



Rapport d'activités de recherches

En vue de l'obtention du Diplôme

HABILITATION A DIRIGER DES RECHERCHES

**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.**

Présenté par

Michèle Gourmelon

Autorisation de soutenance donnée par le conseil scientifique le 14/03/2013

Soutenance le 27 février 2014

Rapporteurs :

Mr. Anicet Blanch, Professeur, Université de Barcelone

Mr. Pierre Colin, Professeur émérite, ESIAB, Université Bretagne Occidentale, Plouzané

Mme. Fabienne Petit, Professeur, Université de Rouen

Examineurs :

Mr. Frédéric Garabetian, Professeur, Université de Bordeaux I

Mr. Mohamed Jebbar, Professeur, Institut Européen de la Mer - Université de Bretagne Occidentale, Plouzané

Mme. Anne-Marie Pourcher, Directeur de Recherche, Irstea, Rennes

Remerciements

Ce mémoire d'HDR résume le travail que j'ai réalisé au Laboratoire de Microbiologie, en environnement littoral, à l'Ifremer, sur le centre de Brest au cours de plus d'une quinzaine d'années, en collaboration avec des étudiants, les personnes du laboratoire et les partenaires scientifiques que je tiens à remercier.

J'adresse tout d'abord tous mes remerciements à Anicet Blanch, Fabienne Petit et Pierre Colin rapporteurs de ce mémoire ainsi qu'à Frédéric Garabetian, Anne-Marie Pourcher et Mohammed Jebbar pour avoir accepté d'évaluer ce travail. La participation à ce jury sera peut-être le début de futures collaborations.

Je tiens à remercier les étudiants qui ont contribué aux résultats présentés dans ce mémoire. Tout d'abord, je remercie vivement Sophie Mieszkina, première étudiante en thèse que j'ai encadrée, qui a fait un travail très conséquent au cours de sa thèse sur les traceurs de sources microbiennes et à qui on doit de nombreux résultats sur les marqueurs *Bacteroidales*. Je tiens également à remercier Aourell Mauffret qui a poursuivi ce travail en post-doctorat pour son dynamisme et les nombreuses discussions. Merci également à Yustian Alfansiah, Charlotte Marin, Morgane Bougeard ... Je tiens aussi à remercier vivement Charlotte Balière qui est actuellement en thèse sur les *E. coli* producteurs de Shiga-toxines au laboratoire.

J'adresse tous mes remerciements aux personnes du Laboratoire Santé, Environnement et Microbiologie (SEM) de l'Ifremer, localisé à Brest et à Nantes. Je remercie tout d'abord Dominique Hervio-Heath, responsable de l'équipe de Brest, pour son aide, ses conseils et discussions. Je remercie également Marie-Paule Caprais, Jean-Claude Le Saux, Solen Lozach et Cécile Le Mennec pour leur participation aux études réalisées tout au long de ces années, ainsi qu'Emmanuelle Quenot, Joëlle Cozien et Noémie Flood qui sont arrivées plus récemment au laboratoire. Merci à tous pour votre aide, votre bonne humeur et les bons gâteaux ... Je tiens à remercier Monique Pompepuy, responsable du laboratoire pendant de nombreuses années, qui m'a fait confiance pendant la thèse et m'a ensuite permis de développer différentes thématiques au cours de ces années. Merci également à Elisabeth Dupray et Annick Derrien pour leur participation à certaines études.

Je remercie également Soizick Le Guyader, responsable du laboratoire SEM pour ses conseils ainsi que les autres collègues nantais : Pascal Garry, Françoise Hubert, Gaëlle Kaelin, Cédric Kergaravat, Cécile Le Mennec, Estelle Le Quintrec, Jessica Maillot, Chantal Menanteau, Joanna Ollivier, Sylvain Parnaudeau, Julien Schaeffer, Emilie Vallade, Antoine Véron ... pour les discussions lors de nos réunions et leur participation à des projets communs.

Je remercie également Tristan Renault, qui est responsable de l'Unité Santé Génétique et Microbiologie des Mollusques dans laquelle s'insère notre laboratoire depuis janvier 2013. Ce rattachement permettra des échanges très intéressants entre deux aspects différents de la microbiologie en zone littorale. Je tiens également à remercier les nombreuses personnes des Laboratoires Environnement Ressources de l'Ifremer qui nous ont apporté leur connaissance des sites d'études et leur aide sur le terrain. Je remercie également les physiciens modélisateurs tels que Pascal Lazure, Frank Dumas ... avec qui nous avons collaboré dans le cadre d'études de modélisation du devenir en mer des bactéries ... Je remercie également les sédimentologues, chimistes ou

biologistes avec qui nous avons travaillé dans le cadre de projets pluridisciplinaires à l'Ifremer tels que Philippe Bassoulet, Jacky L'Yavanck, Jean-François Guillaud ...

J'adresse tout particulièrement mes remerciements à nos partenaires scientifiques qui ont permis la réalisation d'une part importante du travail sur les traceurs de sources microbiennes au cours de ces années : ceux de l'Irstea de Rennes : Anne-Marie Pourcher, Olivia Soleszki (post-doctorat), Romain Marti (thèse), du CNRS Géosciences de Rennes : Emilie Jardé, Laurent Jeanneau, Loic Harault (post-doctorat), de l'Université de Caen : Alain Rincé, de l'INRA de Narbonne : Nathalie Wéry, de l'Université d'Angers : Alain Jadas-Hécart et Pierre-Yves Communal. Je tiens aussi à remercier nos partenaires des laboratoires d'analyses des eaux : IDHESA, Gaël Durand, Hassiba Melikechi et Emmanuelle Guillerm et Eurofins, Thierry Chesnot.

Je tiens à remercier également Gérard Corthier et Jean-Pierre Furet de l'Unité d'Ecologie et de Physiologie du Système Digestif de l'INRA de Jouy en Josas pour les nombreux échanges au cours de la thèse de Sophie Mieszkin.

Je remercie également nos partenaires impliqués dans la recherche des bactéries entériques pathogènes tels que Christine Vernozy, Unité de Microbiologie Alimentaire et Prévisionnelle, Ecole Nationale Vétérinaire de Lyon (actuellement à BioMerieux) et Delphine Thevenot et Estelle Loukiadis d'AgroSupVet de Lyon et Martine Denis de l'ANSES de Ploufragan ...

Je tiens à remercier également nos collègues anglais avec qui nous collaborons depuis plusieurs années et tout particulièrement Huw Taylor et James Ebdon de l'Université de Brighton et Jonathan Porter de l'Environment Agency d'Exceter. Je remercie également Tom Edge de l'Environment Canada, Tarja Pitkänen, The Finnish National Institute for Health and Welfare, Jorge Santo Domingo de l'EPA de Cincinnati pour les échanges et discussions.

J'adresse également tous mes remerciements aux personnes qui m'ont aidé pour la partie plus administrative des projets et tout particulièrement les projets Interreg : Ramiro Gonzales, Helen Mc Comby-Boudry, Marie-Christine Mazé, Joëlle Guillard, Véronique Gourmelon ...

Je tiens également à remercier les financeurs de nos études : les programmes européens Interreg IIIb et IVA, l'AFSSET, le Fonds Unique Interministériel, la Région Bretagne, l'Agence de l'eau Loire-Bretagne, Brest métropole Océane, les Conseils Généraux du Finistère et de l'Ille et Vilaine, Cap atlantique, l'Ifremer ...

Je n'oublie pas non plus les amis : Véro, Aline, Emina, Laure, Fabrice, Georges, Olivier, Marie, Thierry, Dany, Clément, Bradley ... pour les bons moments de détente.

Je tiens à remercier mes parents et mes sœurs qui en assistant à la soutenance de cette HDR ont pu ainsi avoir un aperçu de mes activités.

Enfin, un grand merci à Pascal, Fanny, Nicolas, Elise et Claire pour les bons moments en famille, leur compréhension et soutien.

Sommaire

Avant-propos	2
TRAVAUX DE RECHERCHE	4
Introduction.....	5
1 <i>Escherichia coli</i> en milieu littoral.....	7
1.1 <i>E. coli</i> bactérie commensale et pathogène	7
1.2 <i>E. coli</i> et la réglementation en zone littorale	9
1.3 <i>E. coli</i> dans les eaux	12
1.4 <i>E. coli</i> et les sédiments superficiels.....	13
1.5 <i>E. coli</i> dans les coquillages - <i>E. coli</i> et <i>E. coli</i> pathogènes, les STEC	15
2 Identification des sources de contamination fécale – les marqueurs	
<i>Bacteroidales</i>	21
2.1 Les sources de contamination fécale	21
2.2 L’approche TSM – les différentes cibles	21
2.3 Le développement de marqueurs et leur validation au niveau des sources - Les	
marqueurs <i>Bacteroidales</i> et autres marqueurs	26
2.3. Evaluation du transfert des différents marqueurs de contamination fécale aux eaux	
de ruissellement.....	39
2.4 Evaluation de la persistance des marqueurs <i>Bacteroidales</i> dans les eaux –	
comparaison avec les indicateurs de contamination fécale et les autres marqueurs	41
2.5 Application des TSM sur des eaux de l’environnement à l’échelle bassin versant ...	46
2.6 Application des TSM sur des coquillages	53
3 Perspectives de recherche	55
3.1 Les objectifs scientifiques	55
3.2 Les développements méthodologiques.....	64
3.3 Les collaborations	65
Conclusion.....	67
Références bibliographiques	68
Annexes	87
A.1 Organigramme du Laboratoire Santé Environnement et Microbiologie (LSEM)	87
A.2 Liste des abréviations, sigles et acronymes	88
A.3 Présentation du candidat.....	90

Avant-propos

Ce rapport d'Habilitation à Diriger des Recherches a pour objectif de présenter mes travaux de recherche depuis l'obtention de ma thèse de doctorat en 1995 et les perspectives de recherche qu'ouvrent ces travaux.

Pharmacien de formation par des études de Pharmacie à l'Université de Rennes I de 1986 à 1992, j'ai complété mes études par un DEA en Biologie Cellulaire et Moléculaire et Sciences de la Santé à l'Université de Rennes I en 1990-1991 et une thèse de doctorat, spécialité Sciences Biologiques et Santé, dans la même Université sur l'effet de la lumière visible comme facteur limitant de la survie d'*Escherichia coli* en milieu marin en 1991 - 1995. Les travaux de DEA et de thèse ont été effectués à l'Ifremer au Laboratoire de Microbiologie de la Direction de l'Environnement Littoral du centre de Brest.

J'ai été recrutée comme cadre de recherche dans le domaine de la microbiologie sanitaire en février 1995 à l'Ifremer à la Direction de l'Environnement Littoral sur le centre de Brest. Depuis janvier 2013, le Laboratoire de Microbiologie, devenu le Laboratoire Santé, Environnement et Microbiologie (LSEM) a fusionné avec le Laboratoire de Génétique et Pathologie des Mollusques Marins (LGPM de La Tremblade) et le Laboratoire Sécurisation des Productions en Conchyliculture (LSPC implanté à Bouin) pour former l'unité Santé, Génétique et Microbiologie des Mollusques (SG2M). Cette unité est rattachée au Département Ressources Biologiques et Environnement (RBE).

L'essentiel de mon activité de recherche depuis mon entrée à l'Ifremer a porté sur l'étude des bactéries d'origine entérique dans l'environnement littoral.

Dans un premier temps, j'ai poursuivi les études initiées au cours de la thèse sur la survie d'*E. coli* en eau de mer et l'influence de différents facteurs biotiques et abiotiques sur cette survie lors d'expériences en microcosmes.

Puis, j'ai assuré la responsabilité de la partie microbiologie dans un projet pluridisciplinaire à l'Ifremer sur les conséquences des opérations de dragage. Au cours de ce projet, nous avons optimisé la détection des *E. coli* dans les sédiments et évalué l'impact sanitaire d'un dépôt à terre de sédiments portuaires (Morlaix, 29).

J'ai ensuite proposé un sujet sur la recherche des *E. coli* potentiellement pathogènes pour l'Homme dans l'environnement dans le cadre du Programme National d'Ecologie Côtière (PNEC). Nous avons ainsi recherché, au Laboratoire de Microbiologie à l'Ifremer en collaboration avec l'Unité de Microbiologie Alimentaire et Prévisionnelle de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Lyon les *E. coli* producteurs de Shiga-toxines dans les coquillages des différentes façades maritimes françaises de 2002 à 2004.

Depuis 2005, j'ai la responsabilité de la thématique Traceurs de Sources Microbiennes (TSM ; Microbiol Source Tracking, MST) à l'Ifremer. J'ai tout d'abord sélectionné l'approche ciblée sur la recherche de bactéries appartenant à l'ordre des *Bacteroidales*. De nouveaux marqueurs *Bacteroidales* ont été développés et validés dans le cadre de la thèse de doctorat de S. Mieszkin (2007-2010) dont j'avais la responsabilité scientifique. Ces marqueurs ont été étudiés en parallèle à d'autres marqueurs retenus au laboratoire, les bactériophages F ARN spécifiques (resp. M.P. Caprais) et à d'autres marqueurs développés par nos partenaires

scientifiques, *Lactobacillus amylovorus*, marqueur bactérien (Irstea de Rennes), les stanols fécaux (CNRS Géosciences de Rennes), la caféine et autres marqueurs humains (Université d'Angers). Ce travail en collaboration a permis d'évaluer la sensibilité/spécificité de ces marqueurs, d'étudier leur transfert dans les eaux de ruissellement, leur persistance dans les eaux douces et marines et leur présence dans les eaux à l'échelle de bassins versants. Nous avons également appliqué les marqueurs *Bacteroidales* et bactériophages sur d'autres bassins versants et dans des coquillages du littoral dans le cadre d'un projet Interreg AquaManche (2009-2012) en partenariat avec les Universités de Brighton et de Caen et l'Environment Agency d'Exceter.

Dans le cadre du projet national Marquopoleau (2009–2013) dont j'avais la responsabilité scientifique, les marqueurs de l'origine de la contamination fécale les plus performants ont été transférés à des laboratoires d'analyse des eaux pour répondre à la demande des gestionnaires des eaux et des collectivités. Les marqueurs *Bacteroidales* ont été ainsi appliqués sur de nombreux échantillons d'eaux par ces laboratoires d'analyses.

Au cours de cette période, mes activités ont évolué. Si dans la première partie (1995-2006), elles concernaient principalement des développements méthodologiques et des analyses en bactériologie et en biologie moléculaire, dans la deuxième partie (2007-2013), elles consistaient en l'encadrement d'étudiants, principalement, en master II recherche et en thèse ou chercheur en post-doctorat, en la valorisation des travaux réalisés au laboratoire sur ces thématiques et avec nos partenaires scientifiques et en la rédaction de propositions à différents appels d'offre, régional : PRIR Bretagne, nationaux : AFSSET, ANR PRECODD et FUI et européen : Interreg IVA avec nos partenaires. J'ai également organisé en 2010 un colloque sur les avancées des marqueurs de l'origine de la contamination fécale qui a réuni 120 participants à l'Ifremer.

Mes activités dans les prochaines années seront ciblées sur la poursuite des développements et de la validation de méthodes de discrimination des sources de contamination fécale et la recherche de bactéries potentiellement pathogènes comme les *E. coli* pathogènes, les salmonelles et les *Campylobacter* dans l'environnement. Ces études seront réalisées dans le cadre de projets de recherche dont le projet Interreg RiskManche (2012-2015) et la thèse de C. Balière (2012-2015) dont j'assume la co-direction avec A. Rincé de l'Université de Caen.

Dans ce rapport, mes activités de recherche sont développées en première partie. Je présente ensuite les perspectives de recherche. Mon parcours et ma production scientifique sont présentés en dernière partie.

TRAVAUX DE RECHERCHE

Introduction

La contamination des milieux aquatiques par des microorganismes d'origine fécale constitue un risque important pour la santé humaine et une préoccupation pour la pérennité de certains usages, tout particulièrement en zone littorale (Pommepuy *et al.*, 2005^{1*}).

En effet, des bactéries et des virus potentiellement pathogènes pour l'homme, d'origine entérique, ont été retrouvés dans des eaux et des coquillages. Ces microorganismes ont été impliqués dans des toxi-infections alimentaires collectives (TIAC²) lors de la consommation de coquillages contaminés ou dans des infections liées à la consommation d'eaux contaminées ou lors de baignades (Yoder *et al.*, 2008a et b ; Iwamoto *et al.*, 2010 ; Westrell *et al.*, 2010).

Ainsi, des salmonelles, *Campylobacter* ou *E. coli* pathogènes tels que les *E. coli* producteurs de Shiga-toxines (STEC) ont été retrouvés dans des coquillages (Federighi *et al.*, 1997 ; Dupray *et al.*, 1999 ; Guyon *et al.*, 2000 ; DePaola *et al.*, 2010 ; Hervio-Heath *et al.*, 2011* ; Amagliani *et al.*, 2012).

En France, sur la période de 1996 à 2010, plus de 500 TIAC (soit 5 %) ont été attribuées à la consommation de coquillages contaminés alors que le nombre de TIAC, tous aliments confondus, a été estimé à plus de 11 000 (Vaillant *et al.*, 2012). Les norovirus, présents en période épidémique hivernale, sont les microorganismes les plus souvent impliqués dans les TIAC liées aux coquillages. Ils ont été mis en cause dans 54 % des TIAC de 1996 à 2010 en France tandis que des bactéries telles que les salmonelles (8 %), *Staphylococcus aureus* (4 %), *Vibrio parahaemolyticus* (3 % ; bactéries marines) et *Clostridium perfringens* (1 %) ont été moins fréquemment mis en évidence (Vaillant *et al.*, 2012).

Ces microorganismes entériques pathogènes se retrouvent dans les eaux continentales puis dans les eaux littorales par le biais des rejets résultant des activités urbaines et agricoles en amont ou par contact avec les déjections de la faune sauvage. A partir des années 1970, une réglementation a été mise en place pour évaluer les risques sanitaires liés à la présence de ces microorganismes dans les eaux et les coquillages. Ces réglementations sont basées sur la notion d'indicateurs de contamination fécale. *E. coli* et les entérocoques intestinaux, retenus comme indicateurs, sont ainsi recherchés dans les eaux de baignade et les coquillages afin d'évaluer leur qualité microbiologique.

La bactérie *E. coli* constitue l'objet de la première partie de ce mémoire d'HDR. En zone littorale, cette bactérie est aussi bien présente dans les eaux que dans les sédiments ou les coquillages. J'ai tout d'abord étudié le devenir de cette bactérie en eau de mer sous l'influence de facteurs biotiques et abiotiques lors d'expériences en microcosmes. La présence des *E. coli* dans les sédiments et leur éventuelle remise en suspension dans les eaux lors d'opérations de dragages portuaires ont été ensuite évaluées dans le cadre d'un projet pluridisciplinaire à l'Ifremer. Enfin, nous avons recherché la présence d'*E. coli* et des *E. coli* pathogènes, les *E. coli* producteurs de Shiga-toxines (STEC), dans les coquillages de zones conchylicoles des différentes façades maritimes françaises.

¹ * article dont je suis co-auteur

² Un foyer de toxi-infection alimentaire collective : survenue d'au moins 2 cas groupés d'une symptomatologie similaire (souvent digestive) dont on peut rapporter la cause à une même origine alimentaire (Source : JO n° 1487, juin 1988) ; Déclaration obligatoire.

E. coli et les entérocoques intestinaux utilisés dans les réglementations ne permettent pas d'identifier l'origine des contaminations fécales dans l'environnement car ils sont présents à la fois dans les selles humaines et les fèces des animaux. Des méthodes alternatives regroupées sous le terme Traceurs de Sources Microbiennes (TSM ou Microbial Source Tracking, MST) ont été développées. Cette approche constitue la deuxième partie de ce mémoire.

Depuis 2005, j'ai la responsabilité de cette thématique au Laboratoire de Microbiologie de l'Ifremer. J'ai sélectionné l'approche ciblée sur la recherche de bactéries appartenant à l'ordre des *Bacteroidales*. L'analyse phylogénétique des séquences de gène codant les ARNr 16S des *Bacteroidales* issues de fèces et d'effluents d'origine humaine et animale a permis de développer deux marqueurs pour identifier les contaminations fécales par les porcs, Pig2Bac et par les ruminants, Rum2Bac. La sensibilité et la spécificité de ces marqueurs ont été évaluées sur des échantillons de fèces et d'effluents collectés en France mais également sur des eaux contaminées par des fèces et des effluents collectés en Californie. Nous avons eu en effet l'opportunité de participer à une évaluation internationale de marqueurs comprenant 27 laboratoires et 41 méthodes en 2011. L'étude de la persistance de ces marqueurs dans les eaux a été ensuite réalisée en microcosmes d'eau de rivière ou d'eau marine. Enfin, l'application de ces marqueurs dans des eaux issues de différents bassins versants, dans des eaux côtières et dans des coquillages a été réalisée. Les collaborations avec nos partenaires scientifiques ont permis de comparer cette approche basée sur les marqueurs *Bacteroidales* à celle basée sur des bactériophages, sur d'autres bactéries telles que *Lactobacillus amylovorus* ou sur des marqueurs chimiques tels que les stanols fécaux ou la caféine.

Ces différents travaux ouvrent des perspectives sur la poursuite de l'approche TSM dans l'environnement et la recherche de bactéries entériques potentiellement pathogènes comme les *E. coli* producteurs de Shiga-toxines, les salmonelles et les *Campylobacter*. Ces perspectives sont présentées dans la troisième partie de ce mémoire. Les travaux qui seront réalisés permettront de rechercher de possibles relations entre les marqueurs de l'origine de la contamination fécale, les indicateurs de contamination fécale classiques, *E. coli* et les entérocoques intestinaux et les microorganismes potentiellement pathogènes dans les eaux de l'environnement et les coquillages. Ils permettront également de caractériser les microorganismes potentiellement pathogènes présents dans l'environnement et de relier, si possible, leur présence à des activités en amont.

1 *Escherichia coli* en milieu littoral

Parmi les bactéries entériques présentes en zone littorale, *E. coli* est la bactérie la plus étudiée et recherchée dans l'environnement du fait de son rôle d'indicateur de contamination fécale pour le classement des zones de baignade et des zones conchylicoles mais aussi de par l'existence de souches devenues pathogènes pour l'Homme après l'acquisition de facteurs de virulence portés par des éléments mobiles.

Après une présentation d'*E. coli* et de la réglementation européenne appliquée en zone littorale, les travaux réalisés au Laboratoire de Microbiologie¹ à l'Ifremer sur la recherche et la survie d'*E. coli* en zone littorale sont présentés.

1.1 *E. coli* bactérie commensale et pathogène

E. coli ou « colibacille » est une bactérie à Gram négatif, non sporulée, aérobie-anaérobie facultative appartenant à la classe des γ -protéobactéries et à la famille des *Enterobacteriaceae*. *E. coli* représente l'espèce majoritaire des coliformes thermotolérants qui constitue un sous-groupe des coliformes totaux capables de fermenter le lactose à une température de 44,5°C.

L'habitat primaire des *E. coli* est le tractus digestif de l'homme et des animaux à sang chaud. *E. coli* est la souche prédominante de la flore aérobie du tube digestif. Les bactéries *E. coli* sont excrétées dans les fèces à des concentrations d'environ 10^8 colibacilles par g.

Les bactéries *E. coli* se retrouvent dans les eaux environnementales par le biais des effluents, tels que les eaux usées, les lisiers ou les fumiers des animaux d'élevages, et par contact avec les déjections des animaux sauvages ou d'élevage lors des pâturages. L'environnement constitue l'habitat secondaire des *E. coli* qui est, contrairement à l'habitat primaire, plutôt défavorable à leur survie (Winfield and Groisman, 2003).

La bactérie *E. coli* est une bactérie versatile qui comprend, à la fois, des bactéries commensales du tube digestif, des bactéries pathogènes et des bactéries adaptées à l'environnement (Tenaillon *et al.*, 2010).

La majorité des *E. coli* vivent en symbiose dans le colon et sont éliminés par les fèces. Ces bactéries se retrouvent ensuite dans l'environnement et peuvent être mises en évidence par méthode culturale. Les *E. coli* sont aussi des bactéries pathogènes pour l'Homme, intestinales ou extra-intestinales. Elles ont été impliquées dans de nombreuses pathologies humaines. *E. coli* serait responsable de deux millions de morts par an dans le monde (Kosek *et al.*, 2003 ; Russo and Johnson, 2003).

Une souche *E. coli* peut acquérir des facteurs de virulence portés par des éléments génétiques mobiles tels que les îlots de pathogénicité, les bactériophages ou les plasmides. Cette entérobactérie présente ainsi la particularité d'avoir un génome de taille pouvant varier de 4,5 M pb pour une souche commensale à 5,7 M pb pour une souche *E. coli* O157:H7, hautement pathogène qui possède plusieurs facteurs de virulence (Lukjancenko *et al.*, 2010).

¹ en raison des nombreux changements de noms du laboratoire auquel j'appartiens (Laboratoire de Microbiologie, DEL, MIC/LNR ; EMP/MIC ; Laboratoire SEM), le laboratoire est dénommé dans ce mémoire pour les activités réalisées avant janvier 2013 sous l'appellation de Laboratoire de Microbiologie à l'Ifremer.

Le génome d'*E. coli* est constitué d'un « pan » génome (génome qui regroupe l'ensemble des gènes de l'espèce *E. coli*) de plus de 18 000 gènes dont seulement environ 2 000 gènes sont présents dans toutes les souches de cette espèce (formant le « core » génome). Ce « core » génome diminue avec la prise en compte des nouveaux génomes séquencés (Fig. 1). La forte plasticité du génome d'*E. coli* s'illustre, par exemple, par l'épidémie à *E. coli* O104:H4, triple hybride pathogène, en Allemagne et en France en 2011 (Denamur, 2011 ; Mariani-Kurdjian et Bigen, 2011). En moyenne, le génome d'une souche *E. coli* contient entre 4 500 et 5 500 gènes (Touchon *et al.*, 2009 ; Lukjancenko *et al.*, 2010).

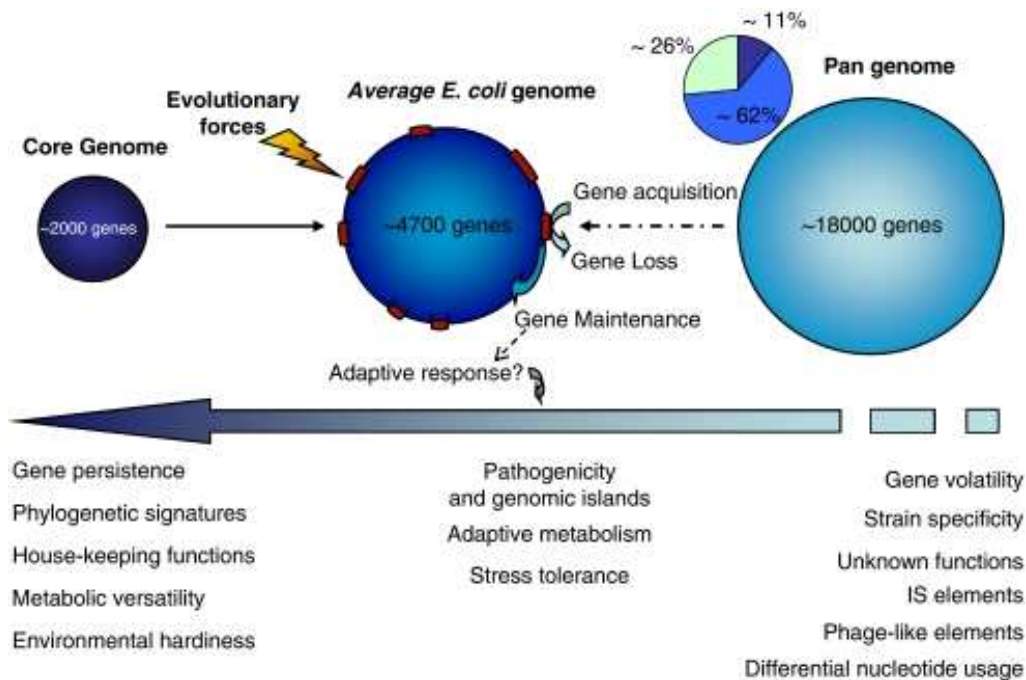


Figure 1 : Présentation du génome d'*E. coli* (van Elsas *et al.*, 2011).

Les facteurs de virulence apportent aux bactéries une meilleure adaptabilité ou « fitness » ; à titre d'exemple, il a été montré que des bactéries qui possédaient ces îlots de fitness, souches extra-intestinales, résistaient mieux à la prédation par des amibes que des souches commensales dépourvues de ces facteurs de virulence (Adiba *et al.*, 2010). De même, des souches *E. coli* (*E. coli* producteurs de Shiga-toxines ; STEC) ayant acquis des gènes codant pour des toxines (gènes *stx1* et *stx2*) par des bactériophages étaient plus résistantes à la prédation par des protistes que des souches *E. coli* sans ces gènes *stx* (Mauro *et al.*, 2013).

Les *E. coli* pathogènes se répartissent en huit principaux types selon les facteurs de virulence que ces souches ont acquis.

Les bactéries intra-intestinales comprennent six de ces types :

- les *E. coli* entéro-pathogènes (EPEC),
- les *E. coli* entéro-hémorragiques (EHEC) qui appartiennent aux *E. coli* producteurs de Shiga-toxines,
- les *E. coli* entéro-toxigéniques (ETEC),
- les *E. coli* entéro-aggrégatives (EAEC),

- les *E. coli* entéro-invasives (EIEC) et
- les *E. coli* à adhésion diffuse (DAEC) (pour revue récente sur les *E. coli* intra-intestinaux, Croxen *et al.*, 2013).

