthoreau
Etablissement Public Territorial du Bassin de la Vilaine (EPTB Vilaine)	Flore Salaun
Syndicat Mixte du Loc'h et du Sal (SMLS) / Golfe du Morbihan Vannes Agglomération	Floriane De Luca
Syndicat Mixte de la Ria d'Étel	Laurent Thibault
	Matthieu Jan
Syndicat Mixte Ellé Isole Laïta (SMEIL)	Romain Suaudeau
Syndicat Mixte du Bassin du Scorff (SMBS) / Lorient Agglomération	Stéphanie Harrault
Mynivel Environnement	Yves Le Medec
Agence Régionale de la Santé (ARS) – Délégation Territoriale du Morbihan	Benjamin Richard
Autres départements	
Brest Métropole	Aline Lazennec
Communauté de Communes du Pays d'Iroise (CCPI)	Anne Danse
	Aude Mahot
Syndicat Intercommunal de la Vallée de l'Odét (Sivalodet)	Anne-Sophie Blanchard
Communauté de Communes du Pays Fouesnantais (CCPF)	Antoine Blouin
Quimperlé Communauté	Pascal Nicol
Centre Régional d'Expérimentation et d'Application Aquacole (CREAA)	Dominique Mille

Conseil Départemental Charente-Maritime	Bruno Samzum
Syndicat Mixte du Bassin de Thau (SMBT)	Stéphane Roumeau
Agence Régionale de la Santé – Délégation Territoriale des Côtes d’Armor	Thomas Kerebel
Agence Régionale de la Santé – Délégation Territoriale du Finistère	Jean-Luc Prigent
Laboratoires d’analyse	
Eurofins Hydrologie Ouest SAS	Annabelle Achard
Eurofins Expertises Environnementales	Florence Gosselin
Labocéa Plouzané	Gaël Durand
Laboratoire Départemental d’Analyses 56 (LDA56)	Guenhaëlle Le Jeune
Inovalys Nantes	Pierre Abasq
Qualyse	Michael Treilles
Volet Recherche	
Laboratoire de Chimie Physique et Microbiologie pour les Matériaux et l’Environnement (LCPME)	Christophe Gantzer
Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS)	Emilie Jardé
Ifremer Brest – Laboratoire Santé Environnement et Microbiologie (LSEM)	Michèle Gourmelon
Laboratoires des Pyrénées et des Landes (LPL)	Amélie Charrier
	Isabelle Vitte

Annexe 3 : Trame d'entretien à destination des acteurs du monde de la recherche

I. Généralités

1. Nom et prénom de la personne rencontrée :

2. Organisme de rattachement et poste au sein de cet organisme :

II. Identification des sources de contamination des eaux

- **Les Traceurs de Sources Microbiennes TSM**

- ✓ Les marqueurs bactériens

- *Les marqueurs Bacteroïdales*

3. Comment ces traceurs permettent-ils de déterminer l'origine d'une contamination microbiologique des eaux ou des coquillages ? Quel est l'objectif associé à l'utilisation de ces marqueurs ?

4. Existe-t-il une/des méthode(s) standardisée(s) pour la détection et la quantification des marqueurs *Bacteroïdales* dans l'eau ? Si oui, à quelle échelle (nationale, internationale) ?

5. Quelles sont les principales modalités de cette/ces méthode(s) ? (Dans le cas où il n'existe pas de méthode standardisée, quelles sont les modalités de la/des méthode(s) le(s) plus pertinente(s) ?)

Quels sont les coûts associés à chaque étape ?

- Modalités de prélèvement et d'échantillonnage :
- Conditions particulières à respecter (période de prélèvement favorable, concentration minimale en *Escherichia coli* nécessaire dans les eaux pour obtenir des résultats significatifs, nombre d'analyses à effectuer pour obtenir une validation statistique des résultats, etc.) :
- Modalités d'analyse des échantillons en laboratoire (culture/génotypage, PCR conventionnelle, PCR en temps réel, ... ; produits utilisés) :
- Modalités d'exploitation des résultats :

6. La restitution des résultats est-elle standardisée/normalisée ?

7. La méthode prévoit-elle la bancarisation d'éléments comme les conditions de prélèvement, les résultats d'analyse, etc. ?

8. Cette/ces méthode(s) peuvent-elles être appliquées sur le terrain par les acteurs territoriaux en charge de la gestion de l'eau (faisabilité en termes de coût, d'équipement, de compétence, etc.) ?

9. Les protocoles associés à ces méthodes sont-ils protégés ou au contraire facilement consultables par les acteurs territoriaux en charge de la gestion de l'eau ?

10. Quels sont les avantages liés à l'utilisation de ces marqueurs ?

11. Quelles en sont les limites ?

○ *Les autres bactéries cibles ?*

12. Quels sont les autres marqueurs bactériens les plus pertinents à utiliser pour identifier la source d'une contamination microbiologique de l'eau ?

13. Existe-t-il une/des méthode(s) standardisée(s) pour la détection et la quantification de ces marqueurs bactériens dans l'eau ? Si oui, à quelle échelle (nationale, internationale) ?

14. Quels sont les avantages liés à l'utilisation de ces marqueurs ?

15. Quels en sont les limites ?

✓ Les marqueurs viraux

○ *Les bactériophages ARN-F spécifiques ?*

16. Comment ces traceurs permettent-ils de déterminer l'origine d'une contamination microbiologique des eaux ou des coquillages ? Quel est l'objectif associé à l'utilisation de ces marqueurs ?

17. Existe-t-il une/des méthode(s) standardisée(s) pour la détection et la quantification des bactériophages ARN-F spécifiques dans l'eau ? Si oui, à quelle échelle (nationale, internationale) ?

18. Quelles sont les principales modalités de cette/ces méthode(s) ? (Dans le cas où il n'existe pas de méthode standardisée, quelles sont les modalités de la/des méthode(s) le(s) plus pertinente(s) ?) Quels sont les coûts associés à chaque étape ?

- Modalités de prélèvement et d'échantillonnage :

- Conditions particulières à respecter (période de prélèvement favorable, concentration minimale en *Escherichia coli* nécessaire dans les eaux pour obtenir des résultats significatifs, nombre d'analyses à effectuer pour obtenir une validation statistique des résultats, etc.) :
- Modalités d'analyse des échantillons en laboratoire (culture/génotypage, PCR conventionnelle, PCR en temps réel, ... ; produits utilisés) :
- Modalités d'exploitation des résultats :

19. La restitution des résultats est-elle standardisée/normalisée ?

20. La méthode prévoit-elle la bancarisation d'éléments comme les conditions de prélèvement, les résultats d'analyse, etc. ?

21. Cette/ces méthode(s) peuvent-elles être appliquées sur le terrain par les acteurs territoriaux en charge de la gestion de l'eau (faisabilité en termes de coût, d'équipement, de compétence, etc.) ?

22. Les protocoles associés à ces méthodes sont-ils protégés ou au contraire facilement consultables par les acteurs territoriaux en charge de la gestion de l'eau ?

23. Quels sont les avantages de ces marqueurs ?

24. Quelles en sont les limites ?

○ *Les autres virus et bactériophages ?*

25. Quels sont les autres marqueurs viraux les plus pertinents à utiliser pour identifier la source d'une contamination microbiologique de l'eau ?

26. Existe-t-il une/des méthode(s) standardisée(s) pour la détection et la quantification de ces marqueurs viraux dans l'eau ? Si oui, à quelle échelle (nationale, internationale) ?

27. Quels sont les avantages liés à l'utilisation de ces marqueurs ?

28. Quels en sont les limites ?

✓ Les marqueurs chimiques

29. Comment ces traceurs permettent-ils de déterminer l'origine d'une contamination microbiologique des eaux ou des coquillages ? Quel est l'objectif associé à l'utilisation de ces marqueurs ?