Les bactéries extra-intestinales se répartissent selon deux types, les *E. coli* uro-pathogènes (UPEC) et les *E. coli* responsables de méningites néonatales (NMEC).

Il existe une diversité importante au sein de l'espèce *E. coli*. La classification des souches repose principalement sur la recherche d'antigènes. Actuellement, 174 antigènes somatiques O et 53 antigènes flagellaires H d'*E. coli* ont été identifiés (Wang *et al.*, 2003 ; DebRoy *et al.*, 2011). Par ailleurs, les populations d'*E. coli* peuvent être réparties en plusieurs groupes phylogénétiques dont quatre groupes majeurs A, B1, B2 et D et trois groupes mineurs C, E et F. Les bactéries commensales appartiennent aux groupes A et B1. Les *E. coli* pathogènes appartiennent à des groupes phylogénétiques différents : principalement A, B1 et E pour les souches intra-intestinales et B2 et D pour les souches extra-intestinales (Clermont *et al.*, 2011).

1.2 *E. coli* et la réglementation en zone littorale

Depuis les années 1970, une réglementation européenne pour les eaux et les coquillages a été mise en place afin d'améliorer la qualité microbiologique des eaux de baignade et des eaux conchylicoles. Cette réglementation repose sur la détection des indicateurs de contamination fécale que sont les *E. coli* et les entérocoques. Les réglementations qui sont actuellement en usage sont la directive 2006/7/CE pour les eaux de baignades et le Paquet Hygiène et en particulier le règlement 854/2004/CE pour les zones conchylicoles. L'objectif du Paquet Hygiène est de mettre en place une politique unique et transparente en matière d'hygiène des denrées alimentaires.

1.2.1 La réglementation concernant les eaux de baignade

En France, la surveillance des zones de baignade est assurée pendant la saison estivale par les Agences Régionales de la Santé (ARS¹). Les eaux de baignade sont classées selon la directive européenne 2006/7/CE (Tab. 2), qui est une directive fille de la Directive Cadre sur l'Eau (DCE ; 2000/60/CE). L'objectif de la DCE est d'atteindre d'ici 2015 le bon état écologique et chimique des milieux aquatiques et des bassins versants sur tout le territoire européen.

Les eaux de baignade sont classées en trois catégories selon les niveaux de concentrations en *E. coli* et en entérocoques intestinaux présents dans les eaux (Tab. 1).

¹ <http://baignades.sante.gouv.fr/baignades/editorial/fr/accueil.html>

Tableau 1 : Réglementation sanitaire microbiologique des eaux intérieures et des eaux côtières et de transition selon la directive européenne 2006/7/CE.

Paramètres (UFC/100 ml)	Excellente qualité	Bonne qualité	Qualité suffisante	Méthodes de référence pour l'analyse
<i>E. coli</i>	500 ^{a,c} /250 ^{a,d}	1 000 ^{a,c} /500 ^{a,d}	900 ^{b,c} /500 ^{b,d}	ISO 9308-3 ou ISO 9308-1
Entérocoques intestinaux	200 ^{a,c} /100 ^{a,d}	400 ^{a,c} /200 ^{a,d}	330 ^{b,c} /185 ^{b,d}	ISO 7899-1 ou ISO 7899-2

^a Evaluation au 95^{ème} percentile, ^b Evaluation au 90^{ème} percentile, ^c Eaux intérieures, ^d Eaux côtières et de transition.

La directive 2006/7 /CE renforce le principe de gestion des eaux de baignade qui présentent un risque pour la santé des baigneurs en imposant l'établissement d'un profil de vulnérabilité des eaux de baignade pour chaque site. Ce profil nécessite une identification et une étude des sources de contaminations fécales et la mise en place d'actions sur ces sources pour améliorer la qualité des eaux.

En 2012, les eaux de baignades côtières françaises ($n=2034$) ont été classées en « excellente qualité » pour 66,3 % d'entre elles, en qualité bonne ou suffisante pour 20,8 % et en qualité insuffisante pour 2 %. Pour 10,9 % des eaux, le nombre d'échantillons analysés durant la saison de baignade était insuffisant pour que la zone de baignade soit classée (AEE, 2013).

1.2.2 La réglementation concernant les zones conchylicoles

En Europe, les zones conchylicoles sont classées selon les concentrations en *E. coli* mesurées dans les coquillages contrairement aux Etats-Unis et au Canada où ces zones sont classées selon les concentrations en *E. coli* mesurées dans les eaux conchylicoles (Lee and Murray, 2010 ; US FDA, 2011).

Le classement des zones conchylicoles selon la directive européenne distingue trois classes A, B et C suivant les niveaux de contamination microbiologique et chimique. L'importance de la contamination microbiologique dans les coquillages est évaluée par l'indicateur *E. coli* (Tab. 2) tandis que l'évaluation de la contamination chimique prend en compte les taux de cadmium, mercure et plomb. En fonction des niveaux de contamination rencontrés, les usages sont réglementés (Tab. 2).

Tableau 2 : Réglementation sanitaire des zones de production conchylicole et usages associés selon le règlement 854/2004/CE du parlement européen et du conseil.

Classes	Seuil (<i>E. coli</i> /100 g CLI ^a)	Usage professionnel	Usage récréatif
A	100 % des résultats < 230 <i>E. coli</i>	Elevage et pêche autorisés, possibilité vente directe (sans traitement)	Pêche autorisée
B	90 % des résultats < 4 600 <i>E. coli</i> 10 % des résultats > 4 600 et < 46 000 <i>E. coli</i>	Elevage et pêche autorisés, mais traitement de purification avant commercialisation	Pêche tolérée ^b
C	100 % des résultats < 46 000 <i>E. coli</i>	Elevage et pêche interdits excepté dérogation préfectorale	Pêche interdite

^a Chair et Liquide Intervalvaire, ^b Cuisson fortement conseillée avant consommation

En France, la surveillance des zones conchylicoles est assurée toute l'année par le réseau REMI¹ (réseau de contrôle microbiologique) d'Ifremer, créé en 1989 qui assure une surveillance régulière des zones conchylicoles et une surveillance en alerte. Le dispositif d'alerte peut être déclenché par le laboratoire en charge du contrôle de la zone :

- lors d'une augmentation du risque de contamination fécale dû à des événements météorologiques, par exemple,
- lorsqu'une contamination fécale anormale est détectée,
- lors de TIAC dont l'origine coquillière est suspectée.

En 2010, la qualité a été évaluée pour 261 zones classées (Amouroux et Bizzozero, 2011). Seulement six zones ont été classées en A (2,3 %), 227 zones ont été classées en B (87 %) et 15 zones ont été classées en C (5,7 %). Treize zones avaient des seuils en *E. coli* supérieurs à la classe C et ont donc été considérées comme insalubres (5 %).

Pour la période 2001-2010, aucune évolution significative n'a été mise en évidence pour 146 points tandis qu'une amélioration a été constatée pour 39 points et une dégradation pour 87 points. En 2010, 205 alertes ont été déclenchées par le REMI.

La qualité microbiologique des zones concernant les fousseurs est généralement moins bonne que celles concernant les non fousseurs. En 2010,

- pour les fousseurs ($n=77$ zones), 1 zone était classée en A (1,3%), 57 zones en B (74%), 13 en C (13 %) et 8 zones en zone insalubre (11,7%),
- pour les non fousseurs ($n=184$ zones), 5 zones étaient en A (2,7%), 170 zones en B (92,4%), 5 en C (2,7 %) et 4 en zone insalubre (2,2%) (Amouroux et Bizzozero, 2011).

1.2.3 La réglementation concernant les zones de pêche récréative

La consommation de coquillages issus des gisements naturels n'est pas soumise à une réglementation européenne. Toutefois, en France, par analogie au classement sanitaire des zones conchylicoles, les ARS élaborent des niveaux de contamination (Tab. 2).

Pour une information du public sur la qualité microbiologique des zones de pêche récréative en Bretagne, un site internet (<http://www.pecheapied-responsable.fr/>) a été mis en ligne en 2013 par les collègues des LER d'Ifremer en collaboration avec les ARS.

1.2.4 Les sédiments côtiers et portuaires

La qualité microbiologique des sédiments n'est pas soumise à une réglementation en France. Toutefois, la présence de bactéries au niveau des sédiments superficiels peut avoir des conséquences sur la qualité des eaux conchylicoles ou de baignades par la remise en suspension de ces sédiments dans la colonne d'eau.

¹ http://envlit.ifremer.fr/surveillance/microbiologie_sanitaire/presentation

E. coli étant aussi bien présent dans les eaux, les coquillages que dans les sédiments superficiels en zone littorale (Sonier *et al.*, 2008 ; Derolez *et al.*, 2013 ; Mieszkin *et al.*, 2013*), j'ai abordé les études sur *E. coli* en prenant en compte ces trois compartiments.

1.3 *E. coli* dans les eaux

Les eaux côtières constituent un milieu défavorable pour la survie des bactéries entériques et particulièrement pour la bactérie *E. coli*.

Dans des conditions de stress, cette bactérie perd sa capacité à cultiver et n'est plus retrouvée par les méthodes classiques de dénombrement des *E. coli*. Elle évolue vers un état viable non cultivable (VNC). Elle possède encore une activité métabolique et peut être potentiellement pathogène pour l'Homme. Ce passage vers un état VNC est observé chez *E. coli* et d'autres bactéries comme les *Campylobacter*, les salmonelles ou *Vibrio*, par exemple (Roszak and Colwell, 1987 ; Pommepuy *et al.*, 1996b ; Cappelier *et al.*, 1999 ; Coutard *et al.*, 2005).

En zone littorale, *E. coli* est soumis à plusieurs pressions, biotiques (prédation et compétition de flore) et abiotiques (salinité, lumière, température et oligotrophie) (Barcina *et al.*, 1991 ; Martin *et al.*, 1998 ; Trousselier *et al.*, 1998* ; Rozen and Belkin, 2001). Selon les pressions présentes, *E. coli* perd plus ou moins rapidement sa capacité à cultiver sur milieu de culture.

La disparition des bactéries est estimée généralement par la mesure du T90, c'est-à-dire le temps nécessaire pour que 90 % des bactéries ne soient plus retrouvées par culture (Chick, 1908 ; Crane and Moore, 1986 ; Salomon and Pommepuy, 1990 ; Pommepuy *et al.*, 2005). Ce T90 est couramment utilisé pour comparer, d'une étude à l'autre, la persistance des bactéries dans les eaux et pour modéliser le devenir des bactéries en milieu marin (couplage des modèles de survie des bactéries à des modèles hydrodynamiques ; Fiandrino *et al.*, 2003 ; Gourmelon *et al.*, 2010c*).

Des valeurs de T90 :

- de 5-35 h en eau de mer à 18-22°C,
- de 67-81 h en eau de mer à 4-5°C,
- de 96-500 h en eau estuarienne à 18-22°C et
- de 120-235 h en eau estuarienne à 4-5°C ont été rapportées (Salomon and Pommepuy, 1990 ; Trousselier *et al.*, 1998* ; Wait and Sobsey, 2001).

Parmi les nombreux facteurs responsables de cette perte de cultivabilité des bactéries entériques en milieu marin, la lumière solaire est un des facteurs prédominants (Sinton *et al.*, 1994 ; Pommepuy *et al.*, 1996a*). Des variations jour/nuit ont ainsi été observées (Bellair *et al.*, 1977). La pénétration de la lumière est affectée par la turbidité des eaux qui a par conséquent un impact sur le T90 (Pommepuy *et al.*, 1992 ; Kay *et al.*, 2005). Une relation entre le T90 et l'intensité de la lumière du jour, les concentrations en matières en suspension et la profondeur a été mise en évidence pour *E. coli* à partir de données expérimentales (Guillaud *et al.*, 1997*).

E. coli évolue vers un état VNC dans les eaux côtières. Cet état VNC a été mis en évidence, par exemple, lors d'expériences réalisées avec une souche *E. coli* entérotoxigène en chambres à diffusion immergées en baie de Morlaix, Finistère (Pommepuy *et al.*, 1996b*).

Au Laboratoire de Microbiologie à Ifremer¹, lors d'études en microcosmes, nous avons montré qu'*E. coli* évoluait rapidement dans l'eau de mer vers cet état VNC lorsqu'il était exposé à la lumière visible tandis qu'à l'obscurité la capacité à cultiver se maintenait plus longtemps (Gourmelon *et al.*, 1994* ; Gourmelon, 1995*).

La survie d'*E. coli* en eau de mer est déterminée par l'état physiologique de la bactérie au moment du rejet dans l'environnement et par la qualité du milieu récepteur. Nous avons ainsi montré qu'*E. coli* résistait mieux, par exemple, au stress lumineux quand il était en début de phase stationnaire avant son séjour en eau de mer, que lorsqu'il était en phase exponentielle de croissance (Gourmelon *et al.*, 1997²* ; Trousselier *et al.*, 1998*). Cette meilleure survie en phase stationnaire lors de l'exposition à la lumière visible est due, au moins en partie, au facteur RpoS. Le facteur sigma RpoS est un facteur alternatif de l'ARN polymérase actif durant la phase stationnaire. Il joue un rôle clef dans la survie en phase stationnaire et la réponse généralisée au stress en contrôlant l'expression de nombreux gènes (Lange and Hengge-Aronis, 1991 ; McCann *et al.*, 1991 ; Loewen *et al.*, 1998). Le facteur RpoS contrôle ainsi environ 500 gènes d'*E. coli* (soit environ 10 % du génome ; Weber *et al.*, 2005). Nous avons ainsi montré que son effet protecteur au stress lumineux est dû en partie à une synthèse des catalases et de la protéine Dps (DNA-binding protein from starved cells ; Gourmelon *et al.*, 1997*). Le facteur RpoS intervient également dans la réponse à d'autres stress rencontrés en milieu marin tels que le stress osmotique et la carence en éléments nutritifs (Munro *et al.*, 1995 ; Rozen and Belkin, 2001).

Les conditions environnementales rencontrées par les bactéries avant leur exposition à l'eau de mer ont également une influence sur leur survie ultérieure et une pré-adaptation à certains facteurs défavorables a montré un effet bénéfique sur leur survie (Munro *et al.*, 1994 ; Dupray *et al.*, 1995 ; Gourmelon *et al.*, 1997*). L'eau de mer, par sa haute teneur en sels (34 ‰) et son caractère oligotrophique, joue un rôle non négligeable dans la sensibilité de la bactérie à des facteurs comme la lumière. En effet, quand la salinité est abaissée à 20 ‰, ou mieux à 10 ‰, l'entérobactérie survit mieux au stress lumineux. De même, l'apport d'une faible quantité de nutriments (glucose à 18 mg/l, par exemple) dès l'immersion dans l'eau de mer permet à *E. coli* de mieux résister à la phototoxicité. Lorsque l'addition est retardée de 24 ou 48 heures, la protection est beaucoup plus faible, la bactérie ayant déjà subi des dommages. De plus, quand les bactéries sont placées 24 ou 48 heures à l'obscurité dans l'eau de mer, elles survivent mieux ensuite à l'exposition à la lumière visible dans l'eau de mer (Gourmelon *et al.*, 2002c*).

1.4 *E. coli* et les sédiments superficiels

Les bactéries rejetées dans l'environnement sont souvent liées à des particules de petite taille. Les bactéries liées à ces particules, présentes dans la colonne d'eau, vont se déposer au niveau des sédiments superficiels des rivières, estuaires et zones côtières. Elles y survivent plus longtemps que dans les eaux de surface (Albinger, 1993 ; Pommepuy *et al.*, 1990). Dans l'étude d'Auer et Niehaus, en 1993, 90,5 % des coliformes thermotolérants étaient, par exemple, associés à des particules de 0,45 µm à 10 µm.

Les sédiments superficiels, sableux ou vaseux, constituent un réservoir pour les bactéries entériques telles qu'*E. coli*, *Salmonella* et *Campylobacter*. La remise en suspension

¹ Etudes dans le cadre de la thèse de doctorat.

de ces sédiments peut être à l'origine de contamination de zones conchylicoles ou de baignade à proximité (Obiro-Danso and Jones, 2000 ; Yahamara *et al.*, 2012). De nombreuses études ont montré que la charge microbienne des sédiments était plus importante que celle de l'eau surnageante et d'autant plus importante que des zones industrielles, agricoles ou urbaines se trouvaient à proximité (Irvine and Pettibone, 1993 ; Martinez-Manzanares *et al.*, 1992 ; Craig *et al.*, 2002 ; Sonier *et al.*, 2008 ; Ibekwe *et al.*, 2011). Parmi les *E. coli* présents dans les sédiments, certaines souches sont pathogènes pour l'Homme. Ainsi, des *E. coli* pathogènes extra-intestinaux ont été retrouvés dans les sédiments côtiers en Italie (Luna *et al.*, 2010 ; Vignaroli *et al.*, 2012).

Les bactéries présentes dans les sédiments peuvent être remises en suspension lors de phénomènes de marées, de certaines conditions météorologiques *i.e.*, tempêtes, fortes pluies, vents violents, lors de passage de bateaux ou au cours d'opérations de dragage des sédiments portuaires (Crenn *et al.*, 1999*).

Si la présence de polluants chimiques dans les sédiments portuaires avait fait l'objet de nombreuses études, peu d'études s'étaient orientées vers la composante microbienne (Grimes, 1980 et 1982 ; Pommepuy *et al.*, 1990 ; Crenn *et al.*, 1999*). Pour évaluer les conséquences des remises en suspension des sédiments sur la qualité microbiologique des eaux lors des opérations de dragage, un projet pluridisciplinaire " Rejets de dragages " a été mené en interne à Ifremer (1998-2003). Dans ce projet, j'ai eu la responsabilité de la partie microbiologie avec la réalisation des analyses, l'exploitation et l'interprétation des données et l'élaboration de recommandations pour limiter le risque microbiologique lors des opérations de dragage ou de désenvasements portuaires.

Dans un premier temps, des efforts méthodologiques importants ont été entrepris pour dénombrer de façon optimale les *E. coli* dans les sédiments. Dans ce but, des protocoles de décrochage des bactéries des particules et de dénombrement des *E. coli* ont été comparés. Ils ont permis de sélectionner un protocole efficace pour ensuite dénombrer les *E. coli* par méthode culturale dans les sédiments (Gourmelon *et al.*, 2002b*).

Des sédiments superficiels ont été collectés sur différents sites dans le Finistère ($n=26$). Ils présentaient des concentrations en *E. coli* très variables (de $2 \cdot 10^2$ à $9,6 \cdot 10^6$ - moyenne géométrique $7 \cdot 10^4$ - NPP par 100 g de sédiment humide). Les sédiments présentaient également des concentrations en carbone organique total (COT) variables (de 1 à 5,5 %) et une prédominance des particules de 4 à 63 μm (vase), ces particules représentant 66,8 à 79,8 % de l'ensemble des particules. Les autres particules correspondaient pour 9,3 à 20,2 % à des particules inférieures à 4 μm (argile) et pour 5,1 à 22,9 % à des particules > 63 μm (sable).

Deux principaux types d'opérations de dragage ont été étudiés dans le projet « Rejets de dragage » : une immersion des sédiments d'un bassin du port de Marseille en mer (Fos sur mer ; 13) et un dépôt à terre des sédiments du bassin à flot du port de Morlaix (29).

Le site de Marseille n'a pas été retenu en microbiologie en raison d'une trop faible contamination fécale des sédiments à draguer par rapport à celle des sédiments du site d'immersion (Gourmelon *et al.*, 1999*). Les conséquences du point de vue microbiologique des dépôts à terre des sédiments portuaires de Morlaix, plus contaminés, ont pu être étudiées.

En préalable à l'opération de dragage dans le port de Morlaix, une campagne pluridisciplinaire a été réalisée en février 1999 afin de déterminer la composition des sédiments à draguer en différents contaminants biologiques ou chimiques. Les sédiments ont été prélevés par carottage : trois carottes de sédiments d'environ trois mètres de long ont ainsi été prélevées en trois points du bassin. Les résultats ont montré une contamination importante en bactéries fécales des sédiments superficiels (soit, par exemple, une concentration en coliformes thermotolérants de $5 \cdot 10^3$ à $2 \cdot 10^5$ UFC par 100 g de sédiment humide) avec un gradient des numérations bactériennes selon un axe amont-aval. Une diminution des concentrations a été observée avec la profondeur. Nous pouvons également noter la présence de *Clostridium perfringens* présumés sur toute la longueur de la carotte (concentrations d' $1 \cdot 10^5$ à $1 \cdot 10^6$ spores par 100 g de sédiment humide) (Gourmelon *et al.*, 2003a*).

La surveillance réalisée à l'occasion des dépôts à terre des sédiments portuaires de Morlaix n'a pas mis en évidence d'apport significatif des contaminants microbiologiques au réseau hydrographique du site, suggérant le bien fondé du choix d'un dépôt à terre de ces sédiments plutôt qu'une immersion en mer (Gourmelon *et al.*, 2002a* ; Gourmelon *et al.*, 2003a*). Cette option avait été retenue du fait de la présence de kystes d'*Alexandrium* dans les sédiments portuaires et donc du risque de dissémination de ces kystes par une immersion en mer.

Un des objectifs de ce projet était d'émettre des recommandations pour limiter le risque sanitaire lors des opérations de dragage et pour ce qui nous concerne, le risque microbiologique associé à la présence d'*E. coli* dans les sédiments (GéodRisk, CD Rom ; Alzieu *et al.*, 1999-2001*). A notre connaissance, aucune norme ou recommandation n'existait sur l'évaluation de la contamination microbienne des sédiments. Aussi, pour suggérer des seuils pouvant présenter un risque, nous nous sommes basés principalement : 1) sur les conclusions des rares études publiées et en particulier sur les conclusions de deux études évaluant le caractère plus ou moins dégradé de certaines zones côtières et dans lesquelles les auteurs avaient défini une échelle de contamination des sédiments en coliformes thermotolérants (Lac Ontario, Canada) (Dutka *et al.*, 1986 ; Brüggermann and Halfon, 1997) et 2) sur les concentrations en *E. coli* et les valeurs des paramètres physico-chimiques mesurées dans les sédiments au cours de ce projet.

Nous avons émis les recommandations suivantes. Des concentrations en *E. coli* dans les sédiments superficiels de l'ordre de $1 \cdot 10^4$ NPP par 100 g de sédiment sec peuvent suggérer un risque de contamination des eaux au voisinage de l'opération de dragage. La nature du sédiment est un facteur à prendre également en considération ; un pourcentage élevé en particules fines et des teneurs supérieures à 3 - 4 % de COT sont des facteurs favorables à des concentrations microbiennes importantes. Ces recommandations sont toujours d'actualité et ont été reprises lors d'une revue bibliographique récente concernant le risque microbiologique des sédiments de dragage, préparé pour le Groupe d'Etudes et d'Observation sur le Dragage et l'Environnement (GEODE) (Mauffret, 2012).

1.5 *E. coli* dans les coquillages - *E. coli* et *E. coli* pathogènes, les STEC

Les bactéries présentes dans la colonne d'eau, issues des rejets des activités en amont ou remises en suspension à partir des sédiments superficiels, peuvent être filtrées et concentrées dans les coquillages des zones conchylicoles et de pêches récréatives. Cette concentration varie selon les espèces de coquillages et les pressions biotiques et abiotiques

rencontrées dans les conditions de l'étude. Des études d'évaluation des facteurs de concentrations des bactéries par les coquillages ont été réalisées *in situ* ou en microcosmes d'eau de mer (Pommepuy *et al.*, 2010). Des concentrations en *E. coli* de 1 à plus de 100 fois plus importantes dans les coquillages que dans les eaux environnantes ont été ainsi retrouvées (Prieur *et al.*, 1990 ; Burkhart and Calci, 2000 ; Shieh *et al.*, 2003).

De nombreuses études ont été publiées sur la présence et les concentrations en *E. coli* dans différents types de coquillages (Love *et al.*, 2010 ; Derolez *et al.*, 2013 ; Campos *et al.*, 2013) Toutefois, très peu d'études ont porté sur la présence d'*E. coli* pathogènes dans les coquillages, présence qui peut présenter un risque pour la santé humaine lors de leur consommation. Aussi, j'ai proposé un sujet d'étude dans le cadre du programme PNEC (Programme National d'Environnement Côtier) et nous avons recherché de 2002 à 2004 la présence d'*E. coli* pathogènes dans les coquillages de zones conchylicoles françaises¹.

1.5.1 Présentation des *E. coli* producteurs de Shiga-toxines

Les *E. coli* pathogènes que nous avons recherchés dans les coquillages sont les *E. coli* producteurs de Shiga-toxines (STEC), souches bactériennes qui ont acquis par des bactériophages des gènes codant pour des toxines : les gènes *stx1* et *stx2*. Ces bactéries sont à l'origine de pathologies digestives (colites hémorragiques) ou extra-digestives (syndrome hémolytique et urémique, SHU) (AFSSA, 2003).

Les *E. coli* producteurs de Shiga-toxines ne sont connus que depuis 1982, date à laquelle l'*E. coli* O157:H7 a été isolé pour la première fois dans des épidémies de colites hémorragiques aux Etats-Unis liées à la consommation de hamburgers contaminés (Riley *et al.*, 1983). Les STEC ont été depuis mis en cause dans plusieurs épidémies ou cas sporadiques de colites hémorragiques ou de SHU au niveau international Chalmers *et al.*, 2000 ; King *et al.*, 2012 ; Vally *et al.*, 2012 ; EFSA, ECDC, 2013).

Environ 400 sérotypes possédant des gènes *stx* ont été identifiés à ce jour. On distingue généralement les *E. coli* O157, les STEC les plus couramment impliqués dans les pathologies humaines des *E. coli* STEC non O157, moins impliqués et plus difficilement mis en évidence par les méthodes de détection utilisées à ce jour.

Les souches STEC pathogènes pour l'homme sont regroupées dans le sous-groupe des EHEC (*E. coli* entérohémorragiques ; Brugère *et al.*, 2012). Elles comprennent les EHEC « typiques » qui ont la possibilité de provoquer des lésions dites d'« attachement et d'effacement » (A/E) des cellules de la muqueuse de l'iléon distal et du côlon par l'intermédiaire de l'intimine, une protéine de membrane externe. Ces bactéries ont acquis un îlot de pathogénicité, le LEE (Locus of Enterocyte Effacement) portant le gène *eae* (*E. coli* attaching and effacing) codant pour l'intimine. Les EHEC « typiques » comprennent ainsi les sérotypes « potentiellement hautement pathogènes » suivants : O26:H11, O103:H2; O111:H8, O145:H28, O157:H7 et leur dérivés non mobiles (aussi dénommés EHEC typiques majeurs), responsables de la grande majorité des SHU (AFSSA, 2008 et 2010). Les EHEC « atypiques » comprennent les souches EHEC ne possédant pas le gène *eae* et ne produisant donc pas les lésions d'attachement et d'effacement. Ces souches possèdent d'autres mécanismes d'adhésion à la muqueuse colique telles que des adhésines. L'*E. coli* O104:H4, responsable

¹ Travail réalisé dans le cadre de l'ART5 du PNEC. Participants : Unité de Microbiologie Alimentaire et Prévisionnelle et LNR des *E. coli*, Federal Institute for Risk Assessment de Berlin.

des infections liées à la consommation de graines germées en Allemagne et en France, en 2011, fait ainsi partie de ces EHEC (Bielaszewka *et al.*, 2011 ; King *et al.*, 2012) .

En Europe, les STEC ont représenté 9 485 cas d'infections en 2011. Une forte augmentation a été observée en 2011 du fait principalement du foyer épidémique important de la souche *E. coli* O104:H4 en Allemagne et en France, associé aux graines germées. Une tendance à la hausse avait toutefois déjà été rapportée au cours des années précédentes (EFSA, ECDC, 2013).

En France, depuis 2002, seules huit toxi-infections alimentaires collectives investiguées ont été attribuées à des STEC :

- souche *E. coli* O148:H8 dans de la viande de mouton en 2002 (11 cas),
- souche *E. coli* O157:H7 dans des fromages de chèvre au lait cru en 2004 (3 cas), dans de la viande hachée de bœuf congelée en 2005 (69 cas), et dans de la viande fraîche en 2012 (6 cas),
- souches *E. coli* O26:H11 et O80:H2 dans du camembert en 2005 (16 cas),
- souche *E. coli* O123:H- dans des hamburgers en 2009 (2 cas),
- souche *E. coli* O104:H4 dans des graines germées en 2011 (15 cas),
- souches *E. coli* O157:H- et O177:H25 dans de la viande hachée de bœuf congelée en 2011 (18 cas) (Loukiadis *et al.*, 2012).

A notre connaissance, aucune TIAC liée aux coquillages et à des STEC a été rapportée à ce jour dans le monde.

L'évaluation de la présence des *E. coli* producteurs de Shiga-toxines dans les coquillages du littoral est primordiale du fait des activités urbaines et agricoles en amont, sources potentielles d'apport de ces bactéries aux zones côtières. Le pâturage des bovins ou des ovins à proximité des zones conchylicoles ou de pêches récréatives pourrait constituer, par exemple, une source de contamination de l'environnement littoral par ces bactéries. En effet, le tube digestif de ces animaux constitue le principal réservoir des STEC (Hancock *et al.*, 2001 ; Le Jeune *et al.*, 2001). D'autres animaux d'élevages, animaux sauvages ou oiseaux sont aussi porteurs de ces bactéries (Caprioli *et al.*, 2005 ; Mora *et al.*, 2012 ; Chandran et Mazumber, 2013). Enfin, ces bactéries sont également présentes dans les eaux usées urbaines (AFSSA, 2003 ; Vernozy-Rozand *et al.*, 2004).