30. Quels sont les composés chimiques les plus pertinents à utiliser pour déterminer l'origine d'une pollution microbiologique de l'eau ?

31. Existe-t-il une/des méthodes standardisée(s) pour la détection et la quantification de ces marqueurs chimiques dans les eaux ? Si oui, à quelle échelle (nationale, internationale) ?

32. Quelles sont les principales modalités de cette/ces méthode(s) ? (Dans le cas où il n'existe pas de méthode standardisée, quelles sont les modalités de la/des méthode(s) le(s) plus pertinente(s) ?)

Quels sont les coûts associés à chaque étape ?

- Modalités de prélèvement et d'échantillonnage :
- Conditions particulières à respecter (période de prélèvement favorable, concentration minimale en *Escherichia coli* nécessaire dans les eaux pour obtenir des résultats significatifs, nombre d'analyses à effectuer pour obtenir une validation statistique des résultats, etc.) :
- Modalités d'analyse des échantillons en laboratoire (produits utilisés, ...) :
- Modalités d'exploitation des résultats :

33. La restitution des résultats est-elle standardisée/normalisée ?

34. La méthode prévoit-elle la bancarisation d'éléments comme les conditions de prélèvement, les résultats d'analyse, etc. ?

35. Cette/ces méthode(s) peuvent-elles être appliquées sur le terrain par les acteurs territoriaux en charge de la gestion de l'eau (faisabilité en termes de coût, d'équipement, de compétence, etc.) ?

36. Les protocoles associés à ces méthodes sont-ils protégés ou au contraire facilement consultables par les acteurs territoriaux en charge de la gestion de l'eau ?

37. Quels sont les avantages liés à l'utilisation des marqueurs chimiques ?

38. Quelles en sont les limites ?

✓ Les marqueurs mitochondriaux

39. Comment ces traceurs permettent-ils de déterminer l'origine d'une contamination microbiologique des eaux ou des coquillages ? Quel est l'objectif associé à l'utilisation de ces marqueurs ?

40. Existe-t-il une/des méthode(s) standardisée(s) pour la détection et la quantification des marqueurs mitochondriaux de l'origine des contaminations dans l'eau ? Si oui, à quelle échelle (nationale, internationale) ?

41. Quelles sont les principales modalités de cette/ces méthode(s) ? (Dans le cas où il n'existe pas de méthode standardisée, quelles sont les modalités de la/des méthode(s) le(s) plus pertinente(s) ?)
Quels sont les coûts associés à chaque étape ?

- Modalités de prélèvement et d'échantillonnage :
- Conditions particulières à respecter (période de prélèvement favorable, concentration minimale en *Escherichia coli* nécessaire dans les eaux pour obtenir des résultats significatifs, nombre d'analyses à effectuer pour obtenir une validation statistique des résultats, etc.) :
- Modalités d'analyse des échantillons en laboratoire (PCR conventionnelle, PCR en temps réel, ... ; produits utilisés) :
- Modalités d'exploitation des résultats :

42. La restitution des résultats est-elle standardisée/normalisée ?

43. La méthode prévoit-elle la bancarisation d'éléments comme les conditions de prélèvement, les résultats d'analyse, etc. ?

44. Cette/ces méthode(s) peuvent-elles être appliquées sur le terrain par les acteurs territoriaux en charge de la gestion de l'eau (faisabilité en termes de coût, d'équipement, de compétence, etc.) ?

45. Les protocoles associés à ces méthodes sont-ils protégés ou au contraire facilement consultables par les acteurs territoriaux en charge de la gestion de l'eau ?

46. Quels sont les avantages liés à l'utilisation des marqueurs mitochondriaux ?

47. Quelles en sont les limites ?

- **Typage des bactéries et des virus**

48. Comment le typage de microorganismes permet-il de déterminer l'origine d'une contamination microbiologique des eaux ou des coquillages ? Quel est l'objectif associé à l'application de cette méthode ?

49. Existe-t-il une/des méthode(s) standardisée(s) pour le typage des bactéries ou des virus dans le cadre d'une identification d'une contamination microbiologique des eaux ? Si oui, à quelle échelle (nationale, internationale) ?

50. Quelles sont les principales modalités de cette/ces méthode(s) ? (Dans le cas où il n'existe pas de méthode standardisée, quelles sont les modalités de la/des méthode(s) le(s) plus pertinente(s) ?)
Quels sont les coûts associés à chaque étape ?

- Modalités de prélèvement et d'échantillonnage :
- Conditions particulières à respecter (période de prélèvement favorable, concentration minimale en *Escherichia coli* nécessaire dans les eaux pour obtenir des résultats significatifs, nombre d'analyses à effectuer pour obtenir une validation statistique des résultats, etc.) :
- Modalités d'analyse des échantillons en laboratoire (PCR conventionnelle, PCR en temps réel, ... ; produits utilisés) :
- Modalités d'exploitation des résultats :

51. La restitution des résultats est-elle standardisée/normalisée ?

52. La méthode prévoit-elle la bancarisation d'éléments comme les conditions de prélèvement, les résultats d'analyse, etc. ?

53. Cette/ces méthode(s) peuvent-elles être appliquées sur le terrain par les acteurs territoriaux en charge de la gestion de l'eau (faisabilité en termes de coût, d'équipement, de compétence, etc.) ?

54. Les protocoles associés à ces méthodes sont-ils protégés ou au contraire facilement consultables par les acteurs territoriaux en charge de la gestion de l'eau ?

55. Quels sont les avantages de la méthode de typage ?

56. Quelles en sont les limites ?

- **Autres**

57. Existe-t-il d'autres méthodes pour identifier l'origine des contaminations microbiennes des eaux ?

58. D'autres méthodes sont-elles en cours de développement ou en cours de standardisation ? Si oui, lesquelles et quand pourront-elles être mises en application ?

III. Transfert de la connaissance et application des méthodes d'identification des sources de contamination microbiologique

59. Avez-vous participé à l'élaboration d'une ou plusieurs méthode(s) d'identification des sources de contamination microbiologique des eaux ? Si oui :

- Les avez-vous protégées *via* le dépôt de brevets ?

- Les avez-vous vendues à d'autres organismes ? Si oui, quels organismes ?

60. Réalisez-vous des analyses pour le compte d'organismes (publics ou privés) ? Si oui :

- Quels organismes ?
- Sous quelle forme se présentent les commandes ? Devez-vous répondre à un cahier des charges précis ?

61. Globalement, comment s'effectue le transfert de connaissances du monde de la recherche vers la sphère opérationnelle (laboratoires d'analyse, acteurs territoriaux de l'eau, etc.) ?

Annexe 4 : Trame d'entretien à destination des maîtres d'ouvrage

I. Généralités

1. Nom et prénom de la personne rencontrée :
2. Organisme de rattachement et poste au sein de cet organisme :
3. Quelles sont les compétences de l'organisme en matière de gestion de la qualité de l'eau ? Dans quel cadre exerce-t-il ses activités (contrat de Bassin Versant ? ...) ? Quelle est la part consacrée à l'identification des sources de contamination microbienne des eaux/coquillages ?
4. Sur quelle étendue de territoire l'organisme exerce-t-il son activité ?
5. Quel est le nombre d'employés dans l'organisme ?

II. Identification des sources de contamination microbiologique

6. Qu'est-ce qui a mené à la prise en compte de la problématique de l'identification des sources de contamination dans le cadre de vos activités ? Quels sont les objectifs que l'organisme cherche à atteindre à travers cette identification ?
7. Les analyses visant à identifier les sources de pollution microbienne sont-elles régulières (annuelles, ...), réalisées dans le cadre d'un suivi, ou ponctuelles, faisant suite à un événement de contamination ?
8. Quel est le budget consacré par l'organisme à l'identification des sources de contamination microbiologique des eaux/coquillages ? Bénéficie-t-il d'aides financières ? Si oui, de la part de quelles structures ?
9. L'identification des sources de contamination est-elle réalisée en régie par l'organisme ?
 Oui Non

Si non, merci de passer directement à la question 22.