1.5.2 Etude de la présence des STEC dans les coquillages

De 2002 à 2004, nous avons recherché la présence de STEC dans des coquillages de différentes façades maritimes françaises. En effet, peu de données étaient disponibles sur la présence des *E. coli* porteurs de Shiga-toxines dans l'environnement littoral et tout particulièrement dans les coquillages (Kumar *et al.*, 2001, 2004 ; Guyon *et al.*, 2000 ; MacRae *et al.*, 2003 ; Rampersad *et al.*, 1999 ; Samadpour *et al.*, 1994).

Après avoir défini un protocole de recherche de ces bactéries dans les coquillages (Gourmelon *et al.*, 2003b*), elles ont été recherchées, dans 72 lots de coquillages (huîtres, moules et coques) issus de 6 sites correspondant à des zones conchylicoles classées en B ou apparentées et d'un site interdit à la conchyliculture en aval d'un rejet de station d'épuration (Fig. 2 ; Gourmelon *et al.*, 2006b* ; Gourmelon, 2006*).

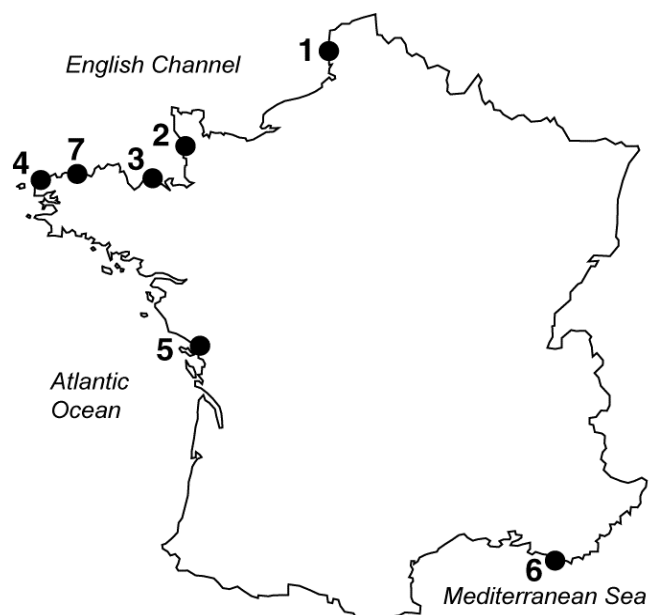


Figure 2 : Localisation des points de prélèvements des lots de coquillages (sites 1-6 : zones conchylicoles classées en B ; 7 : site insalubre en aval d'une station d'épuration). Les coquillages prélevés correspondent à des huîtres (*Crassostrea gigas*) pour les sites 3, 4 et 7, à des moules : *Mytilus galloprovincialis* pour le site 6 et *Mytilus edulis* pour les sites 1, 2 et 5 et à des coques (*Cerastoderma edule*) pour le site 3.

Brièvement, sur ces 72 lots de coquillages, les *E. coli* O157 ont été recherchés dans les bouillons d'enrichissement de 6 h de broyat de coquillages (chairs et liquides intervalvaires, CLI et tissus digestifs des coquillages) par immuno-séparation magnétique et isolement sur milieux spécifiques tandis que les STEC ont été recherchés par hybridation sur colonie avec une sonde *stx* commune dans les bouillons d'enrichissement de 24 h de coquillages, positifs en *stx* par PCR (Anon., 2001, ISO 16654 ; Gourmelon *et al.*, 2006*).

Des concentrations en l'indicateur *E. coli* de < 18 à 160 000 NPP par 100 g de CLI ont été mesurées dans les coquillages avec des moyennes géométriques variant de 116 à 2 419 NPP par 100 g de CLI selon les sites de prélèvements (Gourmelon *et al.*, 2006*).

Les gènes *stx1* et *stx2* codant les Shiga-toxines ont été détectés dans 27,8 % des enrichissements réalisés à partir des coquillages. Cinq souches STEC possédant ces gènes ont été isolées (Tab. 3). Toutefois, il faut préciser que les coquillages analysés dans cette étude ne pouvaient pas être commercialisés directement, mais seulement après une purification des coquillages pendant 48 h (classe B). Par conséquent, la probabilité d'avoir un taux de contamination par les STEC dans des coquillages est plus faible pour les coquillages mis sur le marché.

Ces souches possédaient la Shiga-toxine I ou un variant de cette toxine (présence des gènes *stx1* ou *stx1d*). Certains sérotypes identifiés, les *E. coli* O38:H26 et O149:H1 n'avaient pas encore été identifiés parmi les souches STEC. Une souche *E. coli* O38:H26 a été isolée depuis, par exemple, dans la viande de bœuf en Nouvelle-Zélande (Brandt *et al.*, 2011) et une

souche *E. coli* O149:H1 a été isolée du sol d'exploitations bovines en Irlande (Scott *et al.*, 2009).

Par ailleurs, une souche *E. coli* O157:H7 non productrice de Shiga-toxine (absence de gène *stx*) a été détectée dans un bouillon d'enrichissement positif en *stx* par PCR à partir d'un lot d'huîtres (Tab. 3). Dans d'autres études, des souches *E. coli* O157 sans gènes *stx* ont été isolées également dans des déjections bovines, des fientes aviaires et des échantillons environnementaux (Vernozy-Rozand *et al.*, 2000 ; Wetzel and Le Jeune, 2007). Il est difficile de savoir si les souches *E. coli* O157 *stx* négatives isolées d'échantillons positifs en *stx* ont perdu le gène *stx* dans l'environnement ou lors de l'étape d'isolement. Ces souches auraient la possibilité de récupérer des gènes *stx* par des bactériophages et de devenir des souches EHEC.

Les souches STEC isolées au cours de cette étude semblent avoir un pouvoir pathogène plus faible que les souches isolées en pathologie humaine : absence des autres gènes de virulence tels que les gènes *stx2*, *eae* et faible cytotoxicité des souches (évaluée *in vitro* sur cellules Vero). Les sérotypes isolés ne font pas partie des EHEC typiques majeurs (AFSSA, 2010). Le variant *stx1d*, qui avait été récemment décrit, n'avait pas encore été isolé dans des coquillages ou en France (Gourmelon *et al.*, 2006*).

Tableau 3 : Caractérisation des souches STEC ou *E. coli* O157:H7 isolées à partir de lots de coquillages (Gourmelon *et al.*, 2006*).

Site	Nom de la souche	Description des échantillons positifs			Sérotype	SOR	Hémo-lysine	GUD	Mobilité	VCA	Gènes		
		Coquillages	CLI ou TD	E. coli (/100g CLI)							<i>stx</i> (type)	<i>eae</i>	<i>ehxA</i>
2	IF Ec PB1	Moules	CLI	189	O38:H26	P	N	P	P	P	P (<i>stx1</i>)	N	N
5	IF Ec LR2	Moules	CLI	1 300	O100:H21	P	N	P	P	P	P (<i>stx1d</i>)	N	N
2	IF Ec PB4	Moules	CLI	120	O38:H26	P	N	P	P	P	P (<i>stx1</i>)	N	N
4	IF Ec AB8 CLI	Huîtres	CLI	1 400	O149:H1	P	N	P	P	P	P (<i>stx1d</i>)	N	N
4	IF Ec AB8 TD	Huîtres	TD	1 400	O149:H1	P	N	P	P	P	P (<i>stx1d</i>)	N	N
7	IF Ec SP5	Huîtres	CLI	3 100	O157:H7	N	P Ehly	N	P	N	N	P	P

CLI, chair et liquide intervalvaire ; TD, tissus digestifs ; SOR : fermentation du sorbitol ; GUD : production de β -glucuronidase ; VCA : test cellulaire Cellule Vero ; N, négative; P, positive; Ehly, hémolysine mise en évidence après une étape d'incubation de 22 heures.

Ces résultats montrent que des souches STEC ou *E. coli* O157 sont présentes dans les coquillages du littoral français. Leur présence dans les coquillages analysés au cours de cette étude a pu toutefois être sous-estimée du fait de la difficulté de retrouver des souches STEC, souvent en faibles concentrations au sein d'une flore annexe comprenant des *E. coli* non STEC en concentrations variables et souvent élevées.

La possible conversion de souches *E. coli* par les bactériophages porteurs de gènes *stx* dans l'environnement constitue une question importante qu'il reste à élucider (Schmidt, 2001 ; Dumke *et al.*, 2006). Récemment, de telles conversions ont été mises en évidence dans des biofilms, suggérant que l'environnement pourrait jouer un rôle dans l'émergence de nouvelles

souches STEC (Solheim *et al.*, 2013). Comme leur cellule hôte, les bactériophages porteurs de gènes *stx* sont présents dans l'environnement ; ils ont été mis en évidence dans des eaux usées de stations d'épuration, des effluents d'origine agricole (Muniesa and Jofre, 2000 ; Tanji *et al.*, 2003 ; Imamovic *et al.*, 2010) ou dans des eaux de rivière (Muniesa *et al.*, 1999). Ces phages survivent plus longtemps dans l'environnement (eaux douces) que leurs bactéries hôtes ; des études *in situ* (analyse de la survie de bactéries et de phages présents dans des boudins à dialyse immergés en rivière pendant 7 jours) ont ainsi montré une perte de 2 à 3 unités logarithmiques pour les bactéries contre seulement une perte de 1 à 2 unités logarithmiques pour les phages à l'état libre (Muniesa *et al.*, 1999). La présence et l'abondance des phages porteurs de gènes *stx* dans l'environnement extra-intestinal confirme leur rôle de réservoir des gènes *stx* dans l'environnement (Imamovic *et al.*, 2010).

L'optimisation de la détection des souches STEC chez l'Homme, dans les aliments ou dans l'environnement reste un sujet d'actualité. Si la recherche des *E. coli* O157 est généralement réalisée selon un protocole normalisé (Anon. 2001), la recherche des STEC non-O157 se fait selon des méthodes de détection très diverses en absence de procédures internationales standardisées. Les méthodes de détection de ces souches STEC, utilisées dans le milieu médical, alimentaire ou dans l'environnement sont présentées dans plusieurs publications (Paton and Paton, 1998 ; Gould *et al.*, 2009 ; Croxen *et al.*, 2013 ; Farrokh *et al.*, 2013). La recherche dans les aliments se fait, par exemple, selon des méthodes dépendantes ou indépendantes des sérogroupes hautement pathogènes (Farrokh *et al.*, 2013). En France, lors des plans de surveillance des STEC dans les aliments, la recherche des EHEC typiques majeurs est privilégiée avec la recherche d'isolats STEC à partir des bouillons d'enrichissements positifs pour trois paramètres : présence des gènes *stx1/stx2*, *eae* et d'un des sérotypes EHEC majeurs. La recherche se fait selon la méthode décrite par le LNR STEC VetAgro Sup de Lyon, basée sur la méthode ISO TS 13 136 et recommandée par l'EFSA (EFSA, 2009 ; ISO TS 13 136, 2012 ; Loukiadis *et al.*, 2012). Au Canada, par exemple, une autre approche a été retenue pour rechercher la prévalence des STEC dans différents environnements. Les souches STEC sont recherchées par immunoblotting sur des colonies isolées sur membrane HGMP (Hydrophobic Grid Membrane Filters) (Roger Jonhson, Université de Guelph et Tom Edge, Environment Canada, comm. pers.).

Ces différentes études montrent la présence d'*E. coli* en zone côtière et donc un risque pour la santé humaine lors des baignades ou de la consommation des coquillages. Afin de limiter la contamination en *E. coli* et autres bactéries entériques des eaux côtières et des coquillages, il est crucial de pouvoir identifier l'origine de ces bactéries afin de mettre en place des mesures préventives ou curatives et de diminuer les apports d'origine fécale en amont du littoral. Une approche pour identifier les sources de contamination fécale consiste à rechercher des cibles présentes spécifiquement chez l'homme ou les animaux (approche « Microbial Source Tracking » ; Traceurs de Sources Microbiennes, TSM (Glassmeyer *et al.*, 2005 ; U.S. EPA, 2005). Cette thématique de recherche que j'ai développée au laboratoire à partir de 2005 est présentée dans la deuxième partie de ce mémoire.

2 Identification des sources de contamination fécale – les marqueurs *Bacteroidales*

Afin d'identifier les sources de contamination fécale au niveau d'un site donné du littoral, il est indispensable dans un premier temps d'évaluer la contamination en *E. coli* des eaux côtières et/ou des coquillages de la zone concernée et des eaux de rivières des bassins versants. Toutefois, *E. coli*, recherché par méthode culturale, est présent chez tous les mammifères ou oiseaux (Dick and Field, 2004 ; Geldreich, 1978 ; Fogarty *et al.*, 2003 ; Cox *et al.*, 2005). Aussi, des méthodes alternatives, reposant sur la caractérisation des *E. coli* par des méthodes de ribotypage par exemple ou sur la recherche d'autres cibles présentant une spécificité d'hôte doivent être appliquées sur ces échantillons environnementaux.

2.1 Les sources de contamination fécale

Les sources de contaminations fécales sont multiples. Trois origines principales se distinguent : 1) urbaine avec principalement le rejet des eaux résiduaires, 2) agricole avec les épandages des lisiers et fumiers et le pâturage, et 3) dans une moindre mesure, environnementale par la faune sauvage : oiseaux de bord de mer, phoques, sangliers ou chamois ... (Dupray *et al.*, 1999 ; Jones and Obiro-Danso, 1999 ; Crowther *et al.*, 2002 ; Fogarty *et al.*, 2003 ; Cox *et al.*, 2005). Certaines sources font l'objet de rejets ponctuels tandis que d'autres sont plus diffus et donc plus difficiles à identifier.

Devant cette multitude de sources pouvant contaminer les zones littorales, il est crucial de disposer d'un ensemble de marqueurs prenant en compte, de façon spécifique, ces différentes sources, afin d'améliorer la qualité des eaux littorales. En Europe, la directive 2006/7/CE concernant la gestion de la qualité des eaux de baignades demande l'élaboration d'un profil de vulnérabilité pour chaque zone de baignade qui doit notamment recenser les sources de contaminations microbiologiques pouvant avoir un impact sur la zone de baignade.

2.2 L'approche TSM – les différentes cibles

2.2.1 Etat de l'art sur les marqueurs de l'origine de la contamination fécale

De nombreux efforts de recherche ont été ainsi réalisés ces dernières années afin de disposer d'outils permettant de distinguer les sources de contamination fécale humaine de celles de contaminations animales et de différencier les espèces animales entre elles (US EPA, 2005). Ces méthodes sont basées sur la recherche de cibles microbiennes ou chimiques présentes dans le tractus intestinal de l'homme ou de l'animal et dans les effluents d'origine fécale (Scott *et al.*, 2002).

Les principaux travaux au niveau international sur cette problématique « Identification de l'origine de la contamination fécale » concernent essentiellement l'approche microbiologique.

Les premiers articles sur ce sujet ont été publiés entre 1975 et 1991 (Faechem, 1975 ; Mara and Oragui, 1983 ; Gavini *et al.*, 1991 ; Pourcher *et al.*, 1991). L'une de ces méthodes, remise en question par la suite, était basée sur la recherche par culture de microorganismes tels que les coliformes thermotolérants (CTT) et les streptocoques fécaux (SF) et la détermination d'un ratio CTT/SF (Faechem, 1975).

Puis, sont apparues des méthodes basées sur la recherche par culture de bactéries telles qu'*E. coli* ou les entérocoques et leur caractérisation : résistance aux antibiotiques, utilisation de différentes sources de carbone ou géotypage (Wiggins, 1996 ; Parveen *et al.*, 1999 ; Dombek *et al.*, 2000 ; Harwood *et al.*, 2000 ; Santo Domingo and Edge, 2010 ; Garabetian *et al.*, 2013). Ces méthodes présentent toutefois plusieurs inconvénients : nécessité d'une collection de souches bactériennes (techniques longues et coûteuses en main d'œuvre), non spécificité, apparition de différences géographiques et de résultats faussement positifs au cours de certaines études (Hartel *et al.*, 2002 ; Stoeckel *et al.*, 2004). Les premières études de comparaison des méthodes d'identification des contaminations des sources ont porté essentiellement sur ces méthodes (Griffith *et al.*, 2003).

Avec le développement des techniques de biologie moléculaire, de nouvelles méthodes plus sensibles et spécifiques que les méthodes culturales sont apparues. Ces méthodes basées essentiellement sur la recherche de microorganismes cibles par amplification génique s'affranchissent de l'étape de culture (Bernhard and Field, 2000a,b ; Ufnar *et al.*, 2007). Les orientations les plus prometteuses reposent sur la recherche de bactéries anaérobies, majoritaires de la flore intestinale telles que les *Bacteroidales* ou les bifidobactéries. Plusieurs travaux ont ainsi été publiés sur une recherche de marqueurs associés à l'hôte de ces bactéries par PCR (Bernhard and Field, 2000b ; Dick *et al.*, 2005 ; Doray-Raja *et al.*, 2009) permettant d'obtenir une réponse qualitative : présence/absence.

L'apparition de la technique de PCR en temps réel permet maintenant d'obtenir des données quantitatives, importantes pour évaluer la contribution des différentes sources de contamination ; de nombreux travaux ont été ainsi publiés récemment sur des marqueurs bactériens humains ou animaux (Reischer *et al.*, 2006 et 2007 ; Shanks *et al.*, 2008 ; Lamendella *et al.*, 2008).

Une autre possibilité consiste à rechercher des virus humains ou animaux ou des bactériophages, virus de bactéries entériques, tels que les bactériophages F ARN spécifiques comprenant des génogroupes humains et des génogroupes animaux (Beekwilder *et al.*, 1996 ; Pina *et al.*, 1998 ; Blanch *et al.*, 2004 et 2006 ; Ogorzaly *et al.*, 2006 ; Wolf *et al.*, 2010). La spécificité des génogroupes humain I et animal III des bactériophages F ARN spécifiques a été remise en question dans certaines études où ils ont respectivement été retrouvés dans des effluents d'origine urbaine et dans des fèces d'origine porcine et aviaire (Cole *et al.*, 2003 ; Blanch *et al.*, 2006 ; Stewart-Pullaro *et al.*, 2006).

D'autres méthodes TSM reposent sur la détection d'ADN mitochondriaux des cellules eucaryotes. De nombreux marqueurs ont été développés (Martellini *et al.*, 2005 ; Cadwell *et al.*, 2007 ; Baker-Austin *et al.*, 2010). Ces méthodes présentent toutefois quelques limites : les faibles concentrations de ces marqueurs retrouvées dans l'environnement et le biais existant par l'excrétion de cellules animales par l'Homme lors de la consommation d'aliments d'origine animale (Caldwell *et al.*, 2007 ; Caldwell and Lavine, 2009).

Enfin, une autre approche consiste à rechercher des composés présents dans les déjections et/ou les effluents par analyse chimique. Il s'agit de composés constitutifs des déjections (stérols et stanols), de ceux ingérés et partiellement métabolisés (caféine, par exemple) et de ceux générés par les activités anthropiques qui se retrouvent dans les rejets (*i.e.* détergents, agents blanchissants, parfums, additifs alimentaires) (Glassmeyer *et al.*, 2005 ; Jardé *et al.*, 2007a et b). D'après l'étude réalisée par l'U.S.G.S. (United States

Geological Survey) et l'EPA (Environmental Protection Agency), 35 molécules sont susceptibles de servir de potentiels indicateurs (Glassmeyer *et al.*, 2005).

2.2.2 L'approche TSM au Laboratoire de Microbiologie de l'Ifremer

J'ai pris en charge la thématique « Traceurs de Sources Microbiennes » au Laboratoire de Microbiologie à partir de 2005. J'ai ainsi développé principalement l'approche basée sur la recherche des bactéries de l'ordre des *Bacteroidales* qui apparaissait une approche prometteuse du fait de la présence de ces bactéries en quantité importante dans les fèces de différentes origines et l'existence de bactéries associées à un hôte.

Mon activité a consisté principalement à rédiger des projets, encadrer une thèse sur le développement et la validation des marqueurs *Bacteroidales* associés à l'hôte (S. Mieszkin, 2007-2010), valoriser les résultats acquis au Laboratoire de Microbiologie à l'Ifremer par des publications et des présentations à des conférences internationales. Afin de présenter cette thématique aux gestionnaires des eaux et des collectivités, j'ai organisé un colloque sur cette thématique Traceurs de Sources Microbiennes en 2010 sur le centre de Brest de l'Ifremer¹.

En complément des marqueurs *Bacteroidales*, une autre approche TSM a été sélectionnée au laboratoire (resp. M.P. Caprais). Elle a été appliquée en parallèle sur les échantillons de fèces, effluents, eaux de l'environnement et coquillages analysés depuis cette date. Cette méthode est basée sur la recherche des génogroupes humains et animaux des bactériophages F ARN spécifiques (Tab. 5).

Ces méthodes ont été également comparées à d'autres marqueurs développés et/ou sélectionnés par nos partenaires scientifiques (Tab. 4). La comparaison des marqueurs TSM a porté sur leur sensibilité/spécificité, leur persistance dans les eaux de l'environnement et leur détection dans des eaux de bassins versants complexes. Le but était de sélectionner les plus performants. Ces marqueurs peuvent être utilisés en effet de façon indépendante ou combinée afin d'accroître leur pouvoir discriminant. L'utilisation combinée de ces traceurs de sources microbiennes est désignée sous le terme de « MST toolbox » ou de « boîte à outils » (Pourcher *et al.*, 2013*).

¹ http://wwz.ifremer.fr/tsm_2010

Tableau 4 : Marqueur développés au Laboratoire de Microbiologie à l’Ifremer et par nos partenaires scientifiques. Présentation des étapes de validation réalisées en commun.

Marqueurs	Noms des marqueurs	Domaine (cible)	Pollution mise en évidence	Méthodes	Développement des marqueurs	Etapes de validation des marqueurs TSM						Partenaires / Responsable
						Développement Efficacité en France ^a	Efficacité en Californie	Transfert dans les eaux ^b	Persistance dans les eaux	Eaux bassins versants	Coquillages	
Marqueurs <i>Bacteroidales</i> - associés à l’hôte	- HF183 - Hum1Bac - Rum2Bac - Pig2Bac	Microbiologie (bactérie anaérobie)	- Humaine - Ruminants - Porcine	PCR en temps réel	Obtention de séquences des gènes ciblés Clonage/séquencage	X 3, 5, 6, 10	X 17, 18, 20,21	X 11	X 12, 13, 15	X 3,7,10, 13,16	X 8, 9	Ifremer, Brest M. Gourmelon
- général	- AllBac		- Fécale		Layton <i>et al.</i> , 2006							
Marqueur <i>C. marimam-malium</i>	- Gull2	Microbiologie (bactérie aéro-anaérobie facultative)	- Goélands	PCR en temps réel	Marqueur développé par Lu <i>et al.</i> , 2008 (USA)	X 4	X 17, 22				X	Ifremer, Brest M. Gourmelon
Bacteriophages F ARN spécifiques Génogroupes humains et animaux	- G I-IV	Microbiologie (bactériophages)	- Humaine (GII – GIII) - Animale (GI - GIV)	Culture/ génotypage par RT-PCR ou RT-PCR directe	Marqueurs développés par Ogorzaly and Gantzer, 2006 ; Ogorzaly <i>et al.</i> , 2009 (France) Adaptation des protocoles aux coquillages	X 1, 2, 7, 10	X 17,19	X 11	X 13, 15	X 1, 7, 10, 16	X 9	Ifremer, Brest M.P. Caprais
Marqueur associé aux porcs <i>L. amylovorus</i>	- <i>L. amylovorus</i>	Microbiologie (bactérie anaérobie)	- Porcine	PCR en temps réel	Profils PCR SSCP ^c	X 10, 23, 25		X 11	X 12, 13	X 10, 16		Irstea, Rennes A.M. Pourcher
Marqueur associé à l’Homme <i>B. adolescentis</i>		Microbiologie (bactérie anaérobie)	- Humaine	PCR en temps réel	Profils PCR SSCP	X 10, 26			X 15	X 10		INRA, Narbonne N. Wéry

Molécules associées à l'Homme	Chimie ^d (caféine et molécules de synthèse)	- Humaine	Méthode de dosage multi-résidus et analyse GC/MS/MS	Sélection de molécules à partir de Glassmeyer <i>et al.</i> , 2005 (USA) Validation	X 10	X	X	X	X	LPB, Université d'Angers A. Jadas-Hécart
Marqueurs des déjections humaines et animales Stanols fécaux	Chimie ^e (stérols et stanols)	- Humaine - Porcine - Bovine	Extraction solide-liquide GC-MS de 10 stanols fécaux	Mise au point sur les déjections animales et des effluents de station d'épuration	X 10,14, 24	X	X	X	X	CNRS Géosciences, Rennes E. Jardé

^a Efficacité évaluée en terme de sensibilité et de spécificité ; ^b Expériences sur parcelles expérimentales ; ^c SSCP : Single Strand Conformation Polymorphism ; ^d molécules chimiques testées : caféine, benzophenone (parfum), tri(2-chloroéthyl)phosphate et tri(dichlorisopropyl)phosphate (retardateurs de flamme) , éthyl citrate, galoxide et tonalide ; ^e identification des pollutions par la sélection d'un rapport R1/R2 portant sur trois stanols (R1, coprostanol/24-étylcoprostanol+ coprostanol ; R2, sitostanol/coprostanol) puis à partir de 2011 par une analyse en composantes principales (ACP) reposant sur l'analyse de six stanols.

Pour plus de détails sur les marqueurs TSM testés au cours des études collaboratives, voir les publications ci-dessous :

Publications spécifiques au Laboratoire de Microbiologie à l'Ifremer (évaluation de la sensibilité/spécificité ; application sur des eaux de bassins versants et des coquillages ; marqueurs *Bacteroidales* et bactériophages F ARN spécifiques) : ¹Gourmelon *et al.*, 2007 ; ²Caprais *et al.*, 2009* ; ³Mieszkin *et al.*, 2009a,b* ; ⁴Caprais *et al.*, 2010* ; ⁵ Mieszkin, 2010 ; ⁶ Mieszkin *et al.*, 2010* ; ⁷Mauffret *et al.*, 2012* ; ⁸Mauffret *et al.*, 2013* ; ⁹Mieszkin *et al.*, 2013*.

Publications en commun avec nos partenaires (évaluation du transfert dans les eaux de ruissellement ; évaluation de la persistance en eaux de rivières et eaux marines ; application sur des bassins versants) : ¹⁰ Gourmelon *et al.*, 2010a * ; ¹¹Jaffrezic *et al.*, 2011* ; ¹²Marti, Mieszkin *et al.*, 2011* ; ¹³Soleski *et al.*, 2011* ; ¹⁴Derrien *et al.*, 2012* ; ¹⁵Jeanneau *et al.*, 2012* ; ¹⁶Pourcher *et al.*, 2013*

Publications résultant de l'évaluation internationale des marqueurs (SIPP) concernant les marqueurs utilisés au laboratoire à l'Ifremer : ¹⁷Boehm *et al.*, 2013 ; ¹⁸Ebentier *et al.*, 2013* ; ¹⁹Harwood *et al.*, 2013* ; ²⁰Layton *et al.*, 2013* ; ²¹Raith *et al.*, 2013* ; ²²Sinigalliano *et al.*, 2013*.

Publications concernant les développements des marqueurs réalisés par nos partenaires scientifiques : ²³Marti *et al.*, 2010 ; ²⁴Derrien *et al.*, 2011 ; ²⁵Marti *et al.*, 2011 ; ²⁶Wéry *et al.*, 2010.

La validation des TSM a été réalisée en plusieurs étapes : 1) évaluation de leurs sensibilité et spécificité au niveau des sources, fèces et effluents, 2) étude du transfert des marqueurs des effluents aux eaux de l'environnement, 3) évaluation de leur persistance dans l'environnement (eau douce ou eau marine) et 4) application de ces marqueurs à des eaux de l'environnement, au niveau de bassins versants ou de zones littorales et à des coquillages, au niveau des zones conchylicoles.

La première étape pour le développement et la validation de marqueurs de l'origine de la contamination a consisté à rechercher des cibles et les marqueurs associés au niveau de la source elle-même (fèces et effluents).

2.3 Le développement de marqueurs et leur validation au niveau des sources - Les marqueurs *Bacteroidales* et autres marqueurs

2.3.1 Les marqueurs Bacteroidales associés à l'Homme, aux ruminants et aux porcs

- Présentation des *Bacteroidales*

Les bactéries de l'ordre des *Bacteroidales* sont des bactéries anaérobies majoritaires du microbiote digestif de l'Homme, mais également de tous les animaux à sang chaud, excepté les oiseaux. Elles représentent de 20 à 35 % de la diversité bactérienne (Salyers, 1984 ; Hold *et al.*, 2002 ; Dick *et al.*, 2005). Dans les selles humaines, les *Bacteroidales* sont ainsi présents à des concentrations de 9 à 11 Log₁₀ UFC par g tandis que les *E. coli* ne sont retrouvés qu'à des concentrations de 6 à 8 Log₁₀ UFC par g de selles.

L'ordre des *Bacteroidales* est divisé en cinq familles comprenant au moins deux genres chacune : les *Bacteroidaceae*, les *Prevotellaceae*, les *Porphyromonadaceae*, les *Rikenellaceae* et les *Marinilabiliaceae* (Ludwing *et al.*, 2008). Les deux principaux genres des *Bacteroidaceae* et des *Prevotellaceae* sont *Bacteroides* et *Prevotella*. Ce sont des bacilles ou des coccobacilles, polymorphes à Gram négatif, non sporulés, anaérobies strictes et immobiles ou mobiles.

Les *Bacteroidales* peuvent être qualifiés de bactéries commensales de l'Homme.

- Détection des marqueurs *Bacteroidales* par PCR conventionnelle

Les premiers travaux qui ont porté sur la recherche de marqueurs *Bacteroidales* spécifiques d'un hôte (Homme et ruminants) ont été réalisés aux Etats-Unis par l'équipe de K. Field. Ils ont réalisé, dans un premier temps, une banque de séquences de gènes codant les ARNr 16S de *Bacteroidales* à partir de fèces humaines et de bovins. Puis, ils ont développé des marqueurs de PCR conventionnelle (pour l'Homme, HF183 et HF134 et pour les ruminants, CF128 et CF193) (Bernhard and Field, 2000 a,b).