- **Contamination des eaux**

10. Quelle(s) méthode(s) appliquez-vous pour identifier les sources de contamination microbiologique des eaux ? Quel(s) type(s) de marqueurs utilisez-vous (marqueurs bactériens, viraux, chimiques, ...) ?

11. Quelles sont les principales modalités de la/des méthode(s) appliquée(s) ? Quels sont les coûts associés à chaque étape ?

- Modalités de prélèvement et d'échantillonnage :
- Conditions particulières à respecter (période de prélèvement favorable, concentration minimale en *Escherichia coli* nécessaire dans les eaux pour obtenir des résultats significatifs, nombre d'analyses à effectuer pour obtenir une validation statistique des résultats, etc.) :
- Modalités d'analyse des échantillons en laboratoire (culture/génotypage, PCR conventionnelle, PCR en temps réel, ... ; produits utilisés) :
- Modalités d'exploitation des résultats :

12. Faites-vous appel à d'autres structures pour la réalisation d'une des étapes de la/des méthode(s) ? Si oui, lesquelles et pour quelle(s) étape(s) ?

13. Quels sont selon vous les avantages de cette/ces méthode(s) (par rapport à d'autres méthodes) ?

14. Quelles en sont les limites ?

15. Pourquoi utilisez-vous cette méthode ? Comment en avez-vous pris connaissance (par le biais d'un organisme de recherche, ...) ?

- **Contamination des coquillages**

16. Quelles méthodes appliquez-vous pour identifier les sources de contamination microbiologique des coquillages ? Quel(s) type(s) de marqueurs utilisez-vous (marqueurs bactériens, viraux, chimiques, ...) ?

17. Quelles sont les principales modalités de la/des méthode(s) appliquée(s) ? Quels sont les coûts associés à chaque étape ?

- Modalités de prélèvement et d'échantillonnage :
- Conditions particulières à respecter (période de prélèvement favorable, concentration minimale en *Escherichia coli* nécessaire dans les coquillages pour obtenir des résultats significatifs, nombre d'analyses à effectuer pour obtenir une validation statistique des résultats, etc.) :
- Modalités d'analyse des échantillons en laboratoire (culture/génotypage, PCR conventionnelle, PCR en temps réel, ... ; produits utilisés) :
- Modalités d'exploitation des résultats :

18. Faites-vous appel à d'autres structures pour la réalisation d'une des étapes de la/des méthodes ?
Si oui, lesquelles et pour quelle(s) étape(s) ?

19. Quels sont selon vous les avantages de cette/ces méthode(s) (par rapport à d'autres méthodes) ?

20. Quelles en sont les limites ?

21. Pourquoi utilisez-vous cette méthode ? Comment en avez-vous pris connaissance (par le biais d'un organisme de recherche, ...) ?

A l'attention des organismes qui fonctionnent en régie pour l'identification des sources de contamination des eaux/coquillages : merci de passer directement à la question 25.

- **Prestataires**

22. A quelle(s) structure(s) faites-vous appel pour :

- le prélèvement des échantillons ?
- l'analyse des échantillons ?
- l'analyse des résultats ?
- Autres ?

23. Les commandes font-elles l'objet d'un cahier des charges précis ?

24. Sous quelle forme les résultats vous sont-ils restitués (données brutes, interprétations, indicateurs, ...) ? Sur quel support (rapport papier, numérique, tableur, base de données, ...) ?

- **Exploitation des résultats**

25. Les éléments tels que les conditions de prélèvement, les résultats d'analyse, etc. font-ils l'objet d'une bancarisation ?

26. Les résultats obtenus sont-ils communiqués ou tenus confidentiels ? Le cas échéant, à qui sont-ils communiqués ? Dans quel but ? Sous quelle forme (banque de données, rapport écrit, ...) ?

27. Comment les résultats sont-ils utilisés ? Dans quelle mesure sont-ils valorisés pour conduire à la formulation de propositions d'action concrètes, de recommandations ?

III. Perspectives

28. La/les méthode(s) d'identification appliquée(s) répondent-elles aux objectifs de départ ? Si non, merci de préciser quels pourraient être les facteurs d'amélioration.

29. Songez-vous, par exemple, à adopter une autre méthode d'identification des sources de contamination microbiologique ? Si oui, pourquoi ?

Annexe 5 : Trame d'entretien à destination des laboratoires d'analyse

I. Généralités

1. Nom et prénom de la personne rencontrée :
2. Organisme de rattachement et poste au sein de cet organisme :
3. Domaine d'activité de l'organisme et part consacrée à l'identification des sources de contamination microbienne des eaux/coquillages :
4. Sur quelle étendue de territoire l'organisme exerce-t-il son activité ?
5. Quel est le nombre d'employés dans l'organisme ?

II. Identification des sources de contamination microbiologique

- Contamination des eaux

6. Quelle(s) méthode(s) appliquez-vous pour identifier les sources de contamination microbiologique des eaux ? Quel(s) type(s) de marqueurs utilisez-vous (marqueurs bactériens, viraux, chimiques, ...) ?
7. Quelles sont les principales modalités de la/des méthode(s) appliquée(s) ? Quels sont les coûts associés à chaque étape ?
 - Modalités de prélèvement et d'échantillonnage :
 - Conditions particulières à respecter (période de prélèvement favorable, concentration minimale en *Escherichia coli* nécessaire dans les eaux pour obtenir des résultats significatifs, nombre d'analyses à effectuer pour obtenir une validation statistique des résultats, etc.) :
 - Modalités d'analyse des échantillons en laboratoire (culture/génotypage, PCR conventionnelle, PCR en temps réel, ... ; produits utilisés) :
 - Modalités d'exploitation des résultats :
8. La méthode prévoit-elle la bancarisation d'éléments comme les conditions de prélèvement, les résultats d'analyse, etc. ?
9. Faites-vous appel à d'autres structures pour la réalisation d'une des étapes de la/des méthode(s) ? Si oui, lesquelles et pour quelle(s) étape(s) ?
10. Quels sont selon vous les avantages de cette/ces méthode(s) (par rapport à d'autres méthodes) ?

11. Quelles en sont les limites ?

12. Avez-vous développé ce(s) protocole(s) vous-même ? Si non, comment en avez-vous pris connaissance (par le biais d'un organisme de recherche, ...) ?

- **Contamination des coquillages**

13. Quelle(s) méthode(s) appliquez-vous au sein de votre laboratoire pour identifier les sources de contamination microbiologique des coquillages ? Quel(s) type(s) de marqueurs utilisez-vous (marqueurs bactériens, viraux, chimiques, ...) ?

14. Quelles sont les principales modalités de la/des méthode(s) appliquée(s) ? Quels sont les coûts associés à chaque étape ?

- Modalités de prélèvement et d'échantillonnage :
- Conditions particulières à respecter (période de prélèvement favorable, concentration minimale en *Escherichia coli* nécessaire dans les coquillages pour obtenir des résultats significatifs, nombre d'analyses à effectuer pour obtenir une validation statistique des résultats, etc.) :
- Modalités d'analyse des échantillons en laboratoire (culture/génotypage, PCR conventionnelle, PCR en temps réel, ... ; produits utilisés) :
- Modalités d'exploitation des résultats :

15. La méthode prévoit-elle la bancarisation d'éléments comme les conditions de prélèvement, les résultats d'analyse, etc. ?

16. Faites-vous appel à d'autres structures pour la réalisation d'une des étapes de la/des méthodes ? Si oui, lesquelles et pour quelle(s) étape(s) ?