Ces marqueurs ont été appliqués en Europe (en France, par notre laboratoire et en Grande-Bretagne, Irlande et Portugal par nos partenaires scientifiques du projet Interreg IIIb Icrew, 2003-2006¹). Le marqueur humain HF183 s'est avéré sensible et spécifique sur les échantillons fécaux testés tandis que le marqueur ruminant CF128 a manqué de spécificité.

¹ Travail réalisé dans le cadre du projet Interreg IIIb ICREW, Improving Coastal and REcreational Waters , « pilot action 3 ».

Une spécificité de 30 % seulement de ce marqueur a été obtenue lorsqu'il a été testé sur des fèces de porcs [$n=40$] (Tab. 6 ; Gawler *et al.*, 2007*).

Un marqueur porc PF163 a également été développé aux Etats-Unis (Dick *et al.*, 2005) et testé sur des échantillons fécaux en France (Tab. 5 ; Gourmelon *et al.*, 2007*).

Tableau 5 : Résultats obtenus avec les marqueurs *Bacteroidales* de PCR conventionnelle en France (Gourmelon *et al.*, 2007*).

Marqueurs	Cibles	Sensibilité (n)	Spécificité (n)
HF183	Humaine	98,2 % (55)	95 % (102)
HF134	Humaine	87,3 % (55)	99 % (102)
CF128	Ruminant	100 % (44)	71 % (113)
CF193	Ruminant	95,5 % (100)	100 % (113)
PF163	Porc	100 % (35)	98,4 % (122)

Toutefois, ces méthodes étant encore perfectibles en termes de sensibilité et de capacité à définir la contribution des différentes sources de pollution au sein d'un même échantillon, des développements analytiques ont été entrepris au Laboratoire de Microbiologie, à l'Ifremer après ce projet Icrew, pour rechercher les marqueurs *Bacteroidales* par PCR en temps réel.

- Les séquences *Bacteroidales*

Pour définir de nouveaux marqueurs *Bacteroidales*, applicables en France et plus généralement en Europe, une banque de séquences de gènes codant les ARNr 16S de *Bacteroidales* a été, tout d'abord, constituée à partir de fèces d'origine humaine, bovine, porcine et aviaire et de lisiers de porcs, fumiers de bovins et effluents de station d'épuration ($n=70$ échantillons). Ces échantillons ont été collectés principalement en 2007-2008. Un total de 477 séquences d'une longueur d'environ 690 paires de bases correspondant à 185 OTU (Operational Taxonomic Unit ; EU797125-EU797175 et EU913511-EU913643) a été obtenu (Tab. 6; Mieszkin *et al.*, 2010*).

Tableau 6 : Distribution et caractérisation des séquences de gènes codant les ARNr 16S de *Bacteroidales* d'échantillons de fèces et d'effluents.

Origine	Séquences obtenues	OTU ^a	<i>Bacteroides</i> / <i>Prevotella</i>	
Fèces	Homme	73	16	94 % / 6 %
	Bovin	75	37	89 % / 11 %
	Porcin	63	27	15 % / 85 %
	Oiseau	61	15	87 % / 13 %
Effluents	Eau de STEP	68	30	67 % / 33 %
	Fumier de bovins	79	36	92 % / 8 %
	Lisiers de porcs	58	24	45 % / 55 %
Total	477	185		

^aOTU : Operational Taxonomic Unit, séquences avec 98 % de similarité

L'analyse phylogénétique de ces séquences a montré que :

- 1) ces séquences correspondaient majoritairement à celles de bactéries du genre *Bacteroides* dans les échantillons d'origine humaine, bovine et aviaire et à des bactéries du genre *Prevotella* dans les échantillons d'origine porcine, et
- 2) des groupes de séquences associés à un hôte étaient présents dans les fèces et les effluents issus du même hôte (Mieszkin *et al.*, 2009a- 2010*).

- Développements et sélection de marqueurs Bacteroidales de PCR en temps réel et validation sur fèces et effluents

A partir de ces séquences, des amorces et sondes de PCR en temps réel ont été ensuite dessinées¹. Ces essais ont permis, entre autres, d'obtenir un marqueur associé aux contaminations d'origine porcine (Pig2Bac) et un marqueur associé aux contaminations par les ruminants (bovins et ovins ; Rum2Bac ; Mieszkin *et al.*, 2009a-2010*). Un marqueur humain a également été obtenu (Hum1Bac ; Mieszkin *et al.*, 2009b *) mais comme il ne présentait pas une meilleure efficacité que le marqueur HF183 utilisé dans de nombreuses études au niveau international, nous avons préféré retenir le marqueur HF183 pour les essais de PCR en temps réel (chimie SYBR Green).

Ces marqueurs ont été validés en France sur des échantillons de fèces et des effluents (Mieszkin *et al.*, 2009a- 2010*). Les marqueurs ont présenté de bonnes sensibilités et spécificités sur des échantillons fécaux (> 90 %), à l'exception du marqueur HF183 qui a présenté une plus faible sensibilité (78 % ; Tab. 7). Il était absent dans certaines selles humaines.

Parallèlement aux marqueurs *Bacteroidales* de PCR en temps réel associés à un hôte, des marqueurs de PCR en temps réel ciblant l'ensemble des bactéries de l'ordre des *Bacteroidales* ont été développés (GenBac, AllBac et BacUni-UCD ; Dick *et al.*, 2004 ; Layton *et al.*, 2006 ; Kildare *et al.*, 2007). Nous avons utilisé au laboratoire le marqueur *Bacteroidales* général AllBac développé par Layton *et al.* (2006).

Le marqueur *Bacteroidales* général AllBac a été retrouvé à des concentrations similaires dans les fèces humaines, bovines et porcines (étendue des concentrations, 8,1 – 11 Log₁₀ copies par g de fèces, moyenne de 9,8 à 10,1 Log copies par g). Les marqueurs associés à une contamination humaine HF183, bovine Rum2Bac et porcine Pig2Bac ont été retrouvés à des concentrations inférieures d'1 à 2 Log₁₀ à celles du marqueur général AllBac dans les fèces. Les marqueurs associés à chacun de ces trois hôtes ont été retrouvés à des concentrations similaires dans les fèces cibles correspondantes :

- concentrations en marqueur HF183 dans les selles humaines : étendue des concentrations , 6,6 – 9,3 Log copies par g de fèces, moyenne de 8,3 Log copies par g,
- concentrations en marqueur Rum2Bac dans les fèces bovines : étendue des concentrations , 6,9 – 9 Log copies par g de fèces, moyenne de 8,4 Log copies par g,
- concentrations en marqueur Pig2Bac dans les fèces porcines : étendue des concentrations , 6,8 – 9,5 Log copies par g de fèces, moyenne de 8,5 Log copies par g (Mieszkin, 2010).

¹ projet AFSSET Traces 2007-2010 ; Mieszkin, 2010 – thèse de doctorat

Tableau 7 : Sensibilité et spécificité des marqueurs *Bacteroidales* associés à l'hôte (HF183, Hum1Bac, Pig2Bac et Rum2Bac) et du marqueur *C. marimammalium* (Gull 2) sur des fèces et des effluents en France.

<i>Echantillons fécaux</i>	Pollution mise en évidence	Sensibilité (n)	Spécificité (n)
HF183	Humaine	78 % (41)	99 % (98)
Pig2Bac	Porcine	100 % (48)	99 % (81)
Rum2Bac	Ruminants	98 % (40)	94 % (97)
Hum1Bac	Humaine	92 % (39)	93 % (98)
Gull 2	Goélands	92,9 % (29)	100 % (70)

2.3.2 – Les marqueurs bactériens oiseau

Si l'approche *Bacteroidales* s'est avérée pertinente pour identifier l'origine des contaminations humaines, porcines et par les ruminants, le faible pourcentage des séquences de gènes codant les ARNr 16S correspondant à des *Bacteroidales* dans les fientes des oiseaux de bord de mer (env. 1 % ; Lu *et al.*, 2008) complique le développement d'un marqueur *Bacteroidales* associé à cet hôte aviaire¹.

L'analyse des séquences des gènes codant les ARN ribosomiques 16S de *Bacteroidales*, obtenues au Laboratoire de Microbiologie, à l'Ifremer, à partir des fientes d'oiseaux de bord de mer a permis toutefois de mettre en évidence un groupe de séquences spécifiques d'une origine aviaire (Mieszkin *et al.*, 2010*). Des amorces de PCR en temps réel ciblant ces séquences ont donc été dessinées et testées sur des extraits d'ADN de fientes d'oiseaux. Ces amorces n'ont pas permis cependant d'obtenir des résultats suffisamment sensibles sur les fientes d'oiseaux testées.

La piste *Desulfovibrio* développée en Nouvelle Zélande (Devane *et al.*, 2007) a été ensuite investiguée. Cette bactérie a été retrouvée dans les fientes d'oiseaux domestiques (canards et oies) testées au laboratoire. Toutefois, cette approche ne s'est pas avérée concluante en France du fait de réactions croisées avec des fèces de porcs (15 sur 20 positives) et de son absence dans les fientes des oiseaux de bord de mer (mouettes ou goélands ; n=10) analysées.

Nous nous sommes finalement intéressés à un autre type de marqueur, basé, quant à lui, sur la bactérie *Catellibacillus marimammalium*, le marqueur Gull2 développé aux Etats-Unis (Lu *et al.*, 2008). Lors de l'analyse de la diversité bactérienne dans des fèces de goélands, J Santo Domingo et collaborateurs ont mis en évidence que les séquences des gènes codant l'ARNr 16S présentes dans les fientes de goélands et de mouettes appartenaient majoritairement au groupe des *Bacilli* (37 % des séquences ; Fig. 3) et plus précisément à *C. marimammalium*. Cette bactérie n'a été isolée (à partir des phoques échoués) et décrite que récemment (Lawson *et al.*, 2006). Il s'agit d'un coque à Gram positif, non sporulé, en paire ou en chaîne, anaérobie facultative qui ne se développe pas sur des milieux liquides conventionnels mais sur des milieux avec 10 % de bile (Lawson *et al.*, 2006). Ce marqueur a montré une bonne sensibilité et spécificité sur des fientes d'oiseaux aux Etats-Unis (Lu *et al.*, 2008 – 2011b).

¹ Travail réalisé dans le cadre du projet Gerrico du programme Qualipro (2006-2009) - Gestion globale des ressources marines et des risques dans les espaces côtiers.

Gul n=282

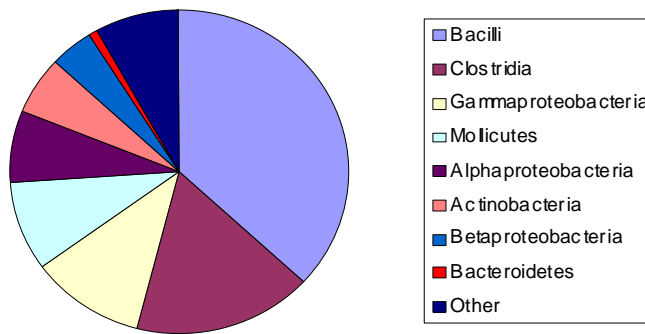


Figure 3 : Distribution des gènes codant les ARNr 16S de bactéries dans des fientes de goélands aux Etats-Unis et au Canada (Lu *et al.*, 2008). Le genre *Catelicoccus* représente 70 % des séquences des *Bacilli*.

Le marqueur Gull2 s'est également avéré sensible et spécifique sur des fientes d'oiseaux de mer (mouettes, goélands, cormorans ou sternes ; $n=29$) en France (sensibilité de 92,9 %, $n=29$ et spécificité sur des échantillons fécaux de 100 %, $n=70$; marqueur absent dans les selles humaines, fèces de porc, de bovin et de cheval et dans les effluents de station d'épuration, les lisiers de porcs et les fumiers de bovins testés). Il a été détecté également dans des coquillages du littoral français récoltés sur des sites où se trouvaient à proximité des colonies d'oiseaux de bord de mer (Caprais *et al.*, 2010* ; Gourmelon *et al.*, 2010d*).

La comparaison des concentrations du marqueur Gull-2 et du marqueur *Bacteroidales* général (Allbac) dans les fientes d'oiseaux confirme la présence plus élevée des bactéries appartenant à l'espèce *C. marimammalium* dans les fientes d'oiseaux de bord de mer que celles de l'ordre des *Bacteroidales*, contrairement à ce qui a été observé pour les oiseaux domestiques (Tab. 8).

Tableau 8 : Détection et quantification des marqueurs *Bacteroidales* général (AllBac) et *C. marimammalium* (Gull 2) dans les fèces d'origines aviaire, animale et humaine en France.

Origine des échantillons	Noms scientifiques	Type d'échantillons ^a	Nbre d'échantillons ^b (n)	AllBac			Gull-2			
				Nb échantillons positifs	Médiane	Variation des concentrations	Nb échantillons positifs	Médiane	Variation des concentrations	
Oiseaux de bord de mer	Goélands	<i>Larus argentus</i>	Ind	15	12	5,7	< 4 – 6,8	14	7,5	4,3 - 9
	Mouettes	<i>Larus ridibundus</i>	Pool	5 (5-11)	5	4,9	4,5 – 5,2	5	7,7	6,7 – 8,8
	Goélands	<i>Larus</i>								
	Mouettes	<i>Larus ridibundus</i>	Pool	1 (3)	1	7,5		1	6,9	
	Mouettes	<i>Larus melanocephalus</i>	Pool	1 (4)	0			1	7,5	
	Cormorans - goélands	<i>Phalacrocorax - Larus</i>	Pool	4 (5)	3	5,5	<5 – 5,8	4	8,9	7 - 9
Sternes	<i>Sterna hirundo</i>	Pool	3 (2-12)	3	4,9	4,8 – 5,7	2	5,2	< 4 – 8,6	
Oiseaux domestiques	Canard	<i>Anas platyrhunchos</i>	Ind	3	3	8,4	6,7 – 8,8	1	< 4	< 4 - 5
	Canard	<i>Anas platyrhunchos</i>	Pool	1 (4)	1	10,2		0	< 5	
	Dinde	<i>Meleagris gallopavo</i>	Ind	2	2	8,2	7,9 – 8,6	1	4	< 4 - 5
Non aviaires	Homme	<i>Homo sapiens</i>	Ind	10	10	10,3	9,3 – 11	0	< 4	
	Bovin	<i>Bos taurus</i>	Ind	10	10	9,8	9,4 – 10,2	0	< 4	
	Porc	<i>Sus serofa domestica</i>	Ind	10	10	10,1	8,4 – 11	0	< 4	
	Cheval	<i>Equus caballus</i>	Ind	10	10	8,7	8,5 – 9,7	0	< 4	

a Ind, fiente individuelle; Pool, échantillon composé de 2 à 12 fientes individuelles provenant du même site.

b, Le nombre entre parenthèses correspond au nombre de fèces individuelles par échantillon analysé.

2.3.3 – Comparaison de marqueurs de sources microbiennes au niveau international

Nous avons eu l'opportunité en 2011, de participer à une étude d'évaluation en aveugle de traceurs de sources microbiennes organisée par des laboratoires de recherche aux Etats-Unis (évaluation SIPP [State of California Source Identification Pilot Project] (Boehm *et al.*, 2013).

La participation à cette étude présentait l'intérêt de tester les marqueurs développés et sélectionnés au Laboratoire de Microbiologie à l'Ifremer sur des échantillons provenant d'une autre région géographique (la Californie) et de comparer leur efficacité à identifier la source de contamination fécale à celles des principaux autres marqueurs utilisés au niveau international.

- Présentation de l'étude

Au cours de cette étude, 64 échantillons d'eaux contaminées par 12 sources de contamination différentes ont été analysés par un total de 41 méthodes et 27 laboratoires (Boehm *et al.*, 2013). Plus de 90 % des méthodes portaient sur des marqueurs bactériens par PCR alors que les méthodes utilisées pour identifier l'origine des contaminations fécales, lors d'une précédente étude d'évaluation des méthodes TSM en aveugle qui avait impliqué 22 laboratoires, avait été réalisée avec des méthodes TSM qui dépendaient pour la moitié d'entre elles de la culture (Griffith *et al.*, 2003). Les autres méthodes TSM testées dans l'évaluation SIPP étaient basées principalement sur la recherche de virus et de bactériophages ou sur l'étude des communautés bactériennes (Boehm *et al.*, 2013).

Des membranes résultant de la filtration des eaux contaminées par les différentes sources ont été congelées et expédiées aux participants utilisant des méthodes basées sur la recherche des marqueurs par PCR. Des échantillons de 50 ml d'eau ont été expédiés aux laboratoires recherchant des bactériophages par méthode culturale.

Les marqueurs *Bacteroidales* de PCR en temps réel HF183, Pig2Bac et Rum2Bac et le marqueur *C. marimammalium* Gull2 ont été appliqués sur la série de filtres reçus au Laboratoire de Microbiologie à l'Ifremer. Les ADN ont été extraits par le kit DNA easy kit de Qiagen selon le protocole décrit dans Mauffret *et al.** (2012). Les génogroupes I-IV des bactériophages F ARN spécifiques ont été recherchés par culture et génotypage par RT-PCR selon le protocole d'Ogorzaly *et al.* (2009) et Mauffret *et al.** (2012).

L'efficacité des différentes méthodes TSM a été comparée. Pour être considérée performante, une méthode devait satisfaire aux critères de 80 % de sensibilité et de 80 % de spécificité (Boehm *et al.*, 2013). Les résultats obtenus ont été analysés en considérant les données détectées et non quantifiées (DNQ) comme étant des données positives ou négatives et en normalisant les concentrations obtenues en nombre de copies par UFC d'entérocoques ou mg d'ADN total, par exemple.

La présentation des résultats, leur interprétation et leur valorisation ont fait l'objet d'un séminaire en décembre 2011 en Californie, séminaire auquel la majorité des participants étaient présents. Les résultats acquis à l'issue de cette étude ont conduit à la rédaction de 12 articles (regroupés dans un numéro spécial du journal Water Research, novembre 2013). J'ai

participé à la rédaction et aux discussions de cinq de ces articles qui se sont focalisés sur les marqueurs humains, les marqueurs ruminants, les marqueurs goélands, les marqueurs viraux et l'évaluation de la reproductibilité et de la répétabilité des marqueurs bactériens par PCR en temps réel (Ebentier *et al.*, 2013 ; Harwood *et al.*, 2013 ; Layton *et al.*, 2013 ; Raith *et al.*, 2013 ; Sinigalliano *et al.*, 2013).

- Les résultats obtenus au cours de cette étude

Les marqueurs les plus performants se sont avérés être des marqueurs bactériens par PCR en temps réel et plus précisément les marqueurs HF183 TaqMan, BacH, Rum2Bac, BacR, LeeSeaGull et Pig2Bac (Tab. 9 ; Boehm *et al.*, 2013).

Tableau 9 : Performance des marqueurs de PCR en temps réel normalisés en UFC d'entérocoques . Les essais avec une valeur médiane supérieure à 50 copies/CFU sont considérés sensibles (Boehm *et al.*, 2013). N correspond au nombre de laboratoires ayant utilisés ce marqueur. Les marqueurs en gras sont ceux utilisés au Laboratoire de Microbiologie à l'Ifremer. Les marqueurs soulignés sont ceux qui se sont avérés sensibles et spécifiques.

Essais	Hôte	N	% des éch. non cibles positifs	Conc. médianes dans les éch. cibles (copies/UFC)	Spécificité	Sensibilité	Sensibilité et spécificité
<u>BacH</u>	Humain	1	0	87	O	O	O
BacHum	Humain	7	11	331	N	O	N
BsteriF1	Humain	4	10	123	N	O	N
Btheta	Humain	1	0	11	O	N	N
gyrB	Humain	1	0	0,003	O	N	N
HF183 SYBR	Humain	4	7	52	N	O	N
<u>HF183</u>	Humain	5	0	138	O	O	O
<u>TaqMan</u>	Humain	6	0	7	O	N	N
HumM2	Humain	5	19	33	N	N	N
nifH	Humain	5	7	13	N	O	N
BacCow	Bovin	5	0	15	O	N	N
CowM2	Bovin	5	0	1	O	N	N
CowM3	Ruminant	2	0	955	O	O	O
<u>BacR</u>	Ruminant	1	0	832	O	O	O
<u>Rum2Bac</u>	Goéland	4	10	0,4	N	N	N
Gull2 SYBR	Goéland	6	10	7	N	N	N
Gull2 TaqMan	Goeland	1	0	55	O	O	O
<u>LeeSeaGull</u>	Chien	5	15	145	N	O	N
DogBact	Chien	1	6	5495	N	O	N
BacCan	Porc	5	0	107	O	O	O
<u>Pig2Bac</u>							

O : marqueur satisfaisant aux critères de 80 % de sensibilité et/ou de spécificité. N : marqueur ne satisfaisant pas à ces critères.

Les marqueurs Pig2Bac, Rum2Bac et HF183 recherchés au laboratoire selon le protocole utilisé habituellement sur les eaux environnementales ont montré de bonnes

sensibilités et spécificités sur ces échantillons, suggérant une bonne stabilité géographique de ces marqueurs (Tab. 10).

Tableau 10 : Performance des marqueurs de PCR en temps réel exprimés en copies par filtre selon les résultats obtenus au Laboratoire de Microbiologie à l’Ifremer au cours de l’évaluation SIPP.

Marqueurs	Sensibilité (n)	Spécificité (n)
HF183	97% (38)	96% (26)
Pig-2-Bac	100% (8)	100% (56)
Rum-2-Bac	100% (10)	96% (57)
Gull 2	58 % (12)	96 % (52)

Les marqueurs humains

Un nombre important de marqueurs associés à une contamination humaine ont été testés. Ils étaient basés sur la recherche de bactéries, de virus ou de bactériophages ($n=19$). Pour 10 marqueurs humains de PCR en temps réel basés sur la recherche de bactéries de l’ordre des *Bacteroidales* et d’archaeobactéries, *Methanobrevibacter smithii*, une analyse plus approfondie des résultats a été réalisée (Layton *et al.*, 2013*).

L’efficacité des marqueurs s’est avérée être dépendante de plusieurs facteurs : 1) de la classification des échantillons présentant des valeurs DNQ comme positif ou négatif, 2) du choix de l’unité de mesure pour évaluer la contamination fécale de l’échantillon (teneur en *E. coli* ou entérocoques, bactéries cultivables ou totales, masse humide, teneur en ADN total, teneur en *Bacteroidales* total ...) et 3) des sources de contaminations humaines (fèces, eaux usées de station d’épuration et de fosses septiques).

Aucun de ces 10 marqueurs humains ne satisfaisait aux critères de 80 % d’efficacité définis par Boehm *et al.* (2013), à la fois, pour la sensibilité et la spécificité, lorsque les échantillons avec des DNQ étaient considérés positifs tandis que trois marqueurs BtH, HF183 SYBR et HF183 TaqMan satisfaisaient à ces critères lorsque les échantillons avec des DNQ étaient considérés négatifs.

Les résultats obtenus pour ces 10 marqueurs associés à une contamination humaine en exprimant les concentrations en nombre de copies par ng d’ADN total extrait sont présentés sur la figure 4. Le marqueur *Bacteroidales* humain HF183, recherché en chimie SYBR Green, testé au niveau de quatre laboratoires, s’est avéré sensible et spécifique dans seulement deux laboratoires dont le notre et non spécifique dans les deux autres laboratoires.

Le marqueur HF183 TaqMan s’est avéré être le marqueur humain le plus sensible et spécifique sur ces échantillons fécaux collectés en Californie (Fig. 4).

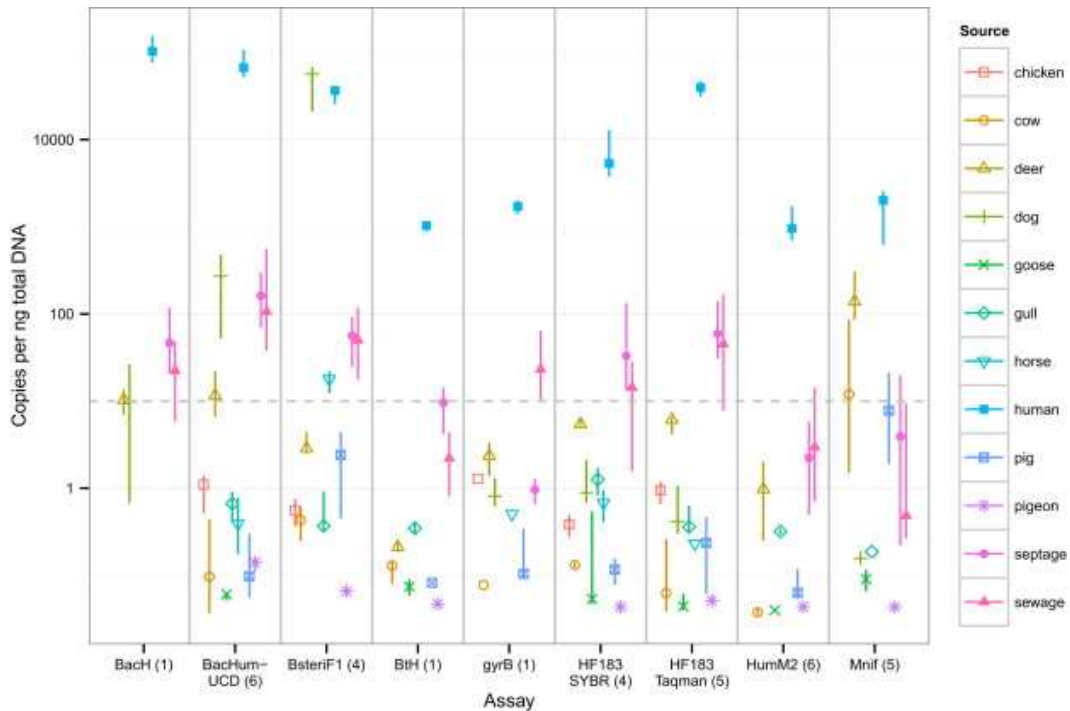


Figure 4 : Résultats d’une sélection de marqueurs humains exprimés en copie par nanogramme d’ADN total. Chaque point correspond à la valeur médiane pour une source donnée et les barres représentent les écarts interquartiles (des 25^{ème} au 75^{ème} percentiles). Les sources fécales sont indiqués par des couleurs et formes différentes. Les symboles pleins correspondent aux sources cibles (selles humaines, eaux usées de station d’épuration et eaux de fosses septiques). La ligne en pointillés indique 10 copies par nanogramme, limite retenue pour évaluer la sensibilité. Les nombres entre parenthèses (axe des x) indiquent le nombre de laboratoires ayant réalisés l’essai (Layton *et al.*, 2013*).

Les marqueurs ruminants et bovins

Sept marqueurs *Bacteroidales* de PCR associés à une contamination bovine ($n=2$) et associés à une contamination par les ruminants ($n=5$) ont également été testés sur ces échantillons (Raith *et al.*, 2013*). Les marqueurs de PCR en temps réel, associés aux bovins Cow M2 et aux ruminants, Rum2Bac et BacR, se sont avérés être les plus appropriés pour mettre en évidence une contamination par les bovins et par les ruminants en Californie, selon les résultats obtenus au cours de cette étude. Il est important toutefois de retenir que des concentrations en marqueur CowM2 inférieures à celles obtenues par les marqueurs ruminants (de 1 à 2 Log_{10} copies / mg de masse humide) ont été observées sur ces échantillons. Ces résultats, en accord avec des résultats obtenus au Canada (Tambalo *et al.*, 2012), suggèrent que ce marqueur CowM2 peut s’avérer ne pas être assez sensible lors d’une application dans l’environnement.

Les marqueurs goélands

Quatre marqueurs de PCR goélands, tous basés sur la bactérie *Catelliboccus marimammalium*, ont été comparés par 11 laboratoires. La classification des échantillons avec des DNQ en positif ou négatif et l’unité de mesure retenue pour évaluer la contamination

fécale de l'échantillon jouent un rôle important sur les résultats. Les résultats des différents marqueurs ont été analysés et comparés au final en considérant les échantillons avec des DNQ comme des vrais négatifs et en normalisant les résultats en copies de gène par rapport à la concentration en ADN total extrait (Sinigalliano *et al.*, 2013*).

On peut aussi noter que tous les marqueurs goélands testés ont conduit à des résultats positifs avec les échantillons de fientes de pigeons, suggérant que ces marqueurs étaient plutôt des marqueurs oiseaux que spécifiquement goélands en Californie (Sinigalliano *et al.*, 2013*).

Les meilleurs résultats de sensibilité et de spécificité ont été obtenus avec le marqueur LeeSeaGull développé par le laboratoire de J. Lee (Boehm *et al.*, 2013). Toutefois, le fait que ce laboratoire était le seul à l'utiliser a conduit à tester ce marqueur par deux autres laboratoires, ce qui a conduit à diminuer la spécificité de ce marqueur (Sinigalliano *et al.*, 2013*).

Enfin, la comparaison des concentrations obtenues par les marqueurs Gull2 SYBR a montré que les concentrations obtenues au Laboratoire de Microbiologie de l'Ifremer étaient 10 à 100 fois plus faibles que celles obtenues par les autres laboratoires utilisant ce marqueur. Les résultats obtenus en normalisation les concentrations en nombre de copies à la quantité d'ADN pour le marqueur Gull2 SYBR sont présentés sur la figure 5 (résultats de l'Ifremer, laboratoire 1). Les plus faibles concentrations que nous avons obtenues s'expliquent, au moins en partie, par le protocole d'extraction des ADN que nous avons appliqués sur les filtres. Il était basé sur l'utilisation du kit DNA Easy de Qiagen qui s'est avéré être peu performant pour des bactéries à Gram positif telles que *C. marimammalium*. Le protocole d'extraction des ADN a été depuis modifié et le kit Qiagen DNAeasy a été remplacé par le kit Fast DNA for Soil (MP Biomedical).

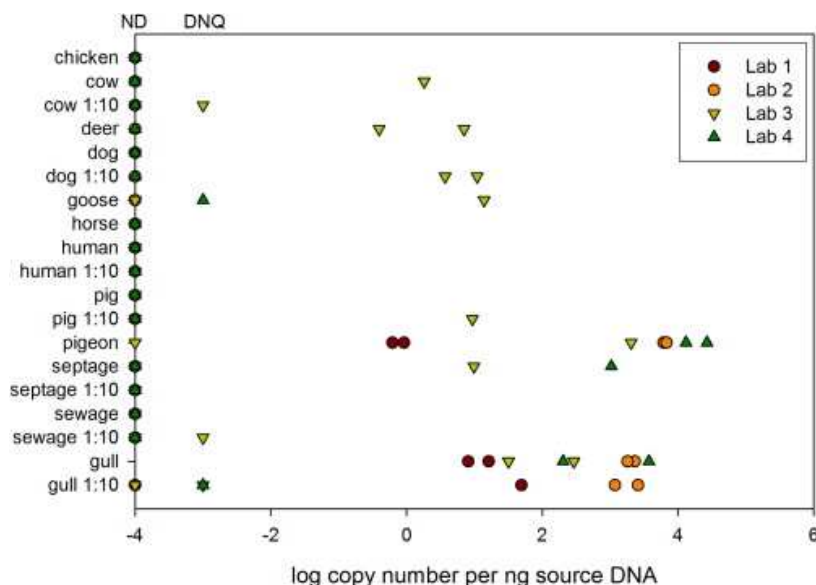


Figure 5 : Présentation des résultats obtenus par le marqueur Gull2 (chimie SYBR Green) exprimés en copies par nanogramme d'ADN extrait. Le laboratoire de l'Ifremer correspond au laboratoire 1 (Sinigalliano *et al.*, 2013*).

Les méthodes basées sur les virus et bactériophages

Différents virus - adénovirus, entérovirus, norovirus I et II, polyomavirus - et différents bactériophages - F ARN spécifiques, phages de *Bacteroides* ou d'*Enterococcus faecium* - ont été appliqués sur ces échantillons (Boehm *et al.*, 2013 ; Harwood *et al.*, 2013*). Toutefois, le faible volume d'eau analysé (50 ml) a conduit à une faible détection voire une absence de détection des virus ou des bactériophages dans une partie des échantillons. Le génogroupe II des bactériophages F ARN spécifiques recherché au Laboratoire de Microbiologie de l'Ifremer sur l'ensemble des 64 échantillons a montré une sensibilité de 18 % et une spécificité de 85 %.

- Points de discussions soulevés lors de l'exploitation des résultats

Ces points de discussions ont porté essentiellement sur les résultats obtenus avec les marqueurs bactériens de PCR en temps réel.

Evaluation de la répétabilité et de la reproductibilité

Un certain nombre de méthodes ont été appliquées par plusieurs laboratoires ; il a donc été possible pour ces méthodes d'évaluer leur répétabilité et leur reproductibilité (Ebentier *et al.*, 2013*). Ainsi, cinq laboratoires « core labs » (Etat-Unis ; laboratoires 1 à 5 ; Ebentier *et al.*, 2013) ont appliqué, avec les mêmes protocoles et dans les mêmes conditions, une sélection de 10 marqueurs *Bacteroidales* associés à l'hôte, dont le marqueur Pig2Bac, développé au Laboratoire de Microbiologie de l'Ifremer (Mieszkin *et al.*, 2009a*) sur les 64 échantillons d'eaux. Cinq laboratoires supplémentaires (laboratoires 6 à 10 ; Ebentier *et al.*, 2013) ont appliqué l'une ou plusieurs de ces méthodes sur les mêmes échantillons selon leur propre protocole.

Lors de l'utilisation de méthodologies standardisées (résultats obtenus par les laboratoires 1 à 5 ; Fig. 6), les coefficients de variation (CV%) intra-laboratoire et inter-laboratoires sont généralement faibles (CV% médian respectivement de 0,1 à 3,3 % et de 1,9 à 7,1 %). Les coefficients de variations inter-laboratoires augmentent lorsque les résultats obtenus par les laboratoires utilisant leurs propres protocoles (laboratoires 6 à 10) sont également considérés (résultats disponibles pour six méthodes ; CV% médian de 3,4 à 17,6 %). Ainsi, par exemple, le CV% du marqueur Pig2Bac a été augmenté d'environ 4 % en prenant en compte les résultats que nous avons obtenus au Laboratoire de Microbiologie à l'Ifremer. Nous avons obtenu, en effet, des concentrations du marqueur Pig2Bac plus faibles en utilisant un protocole d'extraction des ADN bactériens et des réactifs de PCR différents de ceux utilisés par les laboratoires 1 à 5 (Fig. 6B).

De façon générale, les plus fortes valeurs de CV% ont été obtenues pour les échantillons dilués et pour les méthodes qui conduisaient aux plus faibles concentrations (Ebentier *et al.*, 2013*).

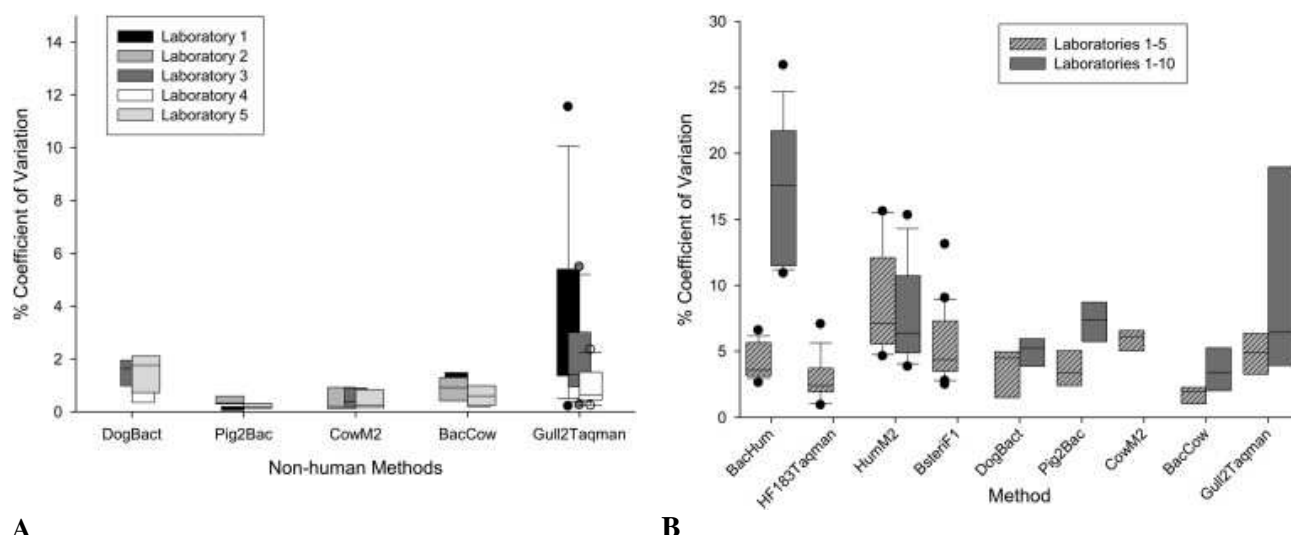


Figure 6 : Coefficients de variation intra-laboratoire (% CV) pour des méthodes associées à des contaminations animales (A) et coefficients de variation inter-laboratoires pour une sélection de marqueurs associés à des contaminations humaines ou animales (B). Les laboratoires de 1 à 5 correspondent aux « cores labs » qui utilisent les mêmes protocoles et réactifs et les laboratoires de 6 à 10 correspondent aux laboratoires utilisant les mêmes marqueurs mais selon leur propre protocole (Ebentier *et al.*, 2013*). Ifremer, laboratoire 6, application du marqueur Pig2Bac.

L'expression des résultats DNQ

L'influence de la classification des échantillons comme positif ou négatif lors de l'obtention de valeurs DNQ a été étudiée pour les marqueurs associés à une contamination par l'Homme (Layton *et al.*, 2013*), par les ruminants (Raith *et al.*, 2013*) et ceux associés à une contamination par les goélands (Sinigalliano *et al.*, 2013*). La prise en compte des valeurs DNQ comme valeurs positives a conduit généralement à de meilleures sensibilités et de plus faibles spécificités des marqueurs. Au Laboratoire de Microbiologie à l'Ifremer, nous considérons les échantillons avec des valeurs DNQ comme négatifs (Mauffret *et al.*, 2012*). Il n'y a pas de vrai consensus, dans la communauté scientifique, sur le choix de classer les DNQ comme des résultats positifs ou négatifs (Stewart *et al.*, 2013). Dans l'environnement, les DNQ peuvent provenir d'une dilution ou d'une dégradation d'une source fécale humaine ou animale ou d'une réaction croisée.

Normalisation des résultats en fonction de la quantité de matière fécale

La quantité de matière fécale présente sur le filtre analysé peut être décrite en utilisant plusieurs unités de mesures : mesures physiques – masse fécale humide, ADN total extrait - ; mesures par des méthodes de culture – *E. coli* ou entérocoques par filtration sur membrane ou NPP, mesures par des méthodes de PCR en temps réel – *Bacteroidales*, *E. coli* ou entérocoques (Erwin *et al.*, 2013). Les concentrations obtenues pour ces différents paramètres dans les 12 sources fécales composites, montrent de très grandes variations selon les sources et les méthodes utilisées (jusqu'à neuf ordres de grandeur).

Ces variations dépendantes de l'hôte conduisent à des performances des marqueurs variables selon que les concentrations en marqueurs sont exprimées par mg de masse humide,

ng d'ADN total extrait, UFC d'entérocoques ou copies de gènes codant pour l'ARN 16S de *Bacteroidales* (Boehm *et al.*, 2013 ; Raith *et al.*, 2013* ; Sinigalliano *et al.*, 2013*). Le choix de l'unité de mesure pour normaliser les résultats des marqueurs a conduit à de nombreuses discussions et des avis très partagés selon les participants. Au final, il n'existe pas de critère optimal pour toutes les applications ; il est donc recommandé d'adapter le choix selon le site étudié et les contaminations potentiellement présentes (Raith *et al.*, 2013*).

Comparaison des marqueurs ARN 16S ou gènes fonctionnels

De façon générale, les marqueurs bactériens basés sur les gènes codant pour l'ARNr 16S se sont avérés plus sensibles que les marqueurs ciblant des gènes fonctionnels (BtH, gyrB, HumM2, Mnif, CowM2 et Cow M3) (Layton *et al.*, 2013* ; Raith *et al.*, 2013*).

- Conclusions de l'étude

L'analyse des données acquises à l'issue de cette évaluation de marqueurs et les échanges entre les participants lors de la préparation des manuscrits ont souligné les difficultés à obtenir des résultats similaires lors de l'utilisation de méthodes différentes ou de la réalisation des analyses par des laboratoires différents.

Lorsque plusieurs laboratoires ont utilisé les mêmes marqueurs, de meilleurs résultats ont été généralement obtenus par les laboratoires qui ont développés ces marqueurs. Ceci a été observé, par exemple, pour les marqueurs humains HF183 TaqMan et BacHum-UCD, le marqueur ruminant BacR et le marqueur goéland Leeseagull (Boehm *et al.*, 2013 ; Layton *et al.*, 2013* ; Raith *et al.*, 2013* ; Silligiagano *et al.*, 2013).

Cette étude montre la nécessité :

- 1) d'harmoniser le choix des marqueurs et des protocoles associés pour avoir des résultats reproductibles d'un laboratoire à un autre et d'une étude à l'autre,
- 2) d'exprimer les résultats d'une façon similaire (pour les valeurs inférieures ou proches de la limite de quantification ; choix de l'unité de mesure de contamination fécale la plus adaptée ...).

La participation à cette évaluation internationale de marqueurs de l'origine de la contamination fécale s'est avérée très intéressante pour le Laboratoire de Microbiologie de l'Ifremer car elle a permis de montrer que les marqueurs bactériens que nous avons développés au laboratoire étaient efficaces également sur des échantillons provenant d'une autre région géographique. Elle a permis également de modifier notre protocole d'extraction des ADN bactériens afin de détecter, de façon optimisée, les *Bacteroidales* et *C. marimammalium* dans des eaux de l'environnement.

2.3. Evaluation du transfert des différents marqueurs de contamination fécale aux eaux de ruissellement

Les marqueurs *Bacteroidales* et les autres marqueurs sélectionnés et/ou développés au Laboratoire de Microbiologie à l'Ifremer et par nos partenaires scientifiques associés à une contamination animale *i.e.* génogroupes I et IV des bactériophages F ARN spécifiques,

marqueurs bactérien *L. amylovorus* et stanols fécaux (Tab. 4) ont été recherchés dans des eaux de ruissellement au cours d'expériences de simulations d'épandage d'effluents agricoles sur des parcelles expérimentales. Avant d'évaluer la présence des marqueurs dans les eaux environnementales, il était en effet nécessaire d'évaluer si les marqueurs pouvaient être transférés des lisiers et fumiers épandus sur les sols agricoles aux eaux de ruissellement lors d'épisodes de pluie.

Des expériences de simulation de pluie de forte intensité ($62 - 69 \text{ mm h}^{-1}$; durée 42 à 85 min ; $67 \text{ l.m}^{-2}.\text{h}^{-1}$; Fig. 7) ont été ainsi réalisées en avril 2008 sur des parcelles amendées avec du lisier de porc ou du fumier de bovin et des parcelles Témoin¹ (parcelles de 1,5 m sur 0,75 m ; $n = 9$). Elles confirment qu'il existe un transfert des bactéries fécales (*E. coli*, entérocoques et bactéries appartenant à l'ordre des *Bacteroidales*) initialement présents dans les déjections, dans les eaux de ruissellement (Tab. 11).

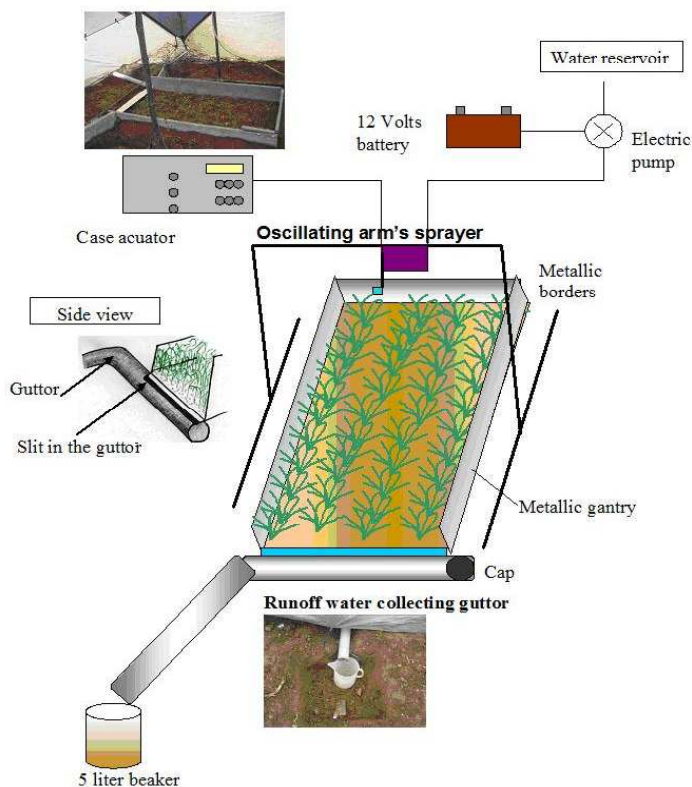


Figure 7 : Présentation du dispositif de simulation de pluie (Jaffrezic *et al.*, 2011*).

¹ Site de la chambre d'Agriculture du Morbihan – Kerguehenec

Tableau 11 : Résultats concernant les indicateurs fécaux et les marqueurs *Bacteroidales* dans les effluents épandus et dans les eaux de ruissellement après simulation de pluie.

	Lisier de porc (.g ⁻¹)	Fumier de bovin (.g ⁻¹)	Eaux de ruissellement (.100 ml ⁻¹)		
			Témoin	Lisier de porc	Fumier de bovin
<i>E. coli</i>	3 10 ⁴ ± 7,1 10 ³	5,1 10 ⁴ ± 4,5 10 ⁴	< LOQ	2,1 10 ⁴ ± 5,5 10 ³	3,6 10 ⁵ ± 2,6 10 ⁵
Entérocoques	3,5 10 ⁴ ± 9,5 10 ³	8,5 10 ⁴ ± 1 10 ⁴	< LOQ	2,2 10 ⁴	1,6 10 ⁵ ± 1,1 10 ⁵
Pig2Bac	8,5 10 ⁶ ± 7,1 10 ⁶	< LOQ	nd	1,3 10 ⁶ ± 3,7 10 ⁵	< LOQ
Rum2Bac	< LOQ	2,4 10 ⁷ ± 2,4 10 ⁶	nd	< LOQ	1,2 10 ⁷ ± 2,7 10 ⁶

Dans les conditions de l'expérience, pour un volume de 13 à 14 l d'eau ruisselée, pour cinq des six réplicats réalisés, la quantité de bactéries indicatrices de contamination fécale transférée dans l'eau de ruissellement représentait 2 à 6 % de la quantité de bactéries initialement présentes sur la parcelle avant la simulation de pluie. Les marqueurs *Bacteroidales* Pig2Bac et Rum2Bac qui étaient à des concentrations supérieures à celles des indicateurs fécaux dans les matrices épandues ont également été transférés dans l'eau de ruissellement dans des proportions similaires à celles des indicateurs fécaux (Tab. 11 ; Jaffrezic *et al.*, 2011*).

De la même façon, les bactériophages, le marqueur bactérien porc *L. amylovorus* et les stanols associés aux contaminations bovines ou porcines ont été transférés dans les eaux de ruissellement (Jaffrezic *et al.*, 2011*).

2.4 Evaluation de la persistance des marqueurs *Bacteroidales* dans les eaux – comparaison avec les indicateurs de contamination fécale et les autres marqueurs

Si la sensibilité et la spécificité des marqueurs *Bacteroidales* sont des éléments importants pour identifier correctement l'origine des pollutions fécales, la compréhension et l'évaluation de la persistance de ces marqueurs dans l'environnement sont aussi des éléments essentiels à prendre en compte lors de leur application sur des échantillons issus de l'environnement.

Les études sur la survie des bactéries entériques à l'extérieur du tractus digestif ont porté principalement sur la bactérie *E. coli* et elles ont montré qu'un nombre important de facteurs influent sur sa survie dans l'environnement (voir paragraphe 1.3).

Les méthodes utilisées pour la recherche des marqueurs *Bacteroidales* par PCR en temps réel, par rapport à celles utilisées pour l'indicateur *E. coli*, comportent deux principales différences susceptibles d'avoir un impact sur leur détection. En effet, dans le cas des marqueurs *Bacteroidales*, la recherche repose sur la détection de bactéries anaérobies strictes et la détection des bactéries cultivables, viables et mortes et dans le cas d'*E. coli*, sur la recherche de bactéries aéro-anaérobies facultatives et de bactéries cultivables.

De nombreuses études ont porté sur l'évaluation de la persistance des marqueurs *Bacteroidales* dans les eaux ; toutefois, les différences importantes dans les facteurs considérés (*i.e.* température, salinité, lumière, prédation par les protozoaires ...), les méthodes de détection, les conditions opératoires et l'expression des résultats rendent complexes leurs interprétation et synthèse pour évaluer la persistance de ces marqueurs dans l'environnement. Ces études prennent généralement en compte les facteurs indépendamment les uns des autres,

en microcosmes, alors que dans l'environnement, la persistance est influencée par un ensemble de facteurs qui peuvent interagir entre eux.

Lors d'expériences en microcosmes, la persistance des marqueurs *Bacteroidales* mesurée par PCR est généralement plus longue que celle des *Bacteroidales* viables, mises en évidence par des méthodes PMA – qPCR¹ ou LDS-FISH² ou que celle des *Bacteroidales* cultivables (Fiksdal *et al.*, 1985 ; Savitcheva *et al.*, 2005 ; Bae et Wuertz, 2009a et b). Des expériences réalisées en utilisant l'approche PMA-qPCR montrent ainsi qu'en microcosmes d'eau de mer à température ambiante, une réduction de 2 Log₁₀ des concentrations de cellules viables de *Bacteroidales* est obtenue en 28 h alors que plus de sept jours sont nécessaires pour observer une réduction équivalente pour les marqueurs *Bacteroidales* par PCR en temps réel (Bae et Wuertz, 2009b).

Les premières études de persistance ont été réalisées sur des souches pures de *Bacteroides* par méthode culturale. Ainsi, Fiksdal *et al.*, en 1985 ont montré que plus de 99 % des colonies de *Bacteroides fragilis* n'étaient plus détectées après une semaine dans une eau douce à 12°C en présence d'oxygène, tandis qu'une perte de 98 % des *E. coli* et de 91 % des *Streptococcus faecalis* était observée dans ces conditions. Il est probable que la persistance d'autres souches de *Bacteroidales*, plus sensibles à l'oxygène, soit encore plus faible. Plus récemment, la survie de *B. fragilis*, *B. thetaiotaomicron* et de *Bacteroides* spp. issus de l'environnement, a été comparée dans des eaux de rivières *in situ* en fonction des saisons (Balleste and Blanch, 2010). Dans les conditions de cette étude, les cellules cultivables de *B. fragilis* se sont avérées sensibles à l'effet combiné des températures élevées et de la présence de protozoaires et ont survécu plus longtemps pendant l'hiver que pendant l'été (valeurs de T90 respectivement de 24,9 h et 13,9 h). Les cellules de *B. thetaiotaomicron* et des *Bacteroides* spp., quant à elles, étaient plus sensibles aux teneurs en oxygène dissous et ont survécu moins longtemps en hiver qu'en été (respectivement, valeurs de 7,6 h et 17,9 h pour *B. thetaiotaomicron* et valeurs de T90 de 21,3 h et 41,4 h pour *Bacteroides* spp). Les cellules de *Bacteroides* ont présenté une survie plus courte que celle des coliformes thermotolérants et des entérocoques (Balleste and Blanch, 2010).

Concernant les marqueurs *Bacteroidales* par PCR en temps réel, les facteurs qui me semblaient les plus importants à étudier étaient la lumière, la teneur en oxygène, la température, la salinité et la prédation par les protozoaires.

La persistance des marqueurs *Bacteroidales* a été évaluée en microcosmes parallèlement à celle des indicateurs de contamination fécale, *E. coli* et les entérocoques et à celle des autres marqueurs, microbiens ou chimiques, sélectionnés au Laboratoire de Microbiologie à l'Ifremer et par nos partenaires scientifiques (Tab. 4).

Aussi, nous avons réalisé, trois séries d'expériences :

- la première a porté sur l'évaluation de la persistance de marqueurs associés à des contaminations par les porcs, le marqueur *Bacteroidales* Pig2Bac et le marqueur bactérien *L. amylovorus* en eau de rivière en conditions micro-aérophile et aérobie et à deux températures 4°C et 20°C, à l'obscurité (Marti, Mieszkin *et al.*, 2011*),

¹ PCR en temps réel avec le propidium monoazide

² Live/Dead Staining-Florescence *in situ* Hybridization

- la deuxième, sur l'évaluation de la persistance du marqueur *Bacteroidales* Pig2Bac, du marqueur *L. amylovorus*, des génogroupes animaux I et IV des bactériophages F ARN spécifiques et des stanols fécaux en eau de rivière et en eau de mer à l'obscurité à 18-20°C (Solecki *et al.*, 2011*),

- enfin, la troisième, sur l'évaluation de la persistance du marqueur *Bacteroidales* humain HF183, du marqueur bactérien *Bifidobacterium adolescentis*, du génogroupe II des bactériophages, de la caféine et des stanols fécaux également en eau de rivière et en eau de mer à l'obscurité à 18-20°C (Jeanneau *et al.*, 2012*).

L'effet de la lumière a été écarté en réalisant les expériences à l'obscurité ; l'utilisation d'effluents comme sources de contamination atténuait fortement la pénétration de la lumière dans les eaux. En l'absence de filtration des eaux dans les expériences 2 et 3, des protozoaires étaient susceptibles d'être présents dans les eaux.

Les deux premières expériences ont porté sur les marqueurs bactériens associés aux contaminations porcines et l'influence de la teneur en oxygène, de la température ou de la salinité sur leur persistance.

Dans les conditions opératoires de la première expérience, la persistance des marqueurs bactériens Pig2Bac et *L. amylovorus* n'a pas ou peu été affectée par la condition de micro-aérophilie à 4 et 20°C alors qu'elle l'était fortement en condition d'aérobie et ceci de façon beaucoup plus marquée à 20°C (Tab. 12). Dans ces conditions défavorables, elle variait, de plus, suivant le type de marqueur. Par exemple, le marqueur *Bacteroidales* Pig2Bac a perdu 3,5 Log₁₀ en 16 jours alors que le marqueur *L. amylovorus* a perdu 2,9 Log₁₀ en 43 jours.

L'influence de la température sur la persistance de marqueurs *Bacteroidales* a également été mise en évidence dans d'autres études (Kreader, 1998 ; Okabe and Shimazu, 2007 ; Bell *et al.*, 2009 ; Ballesté and Blanch, 2010 ; Schulz and Childers, 2011). Ainsi, par exemple, une forte corrélation entre la température et la dégradation de l'ADN des *Bacteroidales* est suggérée par les résultats de l'étude de Ballesté et Blanch en 2010 qui ont montré une détection de l'ADN par PCR, pendant de plus longues périodes en hiver qu'en été.

Concernant les indicateurs classiques, *E. coli* et les entérocoques intestinaux, recherchés par méthode culturale, le facteur qui a affecté le plus leur survie dans ces essais était la température. Le déclin le plus important a été observé à 20°C en microaérophilie pour *E. coli* qui a atteint la limite de détection en 25 jours et à 20°C en aérobie pour les entérocoques où le déclin a été observé à partir du 7^{ème} jour pour atteindre la limite de détection le 16^{ème} jour de l'expérience (Martí, Mieszkin *et al.*, 2011*).

Dans la deuxième expérience (aquariums de 100 l d'eau douce ou d'eau de mer à température ambiante, contaminée par du lisier de porcs), le marqueur *Bacteroidales* Pig2Bac a été quantifié jusqu'au 20^{ème} jour en eau de mer et au 27^{ème} jour en eau douce tandis que le marqueur *L. amylovorus* et les cinq stanols analysés ont persisté plus longtemps et ont été quantifiés tout au long des deux mois d'expérience (Solecki *et al.*, 2011*). Les valeurs des ratios de stanols, typiques d'une contamination porcine, n'ont été toutefois conservées que pendant les 6 premiers jours de l'expérience (Fig. 9 ; Solecki *et al.*, 2011*). Les concentrations en *E. coli* ont atteint très rapidement un faible niveau de concentration en eau

de mer et ces bactéries n'étaient plus été détectées à partir du 13^{ème} jour. Les entérocoques ont été détectés tout au long de l'expérience aussi bien en eau de mer qu'en eau douce.

Dans la troisième expérience (aquariums de 100 l d'eau douce ou d'eau de mer à température ambiante, contaminée par un effluent de station d'épuration), le marqueur *Bacteroidales* humain HF183 n'a été quantifié que jusqu'au 6^{ème} jour en eau de mer et au 13^{ème} jour en eau de rivière (Jeanneau *et al.*, 2012* ; Fig. 8). Les marqueurs humains persistant le plus longtemps dans les conditions de l'expérience se sont avérés être la caféine et le marqueur *B. adolescentis* ; le classement des marqueurs selon leur persistance est dans l'ordre décroissant :

- en eau douce, caféine > marqueur *B. adolescentis* > génogroupe II des bactériophages F ARN spécifiques > marqueur *Bacteroidales* HF183, stanols fécaux,
- en eau de mer, caféine, marqueur *B. adolescentis* > marqueur *Bacteroidales* HF183, stanols fécaux > génogroupe II des bactériophages F ARN spécifiques (Jeanneau *et al.*, 2012*).

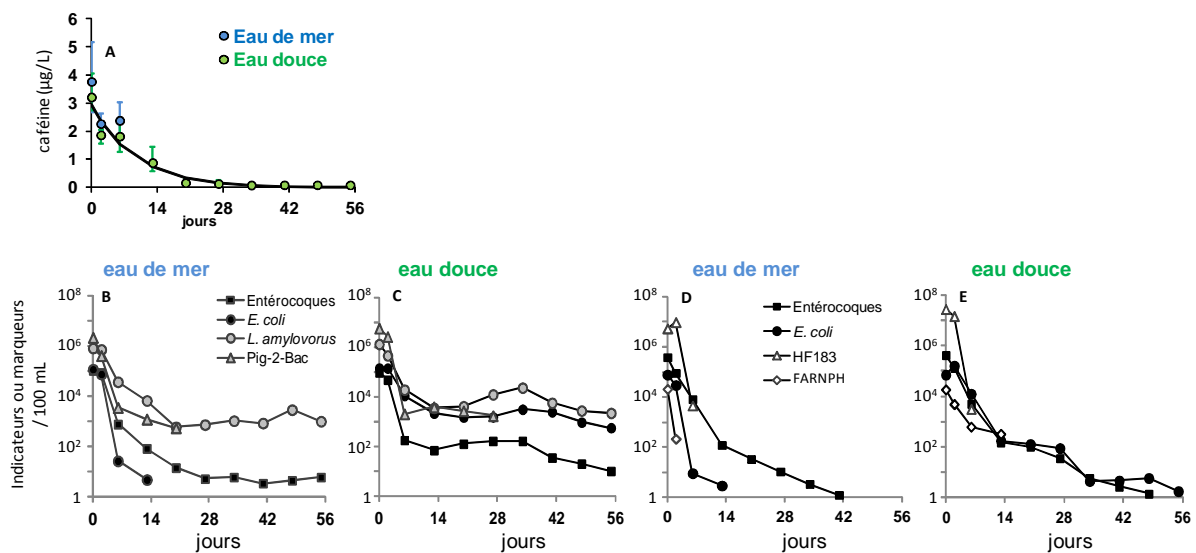


Figure 8 : Persistance de la caféine (A) après inoculation d'eau usée urbaine et persistance des indicateurs fécaux (*E. coli* et entérocoques) et des marqueurs microbiologiques dans l'eau de mer et l'eau douce inoculées avec du lisier de porc (B et C) et de l'eau usée urbaine (D et E). (Soleski *et al.*, 2011* ; Jeanneau *et al.*, 2012* ; Pourcher *et al.*, 2013*).