17. Quels sont selon vous les avantages de cette/ces méthode(s) (par rapport à d'autres méthodes) ?

18. Quelles en sont les limites ?

19. Avez-vous développé cette/ces méthode(s) vous-même ? Si non, comment en avez-vous pris connaissance (par le biais d'un organisme de recherche, ...) ?

20. Le personnel de l'organisme est-il accrédité/agrémenté pour réaliser les prélèvements et les analyses des eaux/coquillages en vue de l'identification des sources de contamination ?

III. Modalités du marché

21. Quels sont les organismes pour lesquels vous réalisez ces analyses ?

22. Modalités des commandes :

- S'agit-il de commandes régulières (annuelles, ...) réalisées dans le cadre d'un suivi ou ponctuelles, faisant suite à une contamination ?
- Font-elles l'objet d'un cahier des charges précis ?


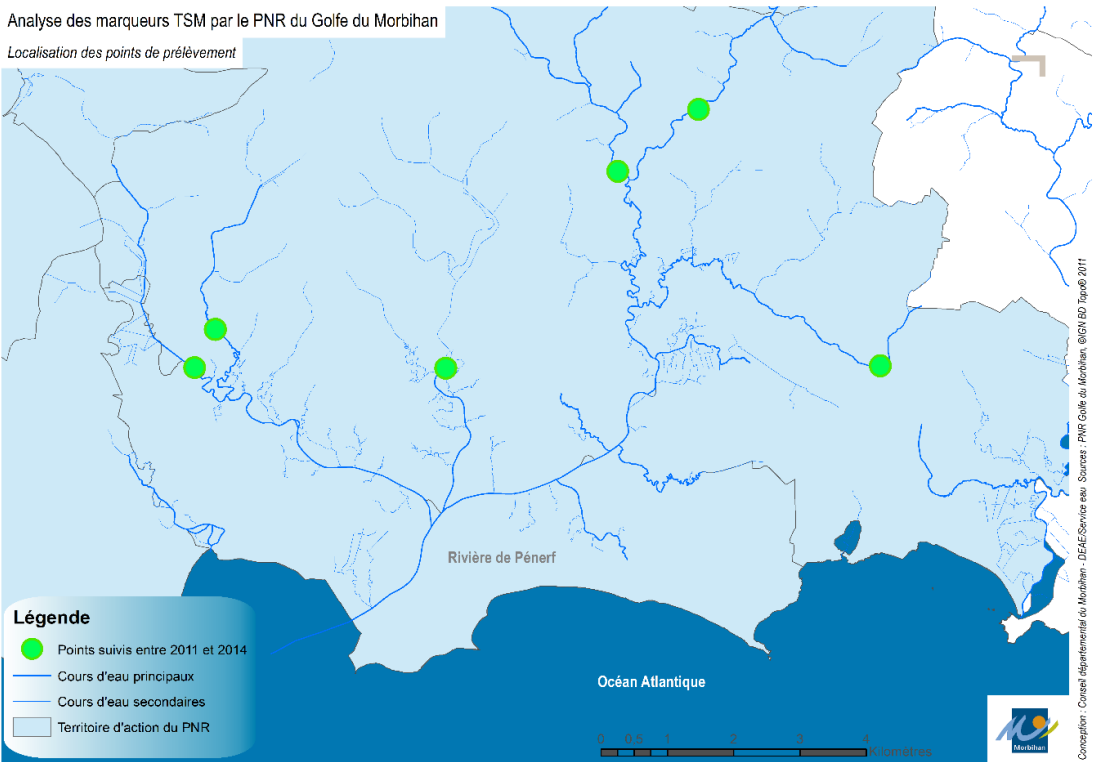
23. Sous quelle forme les résultats sont-ils restitués au commanditaire (données brutes, interprétations, indicateurs, ...) ? Sur quels supports (rapport papier, numérique, tableur, base de données, ...) ?

IV. Perspectives

24. La/les méthode(s) appliquée(s) par l'organisme répondent-elles aux objectifs fixés par les commanditaires de l'analyse ? Si non, quels pourraient être les facteurs d'amélioration ?

25. Développez-vous ou participez-vous au développement d'autres méthodes d'identification ? Si oui, quel est leur principe et quand pourront-elles être mises en application ?

Annexe 6 : Fiches-résumés des analyses menées par chaque maître d'ouvrage interrogé

Fiche n°1		PNR Golfe du Morbihan			
Etude des contaminations en rivière de Pénerf Novembre 2011 – Octobre 2014					
Contexte des analyses :			Traduction opérationnelle et/ou objectif recherché :		
<ul style="list-style-type: none"> Dégradation et déclassement de zones de production conchylicole de la rivière de Pénerf depuis 2005 (Sources : Treguier et al. 2010 ; entretien Camille Simon, 25/05/2018). 			<ul style="list-style-type: none"> Reconquérir la qualité bactériologique de l'estuaire pour préserver les usages primaires et de loisirs (Source : entretien Camille Simon, 25/05/2018). 		
Mise en œuvre des prélèvements et analyses					
Nombre et localisation des points de prélèvement :	Nombre de résultats par point :	Fréquence de prélèvement :	Conditions de prélèvement :	Méthode utilisée et prestataire :	
6 points, situés aux exutoires des principaux cours d'eau alimentant la rivière de Pénerf.	Objectif d'atteindre 5 résultats / point /an	≈ 1 fois/mois.	En période de vives-eaux <u>ET</u> en période de mortes-eaux faisant suite si possible à un épisode de contamination d'au moins 10 mm/24h.	Marqueurs bactériens – Eurofins Expertises Environnementales	
Localisation des points de prélèvement					
<p>Analyse des marqueurs TSM par le PNR du Golfe du Morbihan</p> <p>Localisation des points de prélèvement</p>  <p>Légende</p> <ul style="list-style-type: none"> ● Points suivis entre 2011 et 2014 — Cours d'eau principaux — Cours d'eau secondaires □ Territoire d'action du PNR <p>0 0,5 1 2 3 4 Kilomètres</p> <p><small>Conception : Conseil Départemental du Morbihan - DEAE/Service eau - Sources : PNR Golfe du Morbihan, ©IGN, BD Topo® 2011</small></p>					

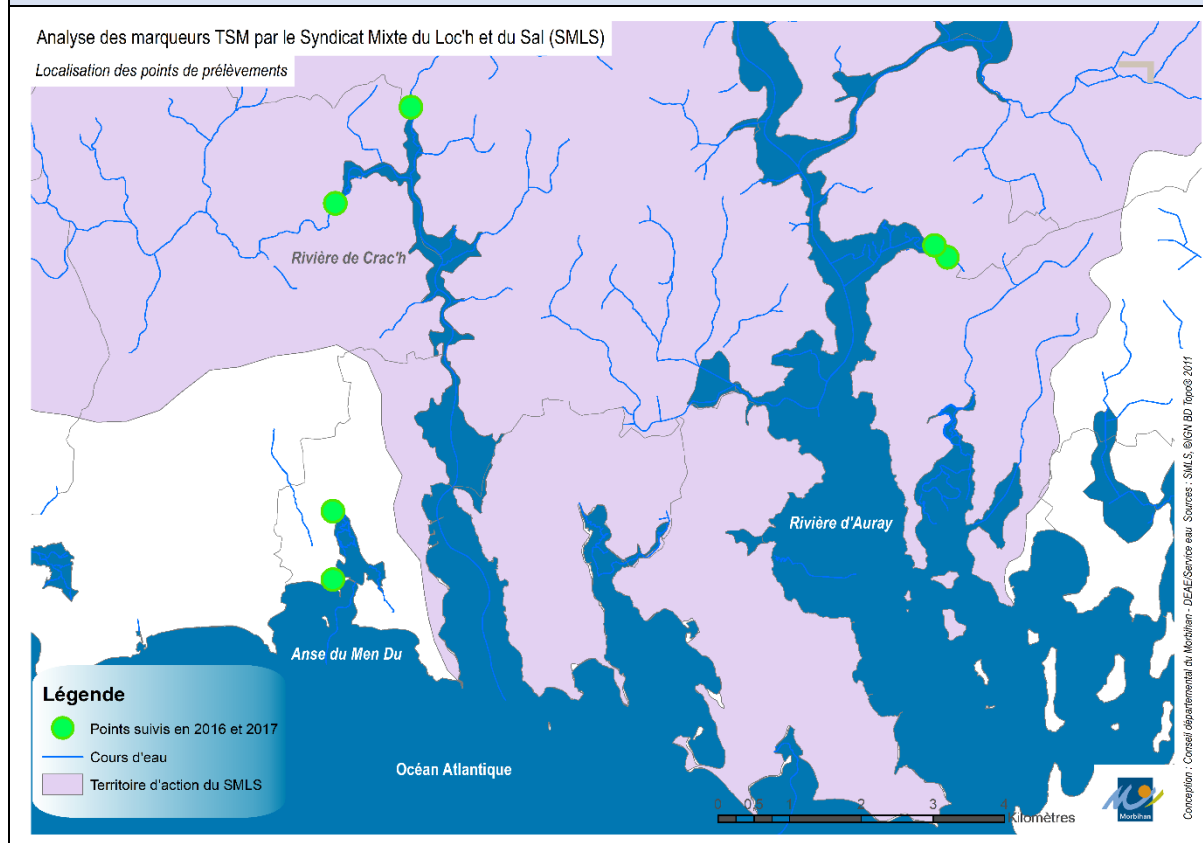
Etude des contaminations au niveau de la Rivière d'Auray, de la Rivière de Crac'h et de l'Anse du Men Du
Juin 2016 – Septembre 2017