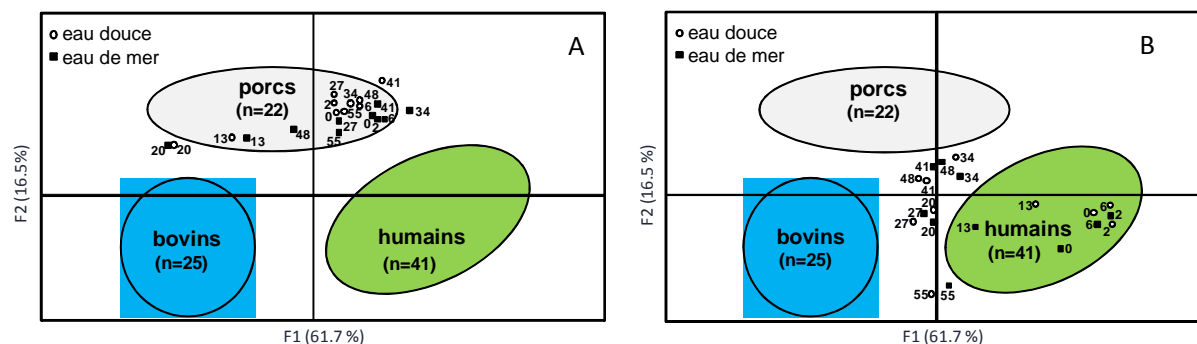


Figure 9 : Positionnement des échantillons prélevés au cours du temps dans les microcosmes contaminés par du lisier de porc (A) et de l’eau usée urbaine (B) dans l’ACP réalisée sur la distribution des stanols. Les chiffres indiquent le nombre de jours écoulés entre le début de l’expérience et le prélèvement (Soleski *et al.*, 2011* ; Jeanneau *et al.*, 2012* ; Pourcher *et al.*, 2013*).

Les valeurs de T90 de 1,5 à 2,1 jours obtenues dans les eaux de rivière ou de mer pour les marqueurs Pig2Bac et HF183 à une température de 18 – 20°C (Tab. 12) suggèrent que ces marqueurs sont des marqueurs d’une contamination fécale récente dans les eaux. Les marqueurs *Bacteroidales* persistent moins longtemps que les entérocoques dans les eaux douces et marines ou que les *E. coli* en eaux de rivière (cette étude ; Tambalo *et al.*, 2012). Il convient toutefois de remarquer que l’absence de détection des marqueurs *Bacteroidales* Pig2Bac et HF183 sur la durée des expériences peut être expliquée par leur plus faible persistance en milieu oxygéné mais également par le seuil de quantification élevé de la technique de PCR en temps réel par rapport aux méthodes culturales utilisées pour le dénombrement des indicateurs.

Tableau 12 : Taux de réduction décimale (T90) des indicateurs fécaux et des marqueurs dans les microcosmes contaminés par du lisier de porc ou de l’effluent de station d’épuration.

	Eaux contaminées par du lisier de porcs						Eaux contaminées par un effluent de station d’épuration	
	Eau de rivière, 4°C, aerobie	Eau de rivière, 20°C, aerobie	Eau de rivière, 4°C, micro-aerophilie	Eau de rivière, 20°C, micro-aerophilie	Eau de rivière, 18-20°C, aerobie	Eau de mer, 18-20°C, aérobie	Eau de rivière, 18-20°C, aerobie	Eau de mer, 18-20°C, aérobie
Pig2Bac	19,3	1,9	> 43	> 43	1,9	2,1		
HF183							1,5	1,9
<i>E. coli</i>	> 43	14,4	> 43	> 43	5,4	1,8	5,6	1,7
Enterococci	> 43	> 43	> 43	23	2,3	3,8	3,6	3,9
<i>L. amylovorus</i>	> 43	17,1	> 43	> 43	3,1	5,7		
<i>B. adolescentis</i>							3,6	3,8
Phages							4,2	0,9

Concernant la lumière, paramètre non pris en compte dans nos expériences, son influence est variable selon les études. Ainsi, un déclin plus important du marqueur *Bacteroidales* humain BacHum-UCD en eau de mer a été observé en lumière naturelle (T90 :

1,8 jours) qu'à l'obscurité (T90 : 8,7 jours) (Walters *et al.*, 2009) tandis qu'une décroissance similaire à la lumière naturelle et à l'obscurité a été observée pour ce même marqueur humain en eau de mer et pour les marqueurs *Bacteroidales* associé à l'Homme BacH et associé aux ruminants BacR en eau douce (Bae and Wuertz, 2009 ; Sokolova *et al.*, 2012).

En conclusion, les résultats acquis au cours de ces essais en microcosmes montrent que les marqueurs *Bacteroidales* semblent persister suffisamment longtemps dans les eaux environnementales pour permettre l'identification de l'origine d'une contamination fécale récente dans l'environnement. Toutefois, l'utilisation conjointe des autres marqueurs testés, sous la forme d'une « MST toolbox » ou d'une « boîte à outils de marqueurs » peut s'avérer intéressante pour palier à une absence de résultats du fait de la faible persistance possible pour certains marqueurs dans l'environnement sous certaines conditions (par exemple, plus faible persistance du marqueur *Bacteroidales* associé aux porcs Pig2Bac que celle du marqueur *L. amylovorus*).

Les marqueurs *Bacteroidales* ont été ensuite appliqués sur des échantillons d'eaux de l'environnement, seuls ou en association avec les autres marqueurs pour lesquels nous avons évalué également la persistance en microcosmes (Tab. 4).

2.5 Application des TSM sur des eaux de l'environnement à l'échelle bassin versant

Les marqueurs *Bacteroidales* de PCR classique, développés par Bernhard et Field en 2000 et Dick *et al.*, en 2005, puis ceux de PCR en temps réel, sélectionnés ou développés au Laboratoire de Microbiologie de l'Ifremer, ont été appliqués sur des eaux de rivières, estuariennes ou côtières provenant de différents sites en France (Tab. 13).

La recherche des marqueurs *Bacteroidales* associés à l'hôte était le plus souvent réalisée en association avec une recherche des génogroupes I-IV des bactériophages F ARN spécifiques sur les mêmes échantillons et parfois avec une recherche des autres marqueurs microbiens et chimiques sélectionnés par nos partenaires scientifiques (Tab. 4).

Tableau 13 : Présentation des études sur la recherche des marqueurs *Bacteroidales* associés à l'hôte réalisées au Laboratoire de Microbiologie de l'Ifremer.

Eaux analysées (n)	Eaux Localisation	Sources de contaminations potentielles	Dates	Marqueurs <i>Bacteroidales</i>	Autres marqueurs	Références Projet
Eaux de rivières (21) Eaux côtières (7)	Aber benoît (29) Normandie (50)	- Humaine, - Bovine, - Porcine - Humaine, - Bovine, - Ovine	Avril- Nov 2005	PCR conventionnelle HF183 HF134 CF128 CF193 PF163	FRNAPH	Gourmelon <i>et al.</i> , 2007 Interreg IIIb ICREW
Eaux de rivières (63)	La Baule (44)	- Humaine, - Bovine	Sept 2006 – Oct 2008	PCR temps réel HF183 BacR	FRNAPH	Gourmelon <i>et al.</i> , 2010b Convention Cap Atlantique, Gerrico
Eaux de rivières (33)	Daoulas (29)	- Humaine, - Bovine, - Porcine	2008- 2009	PCR temps réel HF183, Hum1Bac Pig1Bac Pig2Bac Rum2Bac		Mieszkin <i>et al.</i> , 2009a, b AFFSET Traces
Eaux usées (4) Eaux de ruissellement (6), Eaux de rivières (23)	Pays de la Loire (44) Bretagne Daoulas (29)	- Humaine, - Bovine, - Porcine	2007 – 2009	PCR temps réel HF183 Pig1Bac Pig2Bac Rum2Bac	14 marqueurs FRNAPH I-IV <i>B.ado</i> <i>L. amy</i> Stanols fécaux (R1, R2 et ACP) Caféine, Diph, benzo, TCEP, TDCP	Gourmelon <i>et al.</i> , 2010a Derrien <i>et al.</i> , 2012 AFFSET Traces
Eaux de rivières (6)	Penerf (56)		Mai 2010			
Eaux de rivières (168) Eaux côtières (72)	Daoulas (29)	- Humaine, - Bovine, - Porcine	Juil 2009 – Juin 2011	PCR en temps réel HF183 Pig2Bac Rum2Bac	FRNAPH	Mauffret <i>et al.</i> , 2012 Interreg IVA AquaManche
Eaux de rivières (120)	Elorn (29)	- Humaine, - Bovine, - Porcine	Août 2010- Juil 2011	PCR en temps réel HF183 Pig2Bac Rum2Bac	FRNAPH <i>L. amy</i> Cafeine Stanols fécaux (ACP)	Gourmelon <i>et al.</i> , 2013 Pourcher <i>et al.</i> , 2013 Marquopoleau
Eaux (24) Eaux de rivières (6) Eaux estuariennes (18)	Elorn (29) estuaire	- Humaine, - Bovine, - Porcine	Mars - Mai 2010	PCR en temps réel Hum1Bac Pig2Bac Rum2Bac	FRNAPH Culture et RT-PCR	Mieszkin <i>et al.</i> , 2013 Interreg IVA AquaManche

^a FRNAPH : bactériophages F ARN spécifiques ; *L. amy* : *L. amylovorus* ; *B. ado* : *B. adolescentis* ; diph : diphenylhydramine ; benzo : benzophénone ; TCEP : tri(2-chloroethyl)phosphate ; TDCP : tri(dichloroisopropyl)phosphate.

Les premières applications de marqueurs *Bacteroidales* au Laboratoire de Microbiologie à l'Ifremer, en 2005, ont été réalisées en utilisant les marqueurs de PCR conventionnelle associés à une contamination humaine (HF183, HF134), par les ruminants (CF128, CF193) ou par les porcs (PF163) sur des eaux de rivières ou eaux côtières en Bretagne et en Normandie en parallèle à la détection des génogroupes humains (II et III) et animaux (I et IV) des bactériophages F ARN spécifiques (Gourmelon *et al.*, 2007*). L'ensemble de ces marqueurs ont été appliqués également sur des eaux collectées au niveau de bassins versants irlandais, portugais et britanniques (Walter *et al.*, 2006*).

La classification des échantillons d'eau analysés sur les sites français ($n=28$) comme étant contaminés par une source humaine, animale ou mixte (détection des marqueurs associés à l'hôte dans l'échantillon considéré) a été obtenue pour 82,1 % des eaux par les marqueurs *Bacteroidales* et pour 50 % des eaux par les bactériophages. Le pourcentage d'échantillons pour lesquels une identification de l'origine de la contamination a été obtenue augmente avec les concentrations en *E. coli* et entérocoques (Gourmelon *et al.*, 2007*).

Les résultats obtenus sur les différents bassins versants montrent que ces marqueurs permettent d'identifier la(ou les) source(s) principale(s) de pollution fécale et qu'une contamination d'origine urbaine ponctuelle (détection des marqueurs *Bacteroidales* HF183 et génogroupe II des bactériophages), est plus facilement mise en évidence qu'une contamination d'origine agricole (détection des marqueurs *Bacteroidales* CF128 et CF193 et génogroupe I des bactériophages) (Gourmelon *et al.*, 2007* ; Walter *et al.*, 2006*).

Ces marqueurs *Bacteroidales* de PCR classique ne permettant pas toutefois d'avoir une idée de la proportion des différents marqueurs dans les échantillons d'eaux, des marqueurs de PCR en temps réel ont été sélectionnés dans la littérature. Les marqueurs *Bacteroidales* humain HF183 et ruminant BacR, développés respectivement par Seunrick *et al.*, en 2005 et Reischer *et al.* en 2008, ont été appliqués sur des eaux de la péninsule Guérande-Atlantique ($n=63$). L'utilisation de ces marqueurs a permis de mettre en évidence une contamination principalement humaine sur ce site ; le marqueur HF183 a été détecté à des concentrations de 3 à 6,2 Log_{10} copies de gènes par 100 ml d'eau dans 44,4 % des échantillons d'eaux tandis que le marqueur ruminant n'était présent que dans 8 % des échantillons à des concentrations entre 3 et 3,8 Log_{10} copies de gènes par 100 ml d'eau. Ces marqueurs appliqués précédemment sur un bassin versant en Bretagne (Daoulas, 29) avaient montré une contamination principalement par les ruminants (bovins) avec une fréquente détection du marqueur BacR à des concentrations de 4,1 à 6 Log_{10} copies de gènes par 100 ml d'eau et une plus faible détection du marqueur HF183 à des concentrations de 3,6 à 4,4 Log_{10} copies de gènes par 100 ml d'eau (Mieszkin *et al.*, 2009a*).

Les marqueurs *Bacteroidales* humain HF183, ruminant Rum2Bac et porc Pig2Bac ainsi que les génogroupes humains et animaux des bactériophages F ARN spécifiques ont été recherchés mensuellement pendant deux ans (2009-2011) sur le bassin versant de Daoulas (29)¹ (10 sites). Ce bassin versant avait été sélectionné en raison des contaminations microbiennes fécales observées au niveau des zones conchylicoles (alertes microbiologiques par le réseau REMI de l'Ifremer) et des eaux estuariennes en aval. De plus, de nombreuses données concernant les activités sur ce bassin, collectées au Laboratoire de Microbiologie de l'Ifremer lors d'études précédentes (Bougeard *et al.*, 2010) étaient disponibles pour évaluer l'efficacité de ces marqueurs à l'échelle d'un bassin versant. Le choix de ce site permettait également de confronter deux approches d'identification des sources de contaminations

¹ Projet Interreg IVA AquaManche (2009-2012)

fécales du littoral : l'approche modélisation bassin versant et l'approche reposant sur les traceurs de sources microbiennes.

Les marqueurs humains, *Bacteroidales* HF183 et génogroupe II des bactériophages, et le marqueur ruminant Rum2Bac se sont avérés être des marqueurs efficaces pour identifier l'origine humaine et l'origine bovine de la contamination sur ce site (Mauffret *et al.*, 2012*). Les marqueurs *Bacteroidales* humain et ruminant ont été quantifiés respectivement dans 17 % et 36 % des eaux analysés ($n=240$; Tab. 10). Par contre, le génogroupe I des bactériophages, associé à une contamination animale, n'a pas permis de mettre en évidence la contamination par les bovins sur ce bassin versant et le marqueur *Bacteroidales* Pig2Bac n'a été détecté que quatre fois sur un total de 240 échantillons analysés, bien que la production porcine était importante sur ce bassin versant (Mauffret *et al.*, 2012*). L'analyse des données (approche non paramétrique ; tests de corrélation de Spearman) montre une corrélation entre le marqueur HF183 et l'indicateur *E. coli* ($p<0,001$), une corrélation entre le marqueur Rum2Bac et *E. coli* ($p<0,0001$) et entre Rum2Bac et la pluviométrie ($p<0,0001$; Tab. 14).

La faible détection du marqueur Pig2Bac en comparaison à celle du marqueur Rum2Bac s'expliquerait principalement par les modes d'élevage des porcs et des bovins différents sur ce bassin versant : les porcs étant confinés dans les exploitations et les effluents porcins étant traités alors que les bovins étant en pâturage dans les champs. Une étude récente aux Etats-Unis a montré que le marqueur *Bacteroidales* Rum2Bac et l'indicateur *E. coli* persistaient dans des bouses des bovins placées dans un champ, avec respectivement des valeurs de T90 de 20,7 jours et de 7,7 jours (Oladeinde *et al.*, 2014).

Une autre hypothèse serait que la persistance du marqueur Pig2Bac au cours des traitements des lisiers et de son séjour dans l'environnement ne soit pas toujours suffisante pour détecter une contamination par les lisiers de porcs dans l'environnement (perte de 3,5 Log₁₀ copies entre les concentrations en Pig2Bac dans les fèces et les concentrations dans les lisiers de porcs traités ; Mieszkin *et al.*, 2009). Nous avons montré également qu'il persistait moins longtemps en microcosmes que le marqueur bactérien porc *L. amylovorus*. De plus, lors d'une pollution sur un bassin versant à proximité, lié à un déversement accidentel d'une cuve à lisier en 2011, le marqueur Pig2Bac n'a été que détecté dans les eaux en aval tandis que le marqueur *L. amylovorus* était quantifié à des concentrations importantes dans les eaux en aval de la pollution (Mauffret *et al.*, 2012*).

Une autre étude a porté sur l'application des marqueurs *Bacteroidales*, des bactériophages et des marqueurs microbiens ou chimiques sélectionnés par nos partenaires scientifiques sur un autre bassin versant breton (celui de Elorn, 29) (Tab. 14). L'ensemble de ces marqueurs ont été recherchés dans les eaux afin de comparer leur efficacité pour identifier les sources de contamination fécale dans l'environnement. Plus précisément, ils ont été recherchés mensuellement sur deux petits sous-bassins versants (Plouneventer, comportant des zones urbaines et des exploitations bovines et porcines ; Pen An Traon, sous-bassin versant côtier, comprenant des zones urbaines et/ou des exploitations bovines) d'août 2010 à juillet 2011 ($n = 120$; Gourmelon *et al.*, 2013*).

Une contamination fécale des eaux variant selon les sites de prélèvement et la période de l'année a été mise en évidence par la détection de l'indicateur *E. coli* sur ces deux sous-bassins versants (Fig. 10). Les marqueurs *Bacteroidales* humain HF183, ruminant Rum2Bac et porc Pig2Bac ont été quantifiés respectivement dans 38 %, 18 % et 2 % des eaux

analysées. Les génogroupes II humain et génogroupe I animal des bacteriophages ont été détectés respectivement dans 26 % et 11 % des eaux. Les stanols humains, bovins et porcins ont été mis en évidence respectivement dans 13 %, 35 % et 8 % des échantillons. La caféine a été détectée dans 26 % des eaux et le marqueur porc *L. amylovorus* a été quantifié dans 6 % des eaux (Fig. 11).

L'analyse des données montre que :

- les marqueurs humains (caféine, stanols humains, marqueur *Bacteroidales* HF183 et génogroupe II des bactériophages) sont corrélés entre eux et avec les indicateurs classiques de contamination fécale (*E. coli* et entérocoques) ($p < 0,0001$),
- les marqueurs bovins (stanols bovins et marqueurs *Bacteroidales* Rum2Bac) sont plus faiblement corrélés entre eux et sont corrélés avec la pluie ($p = 0,001$)
- Aucune corrélation n'a été mise en évidence pour les marqueurs porcs (Tab. 14 ; Gourmelon *et al.*, 2013*).

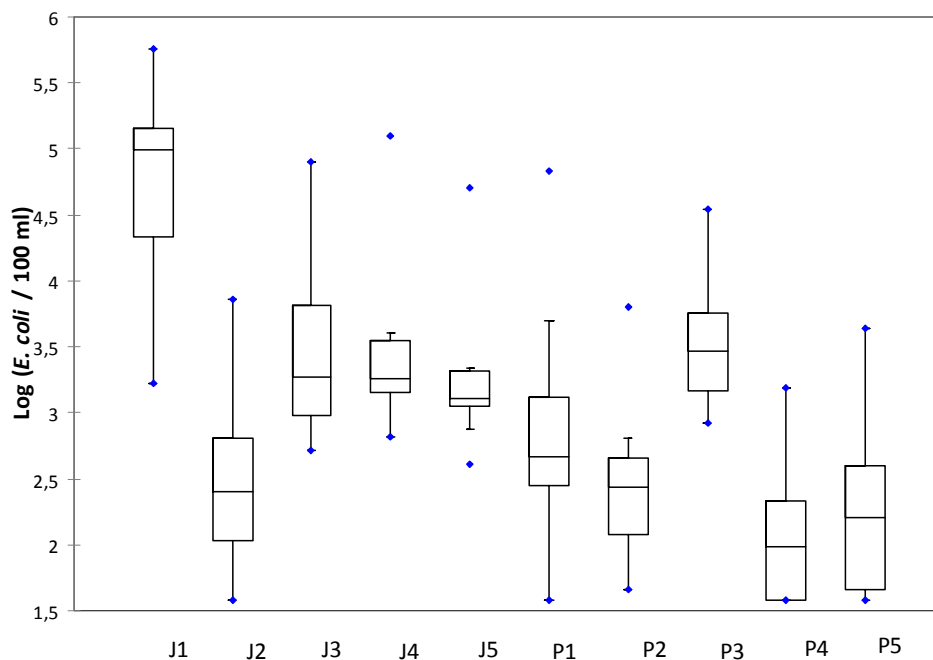


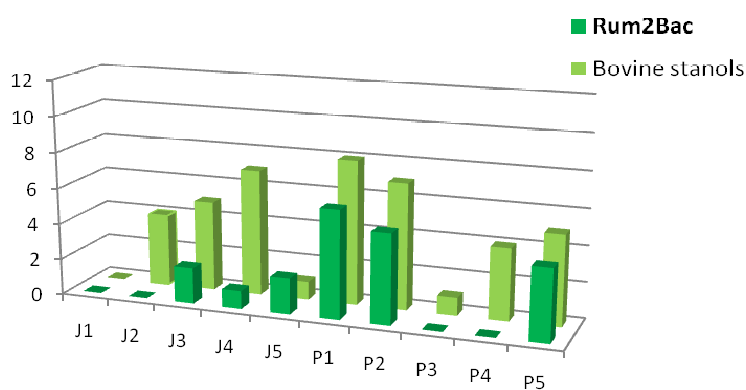
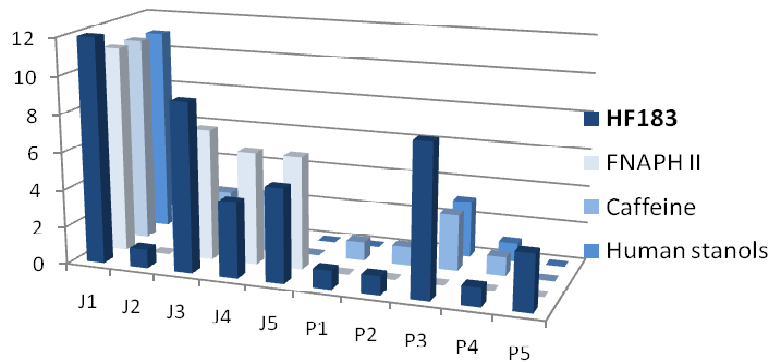
Figure 10 : Box plots des concentrations en *E. coli* (NPP/100 ml d'eau) des eaux collectées sur les dix sites de prélèvement d'août 2010 à juillet 2011. Les points J1 à J5 correspondent au bassin versant du Justicou et les points de P1 à P5 au bassin versant de Pen An Traon.

Tableau 14 : Présence des marqueurs *Bacteroidales* associés à l'homme, aux ruminants et aux porcs dans les eaux du bassin versant de Daoulas et dans les eaux des sous-bassins versants du Justicou et de Pen An Traon (Elorn, 29) et corrélations avec l'indicateur *E. coli* et la pluviométrie (test de corrélation de Spearman).

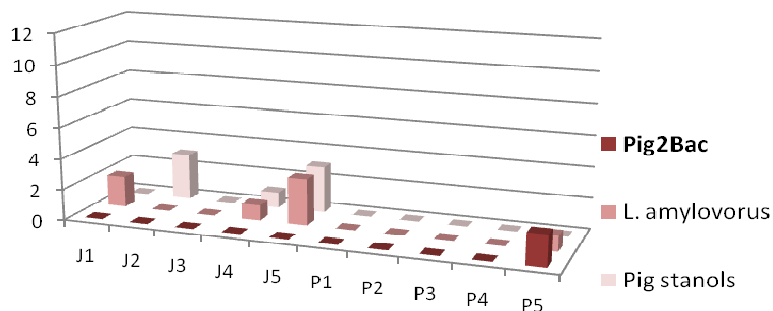
	Marqueurs <i>Bacteroidales</i>		
	Pig-2-Bac	Rum-2-Bac	HF183
Présence (à un niveau quantifiable)			
Daoulas (<i>n</i> =240)	2 %	36 %	17 %
Justicou et Pen an Traon (<i>n</i> =120)	2 %	17 %	38 %
Corrélations avec <i>E. coli</i>			
Daoulas (<i>n</i> =240)	r=0.01	r=0.49***	r=0.25**
Justicou et Pen an Traon (<i>n</i> =120)	r=-0.04	r=0.00	r=0.51***
Corrélations avec la pluie			
Daoulas (<i>n</i> =240)	r=-0.08	r=0.30***	r=0.02
Justicou et Pen an Traon (<i>n</i> =120)	r=-0.07	r=0.29*	r=-0.14

^a Les seuils de significativité sont définis comme faiblement significatifs (*, $P < 0.01$), significatifs (**, $P < 0.001$) et très significatifs (***, $P < 0.0001$).

A



B



C

Figure 11 : Détection des marqueurs associées à une contamination humaine (A), par les ruminants (bovins ; B) et par les porcs (C) sur les eaux collectés sur le sous-bassin versant du Justicou (J1 à J5) et de Pen An Traon (P1 à P5) – Elorn, 29.

L'application de ces marqueurs sur des eaux environnementales a permis d'émettre quelques recommandations :

- une seule analyse sur un site donné ne permet pas d'identifier correctement l'origine de la contamination. Il est nécessaire de réaliser plusieurs prélèvements et analyses sur

un site donné à plusieurs périodes de l'année dans des conditions de pluviométrie différentes ;

- toute analyse de marqueur de l'origine de la contamination fécale doit être associée à une évaluation de la concentration en indicateurs de contamination fécale *E. coli* et/ou entérocoques ;
- la recherche des marqueurs doit être privilégiée dans les eaux ayant des concentrations en *E. coli* supérieures à 500 NPP / 100 ml d'eau. ;
- l'utilisation de plusieurs marqueurs dans le cadre d'une « MST toolbox » ou « boîte à outils » peut permettre de prévenir des limites de certains marqueurs (faible persistance dans l'environnement, hôte non pris en compte ...)

Les marqueurs *Bacteroidales* humain, ruminant et porc et leur protocole de recherche dans les eaux ont été transférés à des laboratoires d'analyses des eaux ; ces marqueurs sont actuellement utilisés en routine par IDHESA (Plouzané) et Eurofins (Maxéville) afin de répondre à la demande des gestionnaires des eaux (utilisation par exemple dans le cadre des profils de baignade)¹

2.6 Application des TSM sur des coquillages

L'identification des sources de contaminations fécales au niveau des coquillages, susceptibles de concentrer les bactéries et virus pathogènes présents dans les eaux, est également nécessaire. L'application de ces traceurs de sources microbiennes aux coquillages n'était encore que peu développée dans la littérature (Meschke *et al.*, 2007). Les cibles qui ont été testées reposent sur des bactéries (Roslev *et al.*, 2009 et 2010), des bactériophages et des virus (Caprais *et al.*, 2009 ; Ley *et al.*, 2002 ; Wolf *et al.*, 2010), ou des cellules eucaryotes (ADN mitochondriaux ; Baker-Austin *et al.*, 2010).

Les essais au laboratoire ont porté essentiellement sur les marqueurs *Bacteroidales* et les bactériophages F ARN spécifiques. Des norovirus spécifiques de l'Homme, des porcs et des bovins ont été recherchés également au niveau de bassins versants en Bretagne (Le Guyader *et al.*, 2012b) et ont montré une fréquence de détection variable dans les coquillages au cours de l'année du fait des cycles saisonniers d'infection et de la faible détection de certains norovirus dans les fèces des animaux (taux de détection < 1 % des norovirus dans les fèces porcines).

Au Laboratoire de Microbiologie à l'Ifremer, nous avons dans un premier temps recherché la présence de marqueurs *Bacteroidales* dans des coquillages issus de la côte Atlantique. Les marqueurs ont été recherchés dans les tissus digestifs de lots de coquillages préalablement disséqués (secteur de la péninsule Guérande-Atlantique²). Les génogroupes humains (II et III) et animaux (I et IV) des bactériophages ont également été recherchés en parallèle. Si la recherche des bactériophages, par culture/génotypage ou par RT-PCR directe, a permis de mettre en évidence une contamination humaine (génogroupe II) ou animale (autre que bovine ; génogroupe I) dans les coquillages, les marqueurs *Bacteroidales* par PCR conventionnelle ou PCR en temps réel ont conduit rarement à une identification de l'origine de la contamination fécale sur ces échantillons (analyse des tissus digestifs ; Gourmelon *et al.*, 2010d*).