Contexte des analyses :	Traduction opérationnelle et/ou objectif recherché :
<ul style="list-style-type: none"> ● Suivi de la qualité bactériologique des cours d'eau par le SMLS ● Réalisation d'analyses TSM dans le cas où l'origine de la contamination ne peut pas être identifiée simplement sur la base des connaissances de terrain (Source : entretien Floriane De Luca, 18/05/2018). 	<ul style="list-style-type: none"> ● Assurer la pérennité des usages. ● Reconquérir et maintenir la qualité sanitaire des eaux littorales et des coquillages.

Mise en œuvre des prélèvements et analyses

Nombre et localisation des points de prélèvement :	Nombre de résultats par point :	Fréquence de prélèvement :	Conditions de prélèvement :	Méthode utilisée et prestataire :
6 points, localisés aux exutoires de cours d'eau alimentant les zones d'étude	Entre 1 et 4	Ponctuelle	Suite à un épisode pluvieux	Marqueurs bactériens – Labocéa Plouzané

Localisation des points de prélèvement



**Etude des contamination des eaux du bassin versant Ellé – Isole – Laïta, et notamment de l'estuaire de la Laïta
Octobre 2014 – Janvier 2015**

Contexte des analyses :	Traduction opérationnelle et/ou objectif recherché :
<ul style="list-style-type: none"> • Qualité bactériologique médiocre de certains secteurs de l'estuaire de la Laïta, ce qui entrave le développement d'une activité de production conchylicole et de la pratique de la pêche à pied récréative (Sources : entretien Romain Suaudeau, 31/05/2018 ; Labocéa 2015) 	<ul style="list-style-type: none"> • Répondre à un des enjeux phares du SAGE, à savoir reconquérir une qualité B des eaux de l'estuaire. • Identifier les principaux problèmes pour pouvoir bâtir un programme d'actions (Source : entretien Romain Suaudeau, 31/05/2018).

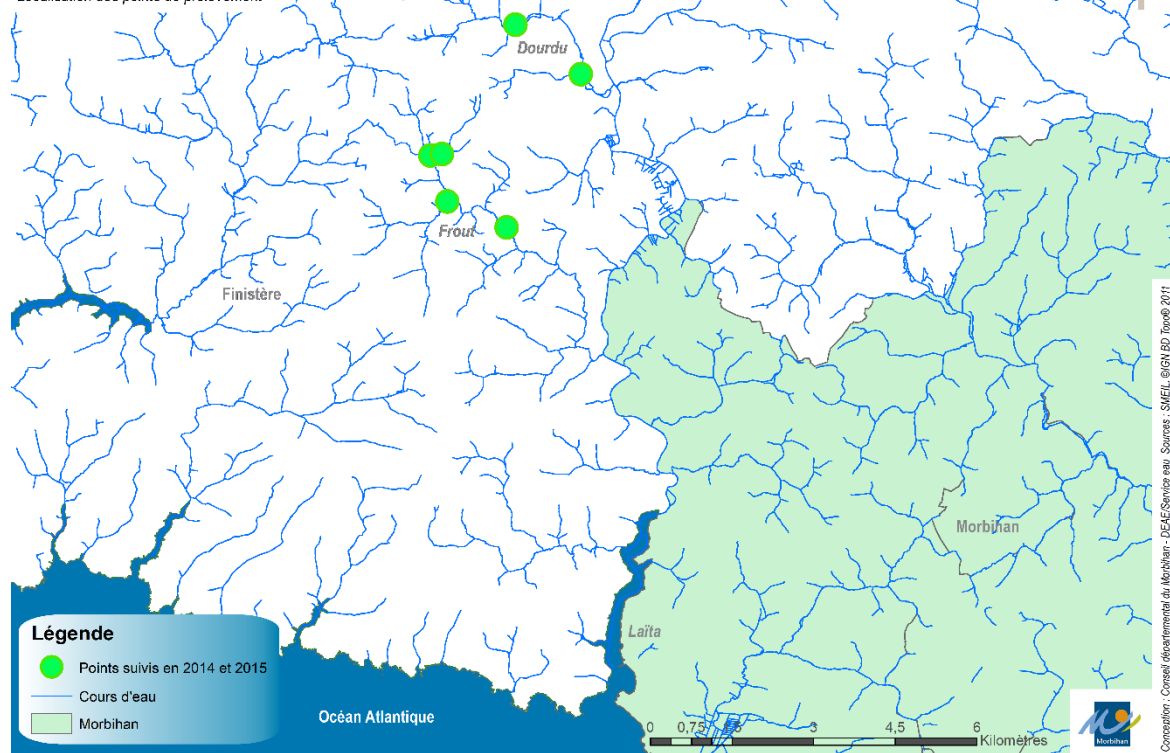
Mise en œuvre des prélèvements et analyses

Nombre et localisation des points de prélèvement :	Nombre de résultats par point :	Fréquence de prélèvement :	Conditions de prélèvement :	Méthode utilisée et prestataire :
6 points, localisés au niveau des BV du Froul et du Dourdu (identifiés comme étant les principaux foyers de contamination suite à une étude de la qualité bactériologique des eaux menée sur 2 ans)	2	Ponctuelle	Suite à un épisode pluvieux	Marqueurs bactériens – Labocéa Plouzané

Localisation des points de prélèvement

Analyse des marqueurs TSM par le Syndicat Mixte Ellé Isole Laïta (SMEIL)