¹ Projet Marquopoleau (2009 – 2013)

² Convention CAP Atlantique 2006-2008 ; projet GERRICO ; 2007-2010

Des efforts importants ont donc été réalisés pour optimiser la détection des marqueurs *Bacteroidales* dans les coquillages et tout particulièrement dans les huîtres¹. Ces essais ont confirmé les difficultés à analyser directement les bactéries par PCR en temps réel à partir des tissus de coquillages (sans étape de culture) et ont montré que l'analyse des liquides intervalvaires des huîtres couplée à l'extraction des ADN à l'aide du kit Fast DNA for Soil (MP Biomedicals) semblait être le protocole le plus prometteur (Mauffret *et al.*, 2013* ; Mieszkin *et al.*, 2013*). En effet, ce protocole a permis de quantifier les marqueurs *Bacteroidales* dans la totalité des lots de coquillages contaminés artificiellement et d'identifier la source de contamination dans 13 des 38 lots d'huîtres naturellement contaminés (Mauffret *et al.*, 2013*). Cependant, ce protocole n'a pas permis d'identifier la source de contamination dans les lots de coques et palourdes analysés, naturellement contaminés ($n=22$).

¹ Thèse S. Mieszkin (2007-2010); projet Intereg IVA Aquamanche ; post-doc A. Mauffret (2010-2011) et master II recherche Y. Alfansiah (2010-2011).

3 Perspectives de recherche

Mes divers travaux ouvrent des perspectives de recherche pour la poursuite de l'approche Traceurs de Sources Microbiennes dans l'environnement et la recherche des bactéries entériques potentiellement pathogènes en zone littorale.

Les objectifs scientifiques ciblés sur ces deux thématiques sont présentés dans une première partie. Les développements méthodologiques nécessaires pour atteindre ces objectifs sont abordés dans une seconde partie.

3.1 Les objectifs scientifiques

La présence de microorganismes potentiellement pathogènes pour l'Homme dans l'environnement, et en particulier, au niveau des eaux de baignades et des eaux conchylicoles, présente un risque sanitaire et économique important.

Même si une plus faible survie des *E. coli* a été mise en évidence dans les eaux marines que dans les eaux douces (cf expériences de persistance en microcosmes ; paragraphe 2.4), des concentrations importantes en *E. coli* peuvent être retrouvées dans les coquillages des zones conchylicoles ou de pêches récréatives. Ces concentrations élevées peuvent conduire à une fermeture temporaire ou au déclassement de ces zones.

Pour mettre en place les actions nécessaires pour limiter les apports en *E. coli* au littoral, la discrimination et la hiérarchisation des sources de contamination fécale d'origine humaine et animale sont devenues prioritaires. Il est donc important de posséder des marqueurs des différentes origines de contaminations permettant de tracer les contaminations fécales de la source au littoral.

Si des traceurs de sources microbiennes ont permis d'obtenir des résultats intéressants lors de leur application dans l'environnement, des développements et validations sont encore nécessaires en particulier au niveau de leur recherche dans les coquillages. De plus, il apparaît important d'évaluer l'existence éventuelle de liens entre ces traceurs et les bactéries entériques potentiellement pathogènes telles que les *E. coli* pathogènes, les salmonelles et les *Campylobacter* au niveau des zones conchylicoles ou des bassins versants.

3.1.1 L'approche Traceurs de Sources Microbiennes

Cette thématique est toujours en plein essor comme le montre la revue de la littérature sur l'approche " Microbial Source Tracking " (publications, livres¹ et numéro spécial de Water Research issu de l'évaluation SIPP (Novembre 2013) sur cette approche. Nombreuses présentations au dernier colloque IWA sur la microbiologie relative à la santé en septembre, WaterMicro 2013, Brésil).

La pression des gestionnaires de l'eau et des collectivités pour disposer de marqueurs de l'origine de la contamination fécale fiables et utilisables sur différents sites est très forte (profils de baignade ; pollutions non identifiées). Ils souhaitent disposer de marqueurs

¹ Microbial Source Tracking : methods, applications and case studies. Ed. C. Hagedorn, A. Blanch et V. Harwood. Springer Science, 2011 ; Microbial Source Tracking Ed J. Santo Domingo et M.J. Sadowsky, ASM Press, 2007.

permettant de relier les *E. coli* présents dans les eaux et coquillages aux sources d'apports en amont et connaître la contribution des différentes sources de contamination fécale dans un échantillon donné.

De très nombreux marqueurs ont été identifiés ces dernières années et de nouveaux ont été tout récemment développés tels que *Faecalibacterium* (Shen et al., 2013). Devant la multitude de marqueurs décrits dans la littérature, il est indispensable de sélectionner les plus pertinents et d'harmoniser leurs protocoles de détection. Dans l'étude internationale d'évaluation des marqueurs réalisée en 2011 (évaluation SIPP), 41 méthodes TSM avaient été testées (Boehm et al., 2013). Toutefois, ces méthodes ne constituaient qu'une partie des méthodes TSM. D'autres méthodes basées sur d'autres bactéries, des parasites ou des composés chimiques ont été également développées et appliqués sur des échantillons de l'environnement (Derrien et al., 2012* ; Ruecker et al., 2012 ; Shen et al., 2013).

Les marqueurs *Bacteroidales* apparaissent la cible à privilégier pour l'identification des sources de contamination fécale dans l'environnement en raison des cibles décrites pour de nombreux hôtes, des concentrations importantes dans les échantillons fécaux, des nombreuses données disponibles et de l'absence de multiplication dans l'environnement.

Au laboratoire, nous utilisons en routine les marqueurs *Bacteroidales* HF183, Rum2Bac, Pig2Bac et le marqueur *C. marimammalium* Gull 2 qui nous permettent de mettre en évidence respectivement les contaminations par l'Homme, les ruminants, les porcs et les oiseaux de mer, contaminations fécales qui sont observées dans les eaux en Bretagne.

Les marqueurs développés au laboratoire, Rum2Bac et Pig2Bac, se sont avérés efficaces pour tracer une contamination des eaux respectivement par les ruminants et par les porcs en France mais également au niveau international (Californie, Argentine, Bangladesh ; com. orales et poster WaterMicro2013 IWA Brésil ; Canada, Marti et al., 2013) démontrant ainsi leur bonne stabilité géographique. Ils ont ainsi été retenus parmi les marqueurs les plus performants dans l'étude SIPP en Californie (Boehm et al., 2013).

Il me semble donc important de poursuivre cet axe de recherche et d'appliquer ces marqueurs dans l'environnement tout en essayant d'optimiser leur protocole de détection/quantification.

- Des marqueurs pour les différentes sources de contamination

L'approche TSM nécessite de prendre en considération les différentes sources de contaminations possibles au niveau du bassin versant ou de la zone littorale étudié. Les sources de contamination sont souvent multiples et les quatre cibles citées précédemment peuvent toutefois s'avérer insuffisantes sur certains bassins versants complexes.

Actuellement, des marqueurs *Bacteroidales* associés à une multitude de sources : Homme, ruminants (bovins, ovins, chamois ...), porcs, chevaux, chiens, oies sont disponibles (Fremaux et al., 2010 ; Marti et al., 2011 ; Tambalo et al., 2012). Certains marqueurs *Bacteroidales* associés, par exemple, aux chevaux, aux chiens, spécifiquement aux bovins ou aux ovins manquent de sensibilité et de spécificité et nécessitent des développements complémentaires (Silkie and Nelson, 2009 ; Kildare et al., 2007 ; Shanks et al., 2008 ; Boehm et al., 2013).

Pour d'autres hôtes comme les oiseaux de bord de mer ou la volaille, les *Bacteroidales* ne se sont pas avérés être une bonne cible (faible pourcentage de bactéries appartenant à l'ordre des *Bacteroidales* dans les fientes de goélands, par exemple). D'autres cibles semblent plus prometteuses : *Catellibacterium marimammalium* pour les oiseaux de bord de mer (Lu *et al.*, 2008) ; *Faecalibacterium* pour la volaille (Shen *et al.*, 2013). Ce dernier marqueur sera testé sur la collection de fèces et de fientes d'oiseaux du Laboratoire de Microbiologie et sera ensuite appliqué sur les eaux de l'environnement des sites que nous étudions et qui sont susceptibles d'être impactés par des élevages de volaille.

D'autres cibles restent encore à développer pour prendre en compte la totalité des sources de contamination potentielles au niveau des bassins versants et des zones littorales. Peu de marqueurs ciblent, par exemple, la faune sauvage : phoques, sangliers ... Il est également important à noter que selon les populations animales, l'efficacité du marqueur pourra être différente. Ceci a été démontré, par exemple, pour les bovins (Shanks *et al.*, 2010-2011).

- Les marqueurs de la source aux coquillages

Les marqueurs doivent permettre d'identifier l'origine de la contamination fécale de la source aux eaux littorales et aux coquillages. L'utilisation de la même cible (marqueur *Bacteroidales*, par exemple) de la source aux coquillages est à privilégier. Toutefois, les premiers résultats que nous avons obtenus sur l'application des marqueurs *Bacteroidales* à des lots de coquillages naturellement contaminés ont montré une faible détection de ces marqueurs dans les coquillages, avec les protocoles utilisés au Laboratoire de Microbiologie de l'Ifremer (Mauffret *et al.*, 2013*).

Des développements méthodologiques seront donc réalisés au Laboratoire de Microbiologie de l'Ifremer (LSEM) pour optimiser la détection des marqueurs *Bacteroidales* dans les coquillages en analysant différentes espèces de coquillages et différentes parties du coquillage (voir partie les développements méthodologiques paragraphe 3.2.1).

Toutefois, parallèlement aux développements concernant les marqueurs *Bacteroidales*, il apparaît aussi important d'étudier d'autres marqueurs basés sur des cibles pouvant être présentes à un niveau de concentrations plus important dans les coquillages ou pouvant être plus facilement détectés dans ces coquillages. A titre d'exemple, des études réalisées au Laboratoire de Microbiologie de l'Ifremer ont montré que des virus entériques humains et des bactériophages recherchés par RT-PCR étaient présents dans les coquillages et qu'ils étaient plus facilement détectés dans les coquillages que les bactéries par méthode de PCR directe (marqueurs *Bacteroidales*, par exemple). De plus, les partenaires scientifiques avec qui nous collaborons actuellement dans le cadre du projet Interreg IVA RiskManche développent en parallèle d'autres marqueurs ou méthodes pour une application dans les coquillages tels que les stanols fécaux (CNRS Géosciences de Rennes), les ADN mitochondriaux (Cefas et Environment Agency), le typage des *E. coli* (Environment Agency) et des bactériophages (bactériophages de *Bacteroides* ; Université de Brighton). Ces marqueurs et les marqueurs *Bacteroidales* seront comparés sur des échantillons d'eaux environnementales communs puis sur des lots de coquillages contaminés naturellement ou artificiellement pour évaluer ces marqueurs et retenir les plus performants pour une application sur les eaux et coquillages en France et en Grande-Bretagne.

Enfin, le développement de nouveaux marqueurs de contamination fécale pour une application dans les coquillages reste toujours d'actualité. Une possibilité consistera à analyser la diversité bactérienne dans les coquillages contaminés par des bactéries fécales (présentant des concentrations en *E. coli* élevées) par la méthode de pyroséquencage du gène codant l'ARN 16S (Unno *et al.*, 2010 ; Ma *et al.*, 2013 ; Powell *et al.*, 2013). Ceci devrait nous permettre de mettre en évidence les bactéries majoritaires présentes plus spécifiquement dans les coquillages contaminés en *E. coli* et rechercher au sein de ces bactéries de nouvelles cibles potentielles de marqueurs de l'origine de la contamination fécale. La diversité bactérienne de coquillages issus de mêmes sites, fortement et peu contaminés en *E. coli*, sera comparée. En effet, des fluctuations importantes des concentrations en *E. coli* dans les coquillages d'un même site sont observées au cours de l'année (Amouroux et Bizzozero, 2011 ; Derolez *et al.*, 2013).

- Evaluation de la persistance des marqueurs dans l'environnement

L'évaluation de la persistance des marqueurs *Bacteroidales* dans l'environnement est également un axe de recherche essentiel à poursuivre. Une évaluation de la persistance des marqueurs associés à différents hôtes permettra d'affirmer ou d'infirmer que ces marqueurs se comportent d'une façon similaire dans l'environnement et que leurs concentrations dans un échantillon d'eau littorale ou dans un lot de coquillages donné peuvent donc être comparées. Il est également important d'évaluer si les marqueurs *Bacteroidales* ayant séjourné dans l'environnement peuvent être retrouvés dans les coquillages et y persister suffisamment longtemps pour être détectés.

Nous mettrons à profit notre expérience des essais de contamination des coquillages et d'évaluation de la persistance des bactéries et traceurs de sources microbiennes en microcosmes (eaux de mer, eaux douces, eaux de mer avec coquillages ; Solecki *et al.*, 2011* ; Jeanneau *et al.*, 2012* ; Mauffret *et al.*, 2013*) afin d'évaluer la persistance des marqueurs retenus au laboratoire. Les essais de persistance des marqueurs seront réalisés dans des eaux de rivières, des eaux marines et dans des coquillages en prenant en compte les facteurs biotiques et abiotiques les plus importants.

- Relation entre les marqueurs et les indicateurs de contamination classiques

Il est fortement recommandé de rechercher les marqueurs de l'origine de la contamination fécale dans l'environnement parallèlement à la recherche des indicateurs classiques, *E. coli* et les entérocoques intestinaux. En effet, le dénombrement de ces indicateurs dans les eaux et les coquillages est utilisé pour classer les eaux de baignade et les eaux conchylicoles. Les résultats obtenus précédemment au Laboratoire de Microbiologie à l'Ifremer et par nos partenaires scientifiques montrent qu'une concentration en *E. coli* de 500 NPP par 100 ml d'eau est un minimum requis pour avoir une probabilité importante d'obtenir un résultat par les marqueurs *Bacteroidales* (Mauffret *et al.*, 2012*). Ceci permet d'éviter des analyses sur des eaux peu contaminées pour lesquelles les marqueurs *Bacteroidales* ne sont pas adaptés.

Il est important de garder en mémoire que la détection des indicateurs se fait par méthode culturale tandis que les marqueurs analysés par PCR prennent en compte les bactéries cultivables, mais également les bactéries viables non cultivables et les bactéries

mortes. Ces différences conduisent à des comportements différents des indicateurs et des marqueurs face aux traitements des effluents. Cela a été démontré, par exemple, pour les UV (Stapleton *et al.*, 2009).

Au cours de nos études futures, nous poursuivrons ainsi la recherche des indicateurs *E. coli* et entérocoques et des marqueurs de l'origine de la contamination fécale dans les eaux et les coquillages. Les possibles relations entre ces bactéries et marqueurs seront également évaluées.

- Standardisation des méthodes TSM

Même s'il n'est pas envisagé au niveau international d'établir une norme ou une réglementation sur l'application des marqueurs dans les eaux ou les coquillages pour identifier les sources, il est évident qu'un des enjeux de cette approche TSM est de disposer dans le futur de méthodes standardisées qui permettront de comparer les résultats d'une étude à une autre, d'un site à l'autre et d'un laboratoire à un autre, au niveau international.

Les études récentes de comparaison de ces marqueurs (Boehm *et al.*, 2013; Stewart *et al.*, 2013 ; Reischer *et al.*, 2013 ; Comm. Orale O. Shanks, WaterMicrob 2013) montrent en effet une très grande disparité dans les résultats selon les cibles et les méthodes utilisées ; cette disparité existe même lorsque les cibles sont identiques (*Bacteroidales*, par exemple) du fait des différences dans les protocoles, les pratiques de laboratoire et l'expression des résultats.

Ce travail de standardisation consistera à sélectionner les marqueurs les plus performants, à optimiser les protocoles de détection/quantification, à harmoniser l'expression des résultats et à rédiger des procédures claires applicables au niveau des laboratoires de recherche et des laboratoires d'analyses des eaux. Cette standardisation des méthodes passera par la poursuite d'études comparatives intra et interlaboratoires et par la poursuite des échanges entre les scientifiques impliqués sur cette approche, initiés par l'évaluation SIPP en 2011.

3.1.2 *Les bactéries entériques potentiellement pathogènes pour l'Homme*

L'origine de la contamination, humaine ou animale, conditionne les types de microorganismes entériques présents au niveau du littoral et donc le risque sanitaire qui y est associé. Les contaminations d'origine humaine présentent généralement un risque plus élevé pour la santé humaine car elles sont susceptibles de contenir des pathogènes entériques adaptés à l'homme (norovirus, par exemple). Toutefois, les animaux peuvent aussi servir de réservoir pour de nombreux pathogènes bactériens comme les STEC, *Salmonella* et *Campylobacter* (Koopmans and Duizer, 2004 ; Cox *et al.*, 2005 ; Gerba and Smith, 2005).

De plus, il est important de considérer que si une espèce bactérienne peut être présente chez plusieurs hôtes (Homme, bovins, porcins ...), certaines bactéries d'une même espèce peuvent être associées plus particulièrement à un type de déjections ou d'effluents. A titre d'exemple, en 2008, dans la filière « bovine », 60,5 % des souches de *Salmonella* isolées appartenaient aux sérovars Montevideo, Typhimurium et Dublin tandis que dans la filière

« volaille », les trois principaux sérovars étaient Senftenberg, Enteritidis et Indiana (57,5 % des souches) (Moury *et al.*, 2011).

- Recherche de bactéries entériques potentiellement pathogènes dans les coquillages

Peu d'études ont porté sur la recherche de bactéries entériques telles que les *E. coli* pathogènes, salmonelles ou *Campylobacter* dans les coquillages des zones conchylicoles (Hervio-Heath *et al.*, 2011*). De plus, peu d'études ont recherché à la fois ces bactéries au niveau des zones conchylicoles et des bassins versants en amont.

Etude RiskManche

Dans le cadre du projet Interreg IVA RiskManche, nous allons évaluer, au cours de deux années de suivi (2013-2015), la présence de ces bactéries entériques dans l'environnement et tout particulièrement au niveau de deux sites côtiers en aval de bassins versants mixtes (activités agricoles et urbaines ; en Bretagne et en Normandie). Les sites de la baie de la Fresnaie (22) et des Havres de Régneville et de la Vanlée (50) ont été retenus. Des eaux littorales, des lots de coquillages (huîtres, moules et coques) et des sédiments superficiels à proximité ainsi que des eaux des bassins versants en amont seront collectés une fois par mois et la présence de ces bactéries sera recherchée dans l'ensemble de ces échantillons.

La recherche de ces bactéries entériques sera réalisée en parallèle à la recherche des indicateurs de contamination fécale, *E. coli* et les entérocoques intestinaux, des marqueurs de l'origine de la contamination fécale (marqueurs *Bacteroidales* et stanols fécaux) et d'autres microorganismes potentiellement pathogènes pour l'Homme présent dans l'environnement littoral (des bactéries marines, les *Vibrio*, et des virus entériques tels que les norovirus).

Des données permettant la caractérisation des bassins versants concernés *i.e.* la population humaine, les activités urbaines et agricoles, le nombre d'exploitations et le cheptel d'élevage seront collectées. Les sources de contamination fécale possibles sur ces bassins versants sont principalement les porcs, les bovins, les ovins, la volaille, les oiseaux de bord de mer ou l'Homme. Les paramètres physico-chimiques tels que la salinité, la turbidité ou la température seront également mesurés. Enfin, des données météorologiques seront aussi collectées.

Les principaux objectifs de cette étude sont : 1) de mettre en évidence la présence de bactéries potentiellement pathogènes pour l'Homme dans l'environnement, 2) d'identifier et de caractériser les souches bactériennes présentes, 3) de rechercher des bactéries entériques potentiellement pathogènes associés à un hôte et 4) d'identifier l'origine des bactéries pathogènes isolées dans les eaux et coquillages par l'application des marqueurs sur les échantillons dans lesquels elles ont été retrouvées.

Les premiers résultats sur le site de La Fresnaie montrent une prévalence importante de ces bactéries (*Campylobacter*, *Salmonella* et *E. coli* pathogènes dont les STEC) dans les eaux de rivière du site d'étude en Bretagne et une détection également de ces bactéries dans les coquillages. Il est important de noter que, pour ces différentes bactéries, plusieurs isolats

proviennent d'un même échantillon et que le typage de ces souches sera donc nécessaire pour les différencier et permettre de ne retenir que les souches différentes.

Les perspectives dans le cadre de cette étude

La collecte des échantillons, leur analyse et l'isolement des souches bactériennes potentiellement pathogènes seront poursuivis jusqu'en janvier 2015 sur le site de la Fresnaie et sur les deux sites normands.

Les souches seront caractérisées et typées afin d'évaluer si des souches identiques peuvent être isolées dans les eaux et les coquillages et être présentes dans l'environnement pendant plusieurs mois. Les souches isolées dans les eaux, coquillages et sédiments et dans les différents sites seront également comparées.

Pour les *E. coli* pathogènes, les souches STEC seront sérotypées et typées par la méthode PFGE. Les variants *stx* seront identifiés par PCR ou par le séquençage de la totalité du gène *stx* pour les souches STEC dont le variant n'aura pas pu être identifié par cette méthode PCR. La présence d'autres gènes de virulence et la résistance à des antibiotiques seront également évaluées par méthode PCR ou l'utilisation d'une puce à ADN *E. coli*. Le séquençage du génome de certaines souches *E. coli* isolées dans les eaux et/ou coquillages au cours de cette étude pourra être réalisé dans l'objectif de mieux comprendre l'écologie et la spéciation des *E. coli* dans l'environnement (Luo *et al.*, 2011).

Des données concernant la prévalence des souches STEC dans les fèces de bovins ou dans des aliments, obtenues dans le cadre de plans de surveillance et chez l'Homme dans le cadre de pathologies (par exemple, SHU, à déclaration obligatoire) dans les régions étudiées seront recueillies. Elles seront comparées à celles qui seront obtenues au cours de notre étude.

Pour les salmonelles, la caractérisation des souches sera poursuivie par une détermination de leur sérotype, une évaluation de leur résistance à des antibiotiques et leur typage par une méthode CRISP (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats), sorte de « système immunitaire bactérien », récemment développée par S. De Hello à l'Institut Pasteur (Paris).

Enfin, pour les *Campylobacter*, les espèces seront identifiées par PCR en temps réel et/ou spectrométrie de masse MALDI-TOF. Deux méthodes d'isolement des *Campylobacter* seront comparées afin d'évaluer de façon optimale la diversité des souches présentes : méthode par enrichissement (norme ISO 10272) et méthode par migration passive, développée par C. Penny à l'Institut Gabriel Liepman, au Luxembourg. Les souches seront typées par une méthode reposant sur le séquençage du gène *porA* puis par la méthode PFGE. Les profils obtenus seront comparés entre eux et avec ceux des souches isolées par l'ANSES de Ploufragan dans des eaux de rivières du même département (22) et provenant de différentes sources : humaines, bovines, porcines et volaille.

En conclusion, la recherche de ces bactéries dans ces échantillons environnementaux permettra, dans les conditions de l'étude, 1) d'identifier les bactéries présentes dans les coquillages, 2) d'identifier les espèces de coquillages les plus susceptibles d'être contaminés par ces bactéries et 3) les conditions « favorables » à la présence de ces bactéries dans les

coquillages *i.e* les usages au niveau des bassins versants, les conditions météorologiques, la période de l'année ...

Cette étude permettra également de sélectionner des souches bactériennes d'intérêt de l'environnement. Ces souches seront comparées à des souches cliniques et à des souches isolées dans les aliments dans le cadre d'autres études par nos partenaires scientifiques. La recherche de ces souches dans l'environnement présente un réel intérêt, au vu de la possible émergence ou ré-émergence de souches pathogènes, comme cela a été observée lors des toxi-infections liés aux graines germées et à la souche *E. coli* O104:H4 en 2011.

Sur ces souches issues de l'environnement, des études plus approfondies seront également réalisées. Elles porteront sur l'évaluation de la survie de ces souches dans les eaux environnementales et dans les coquillages, puis, pour les souches persistant dans les coquillages, à évaluer leur localisation au sein du coquillage et leur fixation éventuelle à des tissus qui pourrait ainsi leur permettre de persister plus longtemps.

Evaluation de la persistance des bactéries entériques en microcosmes

Des expériences d'évaluation de la survie de ces bactéries, similaires à celles testées pour les marqueurs *Bacteroidales* seront réalisées en prenant en considération différents facteurs biotiques et abiotiques.

Les cinétiques de contamination et de décontamination de différents types de coquillages en bactéries potentiellement pathogènes seront étudiées. En effet, la présence et la survie de bactéries entériques dans les coquillages semble dépendre du type de coquillage (contamination plus fréquente des coquillages fousseurs que des non fousseurs ; Amouroux et Bizarro, 2011) et des bactéries étudiées (survie de *Salmonella* Newport plus longue que celle de *E. coli* dans les huîtres ; Morrison *et al.*, 2011). La survie des bactéries potentiellement pathogènes sera comparée à celle des indicateurs *E. coli* et entérocoques.

Les bactéries cultivables et viables ainsi que l'ensemble des bactéries seront suivies au cours du temps. La persistance de ces bactéries pourra être suivie respectivement par méthode culturale, par PCR en temps réel couplée au PMA (Propidium monoazide) qui met en évidence les bactéries viables et par PCR en temps réel qui met en évidence les bactéries viables et mortes. Des essais seront réalisés au préalable pour vérifier si les méthodes de PCR en temps réel et PCR couplée au PMA sont applicables aux bactéries étudiées et à nos conditions opératoires.

Les expériences en microcosmes porteront dans un premier temps sur l'évaluation de la survie des *E. coli* pathogènes et en particulier des STEC dans les eaux marines et coquillages. Ce travail se fera dans le cadre de la thèse de C. Balière (2012-2015). Il permettra d'évaluer, d'une part, si les STEC et autres *E. coli* pathogènes survivent de la même façon que l'indicateur *E. coli* et, d'autre part, si ces souches conservent leurs facteurs de virulence, codés par des gènes portés sur des bactériophages ou des plasmides, dans les eaux marines et les coquillages.

Il apparaît important d'évaluer si la survie de souches pathogènes appartenant à l'espèce *E. coli* est similaire à celle de souches non pathogènes. Des survies variables de souches *E. coli* isolées dans l'environnement et placées en eau estuarienne à 10°C ont été

observés dans l'étude de Berthe *et al.*, en 2012. Les souches *E. coli* résistantes à plusieurs antibiotiques et possédant plusieurs gènes de virulence survivaient, pour la plupart d'entre elles, moins longtemps que les souches commensales, appartenant au groupe B1. Au contraire, dans une autre étude, il a été mis en évidence récemment que des souches STEC étaient plus résistantes à la prédation par les protistes que des souches non STEC (donc sans gènes *stx*) dans des microcosmes d'eaux douces (Mauro *et al.*, 2013).

Cette évaluation portera sur les sérotypes hautement pathogènes : *E. coli* 0157, 026, 0103, 0111, 0145 et sur les sérotypes également isolés dans l'étude présentée précédemment ; ceci sera possible dans le cadre d'une collaboration avec l'équipe AgroSupVet de Lyon qui dispose d'un laboratoire de sécurité PIII. La survie de ces souches sera comparée à celles de l'indicateur *E. coli*.

Des essais similaires seront également envisagés sur les *Campylobacter* qui ont été fréquemment isolés dans les eaux et les coquillages de l'étude présentée ci-dessus.

Etude de la localisation des bactéries entériques dans les coquillages

Selon les résultats de survie et de persistance des souches dans les coquillages, la localisation des bactéries, pathogènes ou indicatrices de la contamination fécale, au sein du coquillage et la fixation éventuelle des bactéries aux tissus digestifs ou à d'autres tissus de coquillages seront étudiées.

Depuis plusieurs années, il a été démontré que l'organe cible pour la concentration des virus entériques humains est le tissu digestif, ces tissus représentant environ 90 % de la concentration en particules virales. Concernant les norovirus, la mise en évidence de ligand spécifique pour les souches de génogroupe I a été liée à une concentration plus efficace et plus rapide de ces souches en comparaison des souches de génogroupe II (Maalouf *et al.*, 2010-2011 ; Le Guyader *et al.*, 2012a).

En utilisant la méthode d'immuno-histochimie, Morisson *et al.*, en 2012, ont montré que des salmonelles (souche *Salmonella* Newport) se retrouvaient également dans les tissus digestifs d'huîtres, lors de contaminations en microcosmes, puis dans les cellules des tissus conjonctifs profonds. Ce mécanisme de contamination des huîtres par les salmonelles ne ferait pas intervenir le système de sécrétion de type III (Morrison *et al.*, 2012). Il est également à noter que les salmonelles se fixent sur des cellules humaines et reconnaissent également des glycanes d'une façon similaire aux norovirus (Chessa *et al.*, 2009).

Il serait intéressant d'utiliser cette méthode d'immuno-histochimie, appliquée en routine sur les pathogènes impliqués dans les phénomènes de mortalité des huîtres par le Laboratoire de Génétique et Pathologie des Mollusques Marins (LGPMM, La Tremblade, Unité SG2M) et également sur les norovirus dans les coquillages au Laboratoire de Microbiologie (LSEM, équipe Virologie) sur une sélection de bactéries.

L'application de cette méthode pourrait permettre de mieux comprendre le devenir des bactéries entériques dans les coquillages.

3.2 Les développements méthodologiques

Afin d'atteindre ces objectifs scientifiques, il est indispensable de poursuivre les développements méthodologiques concernant la recherche des bactéries dans l'environnement réalisés ces dernières années au Laboratoire de Micorbiologie à l'Ifremer.

Les analyses réalisées sur ces thématiques se feront dans le cadre d'une démarche de recherche de qualité des résultats, initiée au laboratoire pour les différents microorganismes recherchés depuis quelques années. Dans le cadre des activités du laboratoire, les appareils et matériels seront contrôlés pour permettre d'obtenir des résultats fiables. Les analyses seront réalisées à partir de protocoles optimisés et des procédures claires seront rédigées pour permettre d'obtenir des résultats comparables par les différentes personnes que je serai amenée à encadrer.