Localisation des points de prélèvement



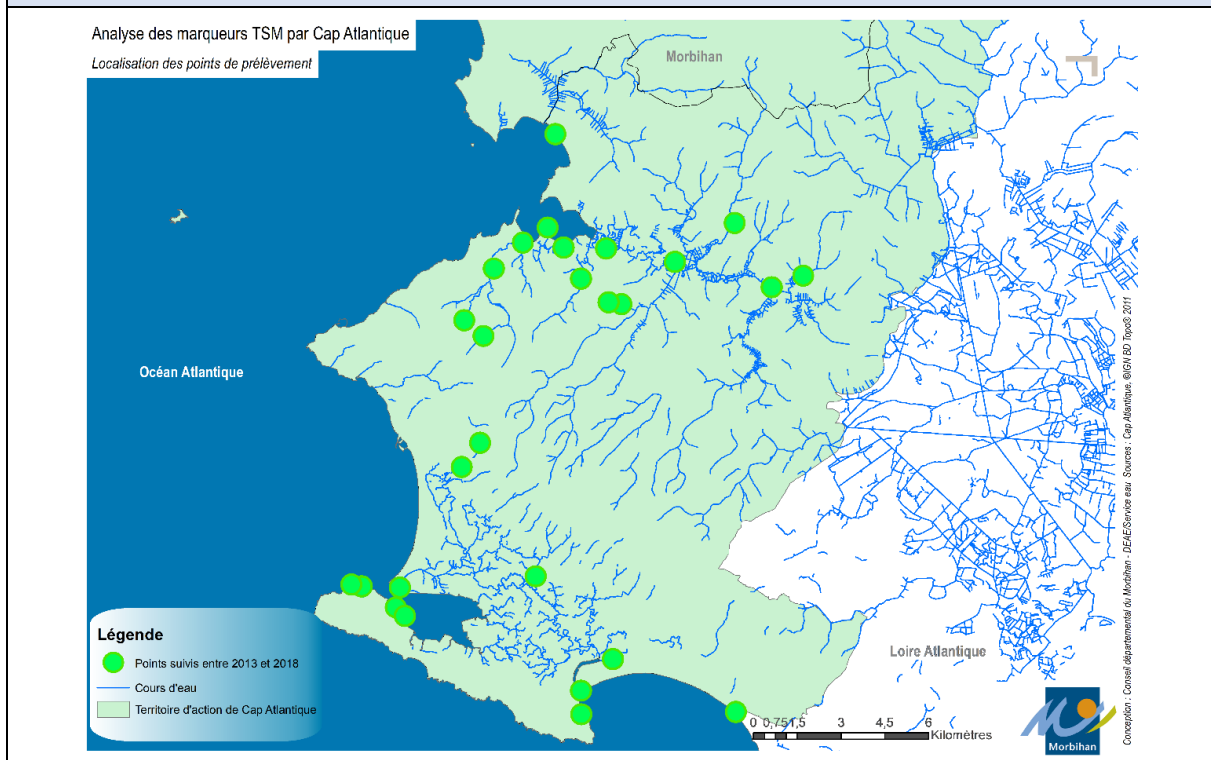
Suivi global des contaminations à l'échelle du territoire d'action de Cap Atlantique 2013 - 2018

Contexte des analyses :	Traduction opérationnelle et/ou objectif recherché :
<ul style="list-style-type: none"> ● Existence d'une problématique de déclassement (ou risque de déclassement) de sites de baignade ou de production conchylicole au niveau du territoire de Cap Atlantique ● Suivi de la qualité bactériologique des cours d'eau par Cap Atlantique → réalisation d'analyses TSM dans le cas où l'origine de la contamination ne peut pas être identifiée simplement sur la base des connaissances de terrain (Source : entretien Catherine Ponthoreau, 18/06/2018). 	<ul style="list-style-type: none"> ● Mettre en place des actions adaptées pour lutter contre les contaminations (Source : entretien Catherine Ponthoreau, 18/05/2018).

Mise en œuvre des prélèvements et analyses

Nombre et localisation des points de prélèvement :	Nombre de résultats par point :	Fréquence de prélèvement :	Conditions de prélèvement :	Méthode utilisée et prestataire :
27 points, localisés au niveau des secteurs qui posent des questionnements	Objectif d'obtenir 6 résultats par point ³³	1 fois/mois ³⁴	Période de vives-eaux	Marqueurs bactériens – Labocéa Plouzané

Localisation des points de prélèvement



³³ Cap Atlantique s'est fixé comme objectif d'obtenir 6 résultats par point pour pouvoir valider l'origine des contaminations. Cependant, 2 ou 3 analyses peuvent suffire dans le cas où les résultats correspondent bien à l'occupation du sol. A l'inverse, une occupation du sol complexe peut nécessiter plus de 6 analyses par point.

³⁴ En principe, les analyses sont réalisées une fois par mois. Cependant, certains secteurs ne sont sensibles aux contaminations qu'à des périodes définies de l'année : dans ce cas, les analyses peuvent être arrêtées un certain temps puis reprises au moment propice (Source : entretien Catherine Ponthoreau, 18/06/2018).

Suivi des sites de baignade de qualité "suffisante" ou "insuffisante"
2016 - 2017
Contexte des analyses :

- Problématique de classement en qualité "suffisante" ou "insuffisante" de certains sites de baignade

Traduction opérationnelle et/ou objectif recherché :

- Acquérir une meilleure connaissance du fonctionnement du territoire
- Fournir des informations aux élus des communes concernées (Source : entretien Anne Danse et Aude Mahot, 19/07/2018)

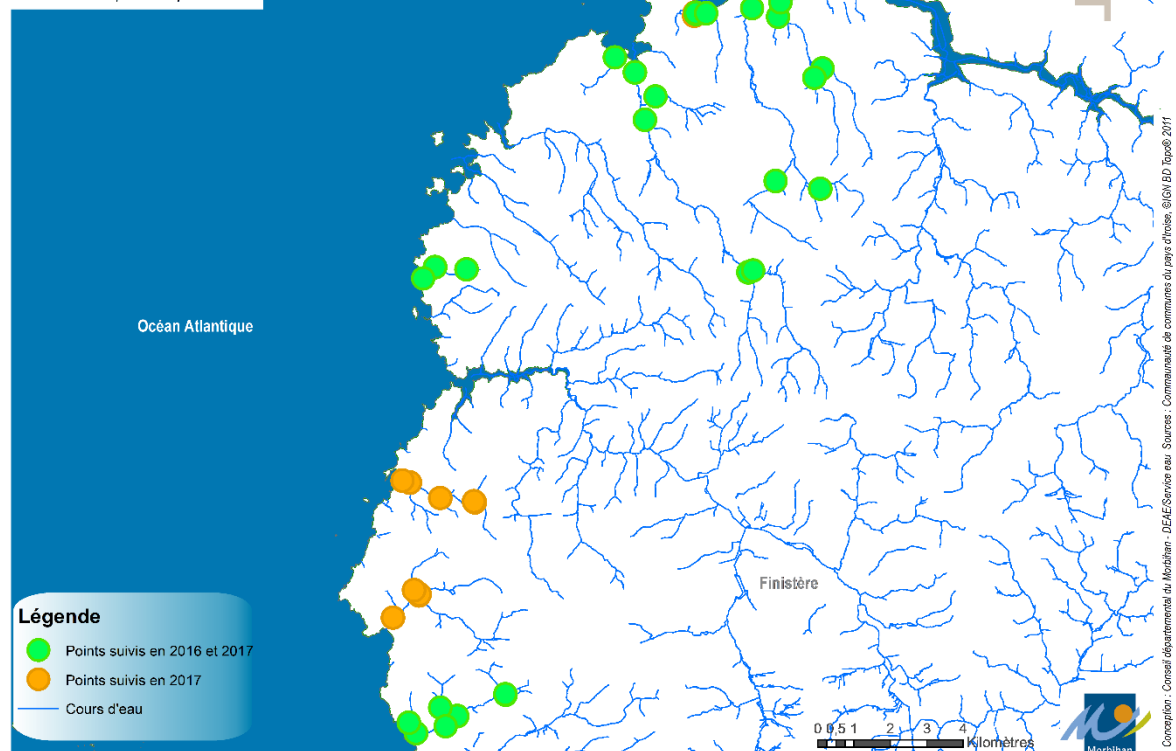
Mise en œuvre des prélèvements et analyses

Nombre et localisation des points de prélèvement :	Nombre de résultats par point :	Fréquence de prélèvement :	Conditions de prélèvement :	Méthode utilisée et prestataire :
35 points (24 en 2016 + ajout de 11 points en 2017), localisés au niveau des confluences des principaux bras des CE alimentant les plages de qualité "suffisante" ou "insuffisante"	1 ou 2	Ponctuelle	Suite à un épisode pluvieux d'au moins 10 mm/24h	Marqueurs bactériens – Labocéa Plouzané

Localisation des points de prélèvement

Analyse des marqueurs TSM par la Communauté de Communes du pays d'Iroise

Localisation des points de prélèvement



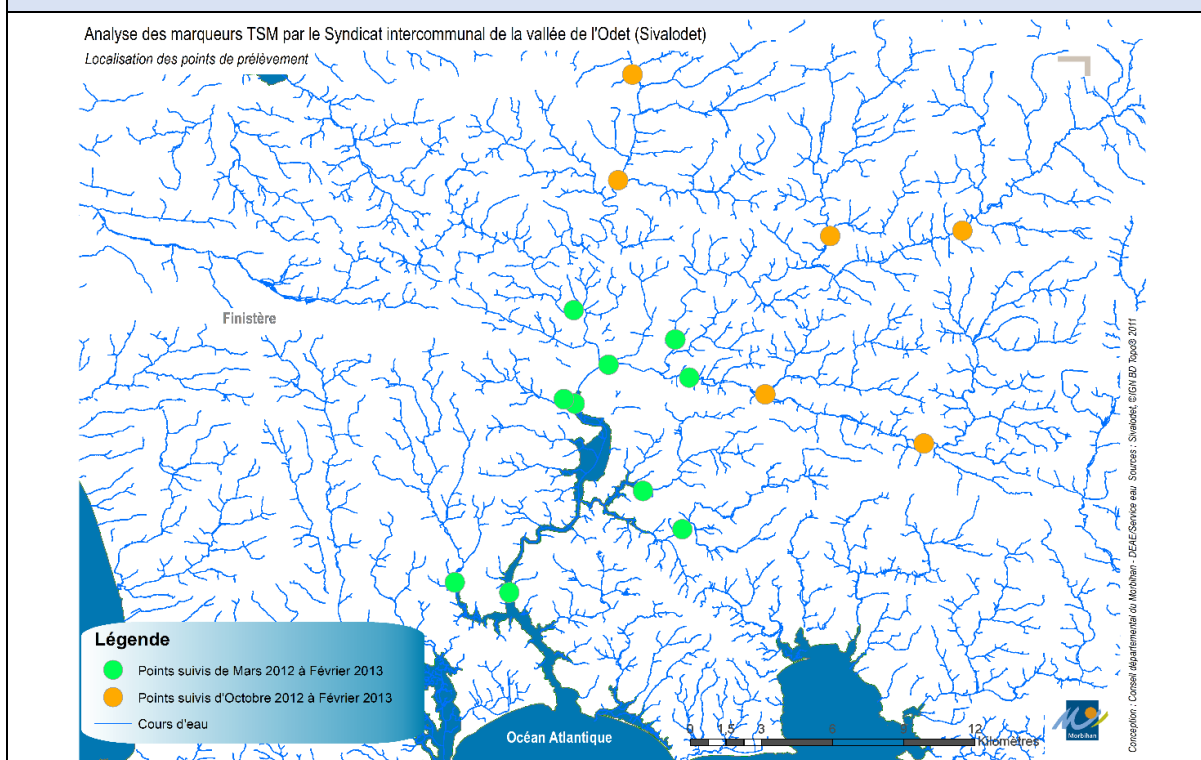
Etude des contaminations bactériologiques au niveau du bassin versant de l'Odette Mars 2012 – Février 2013

Contexte des analyses :	Traduction opérationnelle et/ou objectif recherché :
<ul style="list-style-type: none"> Mauvaise qualité bactériologique de certaines zones de production conchylicole situées dans l'estuaire de l'Odette, ce qui a conduit notamment à l'arrêt d'exploitation d'un banc d'huîtres (Sources : Idhesa 2013 ; entretien Anne-Sophie Blanchard, 22/06/2018) 	<ul style="list-style-type: none"> Orienter les actions de restauration de la qualité des eaux pour : <ul style="list-style-type: none"> - répondre aux objectifs du SAGE au niveau de l'estuaire, à savoir ne pas dépasser des teneurs de 2000 E. coli/100 ml d'eau - ne pas pénaliser les activités de production conchylicole Permettre la pratique des activités de loisirs dans la partie amont de l'estuaire (Source : Idhesa 2013)

Mise en œuvre des prélèvements et analyses

Nombre et localisation des points de prélèvement :	Nombre de résultats par point :	Fréquence de prélèvement :	Conditions de prélèvement :	Méthode utilisée et prestataire :
16 points : 2 points dans l'estuaire + 8 points situés aux exutoires des principaux CE se jetant dans l'estuaire + ajout de 6 points plus en amont sur les sous-BV, pour affiner la recherche de l'origine des contaminations	Entre 1 et 13 ³⁵	1 fois/mois	<ul style="list-style-type: none"> Par temps sec <u>ET</u> suite à des épisodes de pluie En marée descendante en ce qui concerne les points estuariens 	Marqueurs bactériens – Labocéa Plouzané

Localisation des points de prélèvement



³⁵ L'objectif du Sivalodet était de réaliser une analyse de marqueurs par point chaque mois de mars 2012 à février 2013 (d'octobre 2012 à février 2013 pour les points ajoutés au cours de l'étude). Cependant, dans le cadre de cette étude, la valeur seuil de concentration en *E. coli* dans les eaux permettant l'analyse était fixée à 1000 NPP (Nombre le Plus Probable)/100 ml. Certains points n'ont ainsi jamais pu être analysés alors que d'autres l'ont été tous les mois.

Etude des contaminations du Quinquis Novembre 2015

Contexte des analyses :

- Demande d'une étude concernant la qualité de l'eau du Quinquis de la part d'une association de riverains (Source : Sivalodet 2015)

Traduction opérationnelle et/ou objectif recherché :

- Déterminer les pressions exercées sur le cours d'eau du Quinquis, dont la partie amont se situe dans une zone industrielle (Source : Sivalodet 2015)

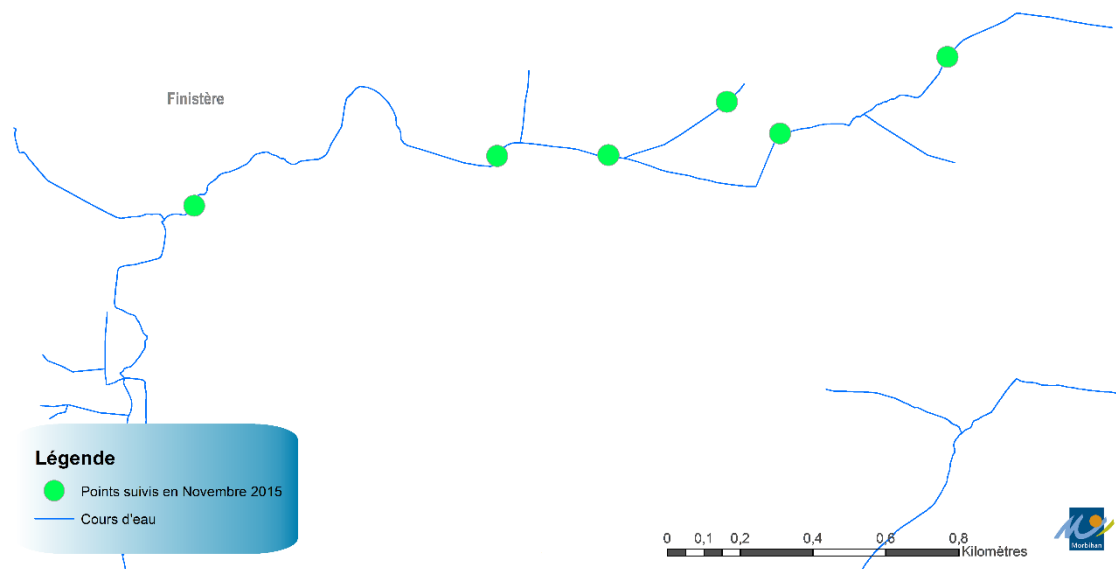
Mise en œuvre des prélèvements et analyses

Nombre et localisation des points de prélèvement :	Nombre de résultats par point :	Fréquence de prélèvement :	Conditions de prélèvement :	Méthode utilisée et prestataire :
6 points localisés le long du Quinquis de façon à prendre en compte les différentes entreprises pouvant potentiellement l'impacter	1	Ponctuelle	Suite à un épisode pluvieux	Marqueurs bactériens – Labocécia Plouzané

Localisation des points de prélèvement

Analyse des marqueurs TSM par le Syndicat intercommunal de la vallée de l'Odette (Sivalodet)

Localisation des points de prélèvement



Réalisation des profils conchylicoles de la Mer Blanche et de l'Anse de Penfoulic

Contexte des analyses :

- Déclassement et fermeture à la conchyliculture et à la pêche à pied de loisirs de la zone conchylicole de la Mer Blanche en 2014
- Réalisation des profils conchylicoles des zones de la Mer Blanche et de l'Anse de Penfoulic (zone classée en B) afin de permettre la pratique de la pêche à pied récréative, voire la production professionnelle de coquillages (Source : entretien Antoine Blouin, 27/06/2018)

Traduction opérationnelle et/ou objectif recherché :

- Obtenir davantage d'informations, notamment en vue de l'élaboration des profils conchylicoles (Source : entretien Antoine Blouin, 27/06/2018)

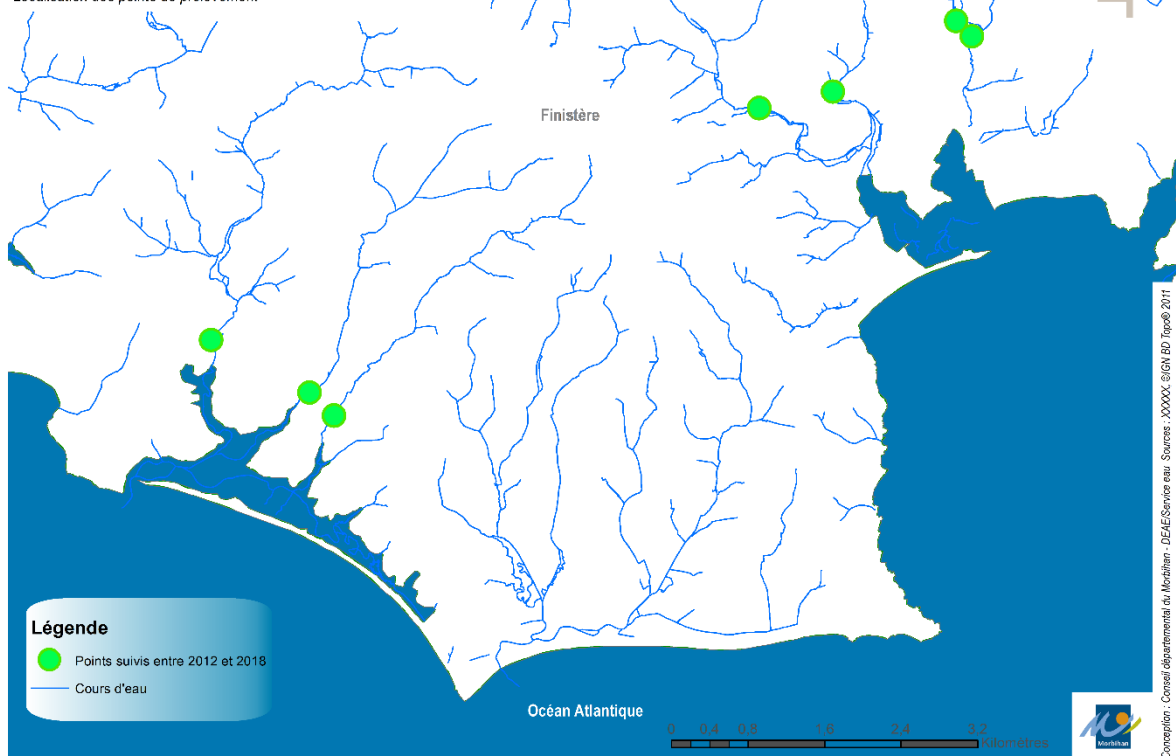
Mise en œuvre des prélèvements et analyses

Nombre et localisation des points de prélèvement :	Nombre de résultats par point :	Fréquence de prélèvement :	Conditions de prélèvement :	Méthode utilisée et prestataire :
7 points, situés aux exutoires des principaux CE alimentant la Mer Blanche et l'Anse de Penfoulic	/	Ponctuelle (entre 1 et 3 analyses/points /an)	Suite à un épisode pluvieux d'au moins 10 mm/24h	Marqueurs bactériens – Labocéa Plouzané

Localisation des points de prélèvement

Analyse des marqueurs TSM par la Communauté de Communes du Pays Fouesnantais

Localisation des points de prélèvement






**Etude de la contamination d'une zone conchylicole de l'Etang de Thau
Mars 2017**

Contexte des analyses :		Traduction opérationnelle et/ou objectif recherché :		
<ul style="list-style-type: none"> • Problèmes de contamination récurrents au niveau d'une zone conchylicole de l'étang de Thau (Source : entretien Stéphane Roumeau, 24/08/2018) 		<ul style="list-style-type: none"> • Identifier la raison de ces contaminations 		
Mise en œuvre des prélèvements et analyses				
Nombre et localisation des points de prélèvement :	Nombre de résultats par point :	Fréquence de prélèvement :	Conditions de prélèvement :	Méthode utilisée et prestataire :
1 point, localisé au niveau d'une zone de production conchylicole problématique de l'Etang de Thau	3	Ponctuelle (pas de temps de 3-4 jours entre les analyses)	/	Marqueurs bactériens – Labocéa Plouzané
Localisation des points de prélèvement				
/				

Annexe 7 : Exemple de calendrier d'épandage

(Source : Idhesa 2013)

Type Ia et I : fumiers, etc.	Mars 2012	Avril 2012	Mai 2012	Juin 2012	Juillet 2012	Août 2012	Sept. 2012	Oct. 2012	Nov. 2012	Déc. 2012	Janv. 2013	Fév. 2013
Prairies âgées de moins de 6 mois implantées après le 1 ^{er} septembre												
Prairies âgées de moins de 6 mois implantées avant le 1 ^{er} septembre												
Prairies âgées de plus de 6 mois												
Association Ray Grass Anglais + Trèfle Blanc												
Grandes cultures d'Automne (Blé, ...)												
Grandes cultures de printemps (sauf Maïs)												
Maïs												
Colza d'hiver												
Type Ib et II : lisiers, boues, effluents industriels, etc.	Mars 2012	Avril 2012	Mai 2012	Juin 2012	Juil. 2012	Août 2012	Sept. 2012	Oct. 2012	Nov. 2012	Déc. 2012	Janv. 2012	Fév. 2012
Prairies âgées de moins de 6 mois implantées après le 1 ^{er} septembre												
Prairies âgées de moins de 6 mois implantées avant le 1 ^{er} septembre												
Prairies âgées de plus de 6 mois												
Association Ray Grass Anglais + Trèfle Blanc												
Grandes cultures d'Automne (Blé, ...)												
Grandes cultures de printemps (sauf Maïs)												
Maïs												
Colza d'hiver												

 Epandage autorisé

 Epandage interdit

Annexe 8 : Carte d'occupation du sol localisant les potentielles sources de contamination

(Source : rapport Idhesa 2013).