3.2.1 Concentration des échantillons et sélection des tissus de coquillages

Un des développements méthodologiques concerne l'optimisation de la concentration des marqueurs et des bactéries à partir des eaux en appliquant des protocoles adaptés à de plus grands volumes d'eau seront testés, tout en évitant de concentrer en même temps les inhibiteurs de PCR. Des méthodes telles que l'ultrafiltration pourront être testées en collaboration avec le National Institute for Health and Welfare (Finlande) (Mull and Hill, 2012).

En ce qui concerne les coquillages, différents essais seront réalisés pour évaluer quels sont les tissus ou parties de coquillages les plus adaptés pour une détection des bactéries et des marqueurs dans les coquillages. Différentes espèces de coquillages, huîtres, moules ou coques, seront analysés et la présence de ces bactéries ou marqueurs sera évaluée, après dissection des coquillages, dans différents tissus : tissus digestifs, branchies, manteau, liquides intervalvaires

3.2.2 Optimisation des protocoles d'extraction des acides nucléiques

Une des étapes cruciales pour la détection des bactéries dans l'environnement concerne l'extraction des ADN. Nous testerons et comparerons différents kits d'extraction des ADN pour sélectionner les plus adaptés à l'analyse d'échantillons de l'environnement, ceux permettant de diminuer les inhibiteurs de PCR et de mieux prendre en compte les faibles concentrations de ces bactéries. Des kits utilisés par certains laboratoires de l'étude SIPP d'évaluation des méthodes TSM qui ont conduit à de meilleurs résultats (plus fortes concentrations du marqueur Pig2Bac, par exemple) que ceux que nous avons utilisés au laboratoire seront privilégiés.

Un des développements méthodologiques qui me semble primordial à réaliser sur les marqueurs de l'origine de la contamination fécale et les bactéries, lors d'une recherche par méthode de PCR directe, concerne la prise en compte de l'efficacité de l'extraction des ADN bactériens. Selon la nature de l'échantillon d'eau analysé, plus ou moins turbide, le rendement de l'extraction des acides nucléiques bactériens peut varier de façon importante. Si l'utilisation de contrôle d'extraction, addition de Mengovirus avant l'extraction des ARN viraux, est réalisé couramment pour la détection des norovirus dans les coquillages (Le Guyader *et al.*,

2009), l'efficacité d'extraction des ADN bactériens n'est que très rarement prise en compte. Or, l'application de ces marqueurs sur des eaux de turbidité variable peut conduire à une efficacité variable ou moindre de l'extraction des ADN bactériens et donc des résultats variables avec ces marqueurs. Une possibilité consisterait à ajouter des bactéries dans les eaux avant l'étape de filtration ; ces bactéries seraient des bactéries absentes dans l'environnement ou marquées par un composé fluorescent (Stoeckel *et al.*, 2009 ; Harwood and Stoeckel, 2011).

3.2.3 Optimisation des systèmes PCR

Des nouveaux kits de PCR plus sensibles et permettant de limiter l'influence des inhibiteurs de PCR seront testés au laboratoire afin d'obtenir de meilleures efficacités de nos systèmes. De nouvelles amorces et sondes seront dessinées et testées au laboratoire afin de permettre de disposer de nouveaux marqueurs, d'optimiser l'identification des bactéries. A titre d'exemple, les PCR espèces *Campylobacter* utilisées au laboratoire (Wang *et al.*, 2002) dont les protocoles avaient été adaptés pour une recherche en PCR SYBR Green, n'ont pas permis d'identifier à l'espèce la totalité des *Campylobacter* isolés dans les coquillages.

3.2.4 Nouvelles méthodes

Etant toujours confrontés à des microorganismes en faible quantité dans l'environnement, nous suivrons les développements des autres méthodes qui pourraient permettre des résultats plus sensibles. Nous pouvons ainsi citer les méthodes de PCR en temps réel à haut débit (Fluidigm corporation) et la Droplet Digital PCR (BioRad).

Une autre approche intéressante sera de rechercher les ARN 16S des bactéries et non seulement les ADN après une extraction globale des ADN et ARN, méthode développée par T. Pitkänen lors de son post-doctorat à l'US EPA en 2012-2013. Les résultats obtenus pour *E. coli*, *Campylobacter* et un marqueur *Bacteroidales* associé à l'Homme montrent que ces bactéries sont plus fréquemment mises en évidence dans les eaux analysées quand leur détection repose sur les ARN 16S plutôt que sur les ADNr 16S (Pitkänen *et al.*, sous presse).

3.3 Les collaborations

Dans le cadre du projet Interreg IVA RiskManche (2012-2015), des travaux seront réalisés en collaboration avec nos partenaires sur les marqueurs de l'origine de la contamination fécale et la recherche des bactéries entériques pathogènes. Ces travaux seront complétés par d'autres réalisés avec des partenaires extérieurs à ce projet.

La recherche, la caractérisation et l'évaluation de la persistance des STEC dans les eaux et coquillages seront réalisées dans le cadre de la thèse de Charlotte Balière (2012-2015).

Collaborations nationales

- *Université de Caen* : A. Rincé, Cl. Balière, J.C. Giard et Q. Bruey ; sélection avec l'Ifremer des protocoles de détection des bactéries et marqueurs *Bacteroidales* communs ; réalisation des profils phylogénétiques, de résistance aux antibiotiques et de recherche des gènes de virulence des souches *E. coli* isolées.

- *CNRS Géosciences de Rennes* : E. Jardé, L. Jeanneau et L. Harrault : méthodes basées sur les stanols fécaux.
- *Anses, Ploufragan* : M. Denis, B. Chidaine ; accueil, formation et mise à disposition du matériel pour les profils PFGE et comparaison de souches de *Campylobacter*
- *Hopital Robert Debré, Paris, laboratoire associé au CNR des E. coli et Shigella* : P. Mariani-Kurkdjian ; accueil de C. Balière pour la réalisation des profils PFGE pour les souches STEC, mise à disposition des données et souches cliniques
- *AgroVet Sup de Lyon* : D. Thevenot et E. Loukiadis ; isolement de souches STEC à partir d'échantillons collectés sur nos sites d'étude ; accueil et collaboration lors des essais en microcosmes avec les souches hautement pathogènes

Collaborations européennes ou internationales

- *Université de Brighton* : H. Taylor (coord. du projet RiskManche), J. Ebdon et S. Purnel ; organisation d'essais comparatifs des méthodes TSM en aveugle sur des eaux et coquillages ; méthodes basées sur les bactériophages de *Bacteroides*
- *Cefas, Weymouth* : C. Baker-Austin et D. Dancer ; méthodes basées sur les ADN mitochondriaux et les norovirus humains
- *Environment Agency, Exceter* : J. Porter ; méthodes basées sur les marqueurs *Bacteroidales*, les ADN mitochondriaux et le type des *E. coli*
- *Institut Gabriel Liepman, Luxembourg* : C. Penny ; développement de la méthode de migration passive des *Campylobacter* et séquençage du gène *porA* pour typer les *Campylobacter* ; comparaison des souches isolées dans les eaux.
- *National Institute for Health and Welfare* : T. Pitaken, Finlande : recherche de la présence de bactéries pathogènes par d'autres protocoles reposant sur les ARNr 16S
- *US EPA, Cincinnati* : J. Santo Domingo et H. Ryu ; identification de nouveaux marqueurs et méthodes TSM
- *Environment Canada, Burlington* : Tom Edge ; discussions sur les protocoles de recherche des bactéries pathogènes, comparaison des souches isolées au niveau des zones conchylicoles et mise à disposition d'une puce à ADN *E. coli*.

Conclusion

Les études que nous allons réaliser dans les prochaines années au Laboratoire de Microbiologie (Laboratoire SEM, depuis janvier 2013) à l'Ifremer sur les thématiques Traceurs de Sources Microbiennes et recherche des bactéries entériques potentiellement pathogènes pour l'Homme permettront une meilleure compréhension de la présence des bactéries entériques, indicatrices de contamination fécale ou potentiellement pathogènes pour l'Homme, dans l'environnement littoral. Elles apporteront également des éléments pour mieux évaluer le risque pour la santé humaine qui peut résulter.

A partir de l'exemple des trois zones conchylicoles et de leurs bassins versants, la présence de ces bactéries sera mise en relation avec celle d'autres microorganismes (virus entériques et *Vibrio*), avec des données sur les usages au niveau des zones concernées, avec les paramètres physico-chimiques et des données météorologiques. Nous essaierons de réaliser des prélèvements dans les conditions les plus diverses possibles pour couvrir les différents scénarii possibles.

Nous disposerons à la suite de ce travail de protocoles validés permettant de rechercher les bactéries telles que les salmonelles, les *Campylobacter* et les *E. coli* pathogènes dans les coquillages, qui seront utilisés dans le cadre de nos missions de LNR coquillages.

Les développements concernant les traceurs de sources microbiennes seront utiles à la coordination du réseau REMI qui deviendra une activité du laboratoire SEM en début 2014. Ces méthodes pourront être, par exemple, appliqués sur les nouvelles zones conchylicoles puis plus généralement sur l'ensemble des zones pour permettre d'identifier les sources potentielles de contamination fécale pouvant impacter les coquillages. Le transfert de ces méthodes à des laboratoires d'analyses des eaux, initié dans le cadre du projet Marquopoleau, sera poursuivi pour permettre de répondre à la demande des Laboratoires Environnement Ressources (LER) de l'Ifremer. En effet, en raison de l'effectif restreint du laboratoire SEM, nous ne pouvons pas réaliser ces analyses en routine pour des demandes extérieures au laboratoire.

Je poursuivrai une veille scientifique sur les thématiques TSM et les bactéries entériques potentiellement pathogènes dont les bactéries émergentes ou ré-émergentes. Les développements méthodologiques seront poursuivis en concertation avec les autres personnes du laboratoire impliquées sur la recherche de *Vibrio* ou de virus entériques qui sont confrontées aux mêmes problèmes analytiques.

Je poursuivrai le travail de développements et d'analyses avec les techniciens du laboratoire sur ces thématiques ainsi que lors de l'encadrement d'étudiants en thèse et en masters de recherche. Les collaborations au niveau national et international seront maintenues ou renforcées à travers des programmes de recherche et des échanges.

Enfin, je continuerai à présenter nos résultats à la communauté scientifique lors de colloques internationaux mais également au public, aux gestionnaires des eaux et aux collectivités dans le cadre de réunions et colloques ou d'articles de vulgarisation scientifique. Ainsi, j'organiserai avec d'autres membres du laboratoire SEM, un colloque sur les avancées concernant les TSM et la présence des microorganismes pathogènes dans l'environnement, ceci d'une façon similaire au colloque que nous avons organisé en 2010 au centre de Brest de l'Ifremer.

Références bibliographiques

- Adiba S., Nizak C., van Baalen M., Denamur E., Depaulis F., 2010. From grazing resistance to pathogenesis: the coincidental evolution of virulence factors. *PLoS One*, 5(8).
- AEE, 2013. Agence Européenne de l'Environnement, Qualité des eaux de baignade européennes en 2012. N°4, 28 p.
- AFSSA, 2003. Bilan des connaissances relatives aux *Escherichia coli* producteurs de Shiga-toxines (STEC). Coord. C. Vernozzy-Rozand, S. Roze. 220 p.
- AFSSA, 2008. Avis de l'Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments relatif aux souches d'*Escherichia coli* productrices de shiga-toxines considérées comme pathogènes pour l'homme. Avis AFSSA du 15 juillet 2008, N° 2008-SA-022, 14 p. Disponible à http://www.steakexpert.fr/IMG/pdf/N2008-SA-0122_AVIS_E_coli_STEC_N1.pdf.
- AFSSA, 2010. Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments. Avis du 27 mai 2010 relatif à la pertinence d'une révision de la définition des STEC pathogènes, précisée par l'avis AFSSA du 15 juillet 2008. N°2010-SA-0031, 19 p. Disponible <http://www.anses.fr/Documents/MIC2010sa0031.pdf>.
- Albinger O., 1993. Relationship between number of saprophytic and faecal coliform bacteria and particle size of river sediment. *Arch Hydrobiol (Suppl.)*, 101, 23-34.
- Alzieu C., Andral B., Bassoulet P., Gourmelon M., Le Quillec R., L'Yavanc J., Quiniou F., 1999. Biodragages : protocole de suivi de l'efficacité et de l'impact potentiel. Rapport Ifremer RST/DEL/99.11/Sète, 37 p.
- Alzieu C., Quiniou F., Erard-Le Denn E., Le Grand J., Gourmelon M., Pommepuy M., Le Magueresse A., Cyberouest, Delesmont R., Derrien A., Forget J., Le Cann P., Casanova C., 2001. Géodrisk - Logiciel d'évaluation des risques liés à l'immersion des boues de dragage des ports maritimes. Cd-rom. ISBN 2-84433-049-5. CD 01 01.
- Amagliani G., Brandi G., Schiavano G.F., 2012. Incidence and role of *Salmonella* in seafood safety. *Food Res Int*, 45, 780-788.
- Amouroux I., Bizzozero L., 2011. Bilan national REMI 2010 - Edition 2011. Rapport Ifremer, 73 p.
- Anon., 2001. ISO 16654 Microbiology of food and animal feeding stuffs - Horizontal method for the detection of *Escherichia coli* O157. ISO, 13 p.
- Auer M.T. and Niehaus S.L., 1993. Modeling fecal coliform bacteria -I. Field and laboratory determination of loss kinetics. *Water Res*, 27, 693-701.
- Bae S. and Wuertz S., 2009a. Discrimination of viable and dead fecal *Bacteroidales* bacteria by quantitative PCR with propidium monoazide. *Appl Environ Microbiol*, 75, 2940-2944.
- Bae S. and Wuertz S., 2009b. Rapid decay of host-specific fecal *Bacteroidales* cells in seawater as measured by quantitative PCR with propidium monoazide. *Water Res*, 43, 4850-4859.

- Baker-Austin C., Rangdale R., Lowther J., Lees D.N., 2010. Application of mitochondrial DNA analysis for microbial source tracking purposes in shellfish harvesting waters. *Water Sci Technol*, 61, 1-7.
- Ballesté E. and Blanch A.R., 2010. Persistence of *Bacteroides* species populations in a river as measured by molecular and culture techniques. *Appl Environ Microbiol*, 76, 7608-7616.
- Barcina I., Gonzalez J. M., Iriberry J., Egea L., 1991. Role of protozoa in the regulation of enteric bacteria populations in seawater. *Mar Microbiol Food Webs*, 5, 179-187.
- Beekwilder J., Nieuwenhuizen R., Havelaar A.H., Van Duin J., 1996. An oligonucleotide hybridization assay for the identification and enumeration of F-specific RNA phages in surface water. *J Appl Bacteriol*, 80, 179-186.
- Bell A., Layton A.C., McKay L., Williams D., Gentry R., Sayler G.S., 2009. Factors influencing the persistence of fecal *Bacteroides* in stream water. *J Environ Qual*, 38, 1224-1232.
- Bellair J.T., Parr-Smith G.A., Wallis I.G., 1977. Significance of diurnal variations in fecal coliform die-off rates in the design of ocean outfalls. *Journal WPCF*, 2022-2030.
- Bernhard A.E. and Field K.G., 2000a. Identification of nonpoint sources of fecal pollution in coastal waters by using host-specific 16S ribosomal DNA genetic markers from fecal anaerobes. *Appl Environ Microbiol*, 66, 1587-1594.
- Bernhard A.E. and Field K.G., 2000b. A PCR assay to discriminate human and ruminant feces on the basis of host differences in *Bacteroides-Prevotella* genes encoding 16S rRNA. *Appl Environ Microbiol*, 66, 4571-4574.
- Berthe T., Ratajczak M., Clermont O., Denamur E., Petit F., 2013. Evidence for coexistence of distinct *Escherichia coli* populations in various aquatic environments and their survival in estuary water. *Appl Environ Microbiol*, 79, 4684-4693.
- Bielaszewska M., Mellmann A., Zhang W., Köck R., Fruth A., Bauwens A., Peters G., Karch H., 2011. Characterisation of the *Escherichia coli* strain associated with an outbreak of haemolytic uraemic syndrome in Germany, 2011: a microbiological study. *Lancet Infect Dis*, 11, 671-676.
- Blanch A.R., Belanche-Munoz L., Bonjoch X., Ebdon J., Gantzer C., Lucena F., Ottoson J., Kourtis C., Iversen A., Kuhn I., Moce L., Muniesa M., Schwartzbrod J., Skrabber S., Papageorgiou G., Taylor H.D., Wallis J., Jofre J., 2004. Tracking the origin of faecal pollution in surface water: an ongoing project within the European Union research programme. *J Water Health*, 2, 249-60.
- Blanch A.R., Belanche-Munoz L., Bonjoch X., Ebdon J., Gantzer C., Lucena F., Ottoson J., Kourtis C., Iversen A., Kuhn I., Moce L., Muniesa M., Schwartzbrod J., Skrabber S., Papageorgiou G., Taylor H.D., Wallis J., Jofre J., 2006. Integrated analysis of established and novel microbial and chemical methods for microbial source tracking. *Appl Environ Microbiol*, 72, 5915-5926.
- 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 Res*, 47, 6812-6828.
- Bougeard M., Le Saux J.C., Jouan M., Durand G., Pommepuy M., 2010. Modeling and evaluation of compliance to water quality regulations in bathing areas on the Daoulas catchment and estuary (France). *Water Sci Technol*, 61, 2521-2530.

- Brandt S.M., King N., Cornelius A.J., Premaratne A., Besser T.E., On S.L., 2011. Molecular risk assessment and epidemiological typing of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* by using a novel PCR binary typing system. *Appl Environ Microbiol*, 77, 2458-2470.
- Brugère H., Auvray F., Mariani-Kurdjian P., King L.A., Loukiadis E., 2012. *E. coli* producteurs de shigatoxines (STEC) : définitions, virulence et propriétés des souches entérohémorragiques (EHEC). *BEH Hors-série*, 9 mai 2012, 20-25.
- Burkhardt W. and Calci K., 2000. Selective accumulation may account for shellfish-associated viral illness. *Appl Environ Microbiol*, 66, 1375-1378.
- Brüggemann R. and Halfon E., 1997. Comparative analysis of nearshore contaminated sites in lake Ontario: ranking for environmental hazard. *J Environ Sci Health*, A32, 277-292.
- Caldwell J.M., Raley M.E., Levine J.F., 2007. Mitochondrial multiplex real-time PCR as a source tracking method in fecal-contaminated effluents. *Environ Sci Technol*, 41, 3277-3283.
- Caldwell J.M. and Levine J.F., 2009. Domestic wastewater influent profiling using mitochondrial real-time PCR for source tracking animal contamination. *J Microbiol Methods*, 77, 17-22.
- Campos C.J., Acornley R., Morgan O.C., Kershaw S., 2013. Trends in the levels of *Escherichia coli* in commercially harvested bivalve shellfish from England and Wales, 1999-2008. *Mar Pollut Bull*, 67, 223-227.
- Cappelier J.M., Minet J., Magras C., Colwell R.R., Federighi M., 1999. Recovery in embryonated eggs of viable but nonculturable *Campylobacter jejuni* cells and maintenance of ability to adhere to HeLa cells after resuscitation. *Appl Environ Microbiol*, 65, 5154-5157.
- Caprais M.P., Le Mennec C., Pommepeuy M., Le Saux J.C., Gourmelon M., 2009. Potential of F-specific RNA specific bacteriophages to discriminate sources of faecal pollution in French shellfish. Proceedings of the seventh international conference on molluscan shellfish safety. Nantes, 14-19 June 2009. 326-332.
- Caprais M.P., Le Mennec C., Lozach S., Marin C., Gourmelon M., 2010. Evaluation of library-independent microbial source tracking methods to identify seabird faecal contamination of the coastal environment in France. The Water Research Conference, Lisbonne, Avril 2010.
- Caprioli A., Morabito S., Brugère H., Oswald E., 2005. Enterohaemorrhagic *Escherichia coli*: emerging issues on virulence and modes of transmission. *Vet Res*, 36, 289-311.
- Chalmers R.M., Aird H., Bolton F.J., 2000. Waterborne *Escherichia coli* O157. *J Appl Microbiol*, 88, 124S-132S.
- Chandran A. and Mazumder A., 2013. Prevalence of diarrhea-associated virulence genes and genetic diversity in *Escherichia coli* isolates from fecal material of various animal hosts. *Appl Environ Microbiol*, 79, 7371-7380.
- Chessa D., Winter M.G., Jakomin M., Bäumer A.J., 2009. *Salmonella enterica* Typhimurium Std fimbriae bind terminal a (1,2)fucose residues in the cecal mucosa. *Mol Microbiol*, 71, 864-875.
- Chick H., 1908. An investigation into the laws of disinfection. *J Hyg*, 8, 92-158.

- Clermont O., Olier M., Hoede C., Diancourt L., Brisse S., Keroudean M., Glodt J., Picard B., Oswald E., Denamur E., 2011. Animal and human pathogenic *Escherichia coli* strains share common genetic backgrounds. *Infect Genet Evol*, 11, 654-662.
- Cole D., Long S.C., Sobsey M.D., 2003. Evaluation of F+ RNA and DNA coliphages as source-specific indicators of fecal contamination in surface waters. *Appl Environ Microbiol*, 69, 6507-6514.
- Coutard F., Pommepuy M., Loaec S., Hervio-Heath D., 2005. mRNA detection by reverse transcription-PCR for monitoring viability and potential virulence in a pathogenic strain of *Vibrio parahaemolyticus* in viable but nonculturable state. *J Appl Microbiol*, 98, 951-61.
- Cox P., Griffith M., Angles M., Deere D., Ferguson C., 2005. Concentrations of pathogens and indicators in animal feces in the Sydney watershed. *Appl Environ Microbiol*, 71, 5929-5934.
- Craig D.L., Fallowfield H.J., Cromar N.J., 2002. Enumeration of faecal coliforms from recreational coastal sites: evaluation of techniques for the separation of bacteria from sediments. *J Appl Microbiol*, 93, 557-565.
- Crane S.R. and Moore J.A., 1986. Modeling enteric bacterial die-off: a review. *Water Air Soil Poll*, 27, 411-439.
- Crenn I., Gourmelon M., Le Cann P., Ménard D., Le Guyader F., Derrien A., Pommepuy M., 1999. Microbiologie sanitaire des sédiments. In: *Dragages et environnement marin. Etat des connaissances*. Edited by Alzieu C., Ifremer Publisher, Brest, 37-56.
- Croxen M.A., Law R.J., Scholz R., Keeney K.M., Wlodarska M., Finlay B.B., 2013. Recent advantages in understanding enteric pathogenic *Escherichia coli*. *Clin Microbiol Rev*, 26, 822-879.
- Crowther J., Kay D., Wyer M. D., 2002. Faecal-indicator concentrations in waters draining lowland pastoral catchments in the UK: relationships with land use and farming practices. *Water Res*, 36, 1725-1734.
- DebRoy C., Roberts E., Fratamico P.M., 2011. Detection of O antigens in *Escherichia coli*. *Anim Health Res Rev*, 12, 169-185.
- Denamur E., 2011. The 2011 Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O104:H4 german outbreak: a lesson in genomic plasticity. *Clin Microbiol Infect*, 17, 1124-1125.
- DePaola A., Jones J.L., Woods J., Burkhardt W 3rd., Calci K.R., Krantz J. A, Bowers J.C., Kasturi K., Byars R.H., Jacobs E., Williams-Hill D., Nabe K., 2010. Bacterial and viral pathogens in live oysters: 2007 United States market survey. *Appl Environ Microbiol*, 76, 2754-2768.
- Derolez V., Soudant D., Fiandrino A., Cesmat L., Serais O., 2013. Impact of weather conditions on *Escherichia coli* accumulation in oysters of the Thau lagoon (the Mediterranean, France). *J Appl Microbiol*, 114, 516-525.
- Derrien M., Jarde E., Gruau G., Pierson-Wickmann A.C., 2011. Extreme variability of steroid profiles in cow feces and pig slurries at the regional scale: implications for the use of steroids to specify fecal pollution sources in waters. *J Agric Food Chem*, 59, 7294-7302.
- Derrien M., Jardé E., Gruau G., Pourcher A.M., Gourmelon M., Jadas-Hécart A., Pierson-Wickmann A.C., 2012. Origin of fecal contamination in waters from contrasted areas: stanols as Microbial Source Tracking markers. *Water Res*, 46, 4009-4016.

- Devane M.L., Robson B., Nourozi F., Scholes P., Gilpin B.J., 2007. A PCR marker for detection in surface waters of faecal pollution derived from ducks. *Water Res*, 41, 3553-3560.
- Dick L.K. and Field K.G., 2004. Rapid estimation of numbers of fecal *Bacteroidetes* by use of a quantitative PCR assay for 16S rRNA genes. *Appl Environ Microbiol*, 70, 5695-5697.
- Dick L.K., Bernhard A.E., Brodeur T.J., Santo Domingo J.W., Simpson J.M., Walters S.P., Field K.G., 2005. Host distribution of uncultivated fecal *Bacteroidales* bacteria reveal genetic markers for fecal source identification. *Appl Environ Microbiol*, 71, 3184-3191.
- Dombek P.E., Johnson L.K., Zimmerley S.T., Sadowsky M.J., 2000. Use of repetitive DNA sequences and the PCR to differentiate *Escherichia coli* isolates from human and animal sources. *Appl Environ Microbiol*, 66, 2572-2577.
- Dorai-Raja S., O' Gradyb J., Collerana E., 2009. Specificity and sensitivity evaluation of novel and existing *Bacteroidales* and Bifidobacteria-specific PCR assays on feces and sewage samples and their application for microbial source tracking in Ireland. *Water Res*, 43, 4980-4988.
- Dumke R., Schröter-Bobsin U., Jacobs E., Röske I., 2006. Detection of phages carrying the Shiga toxin 1 and 2 genes in waste water and river water samples. *Lett Appl Microbiol*, 42, 48-53.
- Dupray E., Derrien A., Pichon R., 1995. Osmoregulation by trehalose synthesis in *Salmonella manhattan* after exposure to waste waters. *Lett Appl Microbiol*, 20, 148-151.
- Dupray E., Caprais M.P., Derrien A., Monfort P., Conventant A., Penot J., Fach P., Dilasser F., Pérelle S., Grout J., Federighi M., Jugiau F., Rama F., 1999. Flux bactériens et qualité sanitaire des coquillages en baie de la Fresnaye. In : *Pollutions diffuses : du bassin versant au littoral*, Editions Ifremer, 169-178.
- Dutka B.J., Walsh K., Kwan K.K., El Shaarawi A., Liu D.L., Thompson K., 1986. Priority site selection for degraded areas based on microbial and toxicant screening tests. *Water Poll Res J Canada*, 21, 267-282.
- Ebentier D., Hanley K., Cao Y., Bradgey B., Boehm A., Ervin J., Goodwin K., Gourmelon M., Griffith J., Holden P., Kelty C.A., Lozach S., McGee C., Peed L., Raith M., Sadowsky M.J., Scott E., Santo Domingo J., Sinigalliano C., Shanks O., Van De Werfhost L.C., Wang D., Wuertz S., Jay J., 2013. Evaluation of the repeatability and reproducibility of a suite of PCR-based microbial source tracking methods. *Water Res*, 47, 6839-6848.
- Edge T.A. and Schaefer K.A., 2006. Le dépistage des sources de pollution microbienne dans les écosystèmes aquatiques : état de la science et évaluation des besoins. Institut national de recherche sur les eaux, Burlington (Ontario). 26 pages.
- EFSA (European Food Safety Authority), ECDC (European Centre for Disease Prevention and Control), 2013. The European Union Summary Report on Trends and Sources of Zoonoses, Zoonotic Agents and Food-borne Outbreaks in 2011; *EFSA Journal* 2013;11(4):3129, 250 p.
- Ervin J.S., Russell T.L., Layton B.A., Yamahara K.M., Wang D., Sassoubre L.M., Cao Y., Kelty C.A., Sivaganesan M., Boehm A.B., Holden PA, Weisberg S.B., Shanks O.C., 2013. Characterization of fecal concentrations in human and other animal sources by physical, culture-based, and quantitative real-time PCR methods. *Water Res*, 47, 6873-6882.
- Farrokh C., Jordan K., Auvray F., Glass K., Oppegaard H., Raynaud S., Thevenot D., Condrón R., De Reu K., Govaris A., Heggum K., Heyndrickx M., Hummerjohann J., Lindsay D., Miszczycza S.,

- Moussiegt S., Verstraete K., Cerf O., 2013. Review of Shiga-toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) and their significance in dairy production. *Int J Food Microbiol*, 162, 190-212.
- Feachem R., 1975. An improved role for faecal coliform to faecal streptococci ratios in the differentiation between human and nonhuman pollution sources. *Water Res*, 9, 689-690.
- Federighi M., Pilet M.F., Woodward D.L., Capelier J.M., Minet J., Johnson W.M., Jouve J.L., 1997. Isolation of *Campylobacter jejuni* from retail trade oysters (*Crassostrea gigas*). *Microbiologie Aliments Nutrition*, 15, 41-45.
- Fiandrino A., Martin Y., Got P., Bonnefont J.L., Troussellier M., 2003. Bacterial contamination of Mediterranean coastal seawater as affected by riverine inputs: simulation approach applied to a shellfish breeding area (Thau lagoon, France). *Water Res*, 37, 1711-1722.
- Fiksdal L., Maki J.S., La Croix S.J., Staley J.T., 1985. Survival and detection of *Bacteroides* spp., prospective indicator bacteria. *Appl Environ Microbiol*, 49, 148-150.
- Fogarty L.R., Haack S.K., Wolcott M.J., Whitman R.L., 2003. Abundance and characteristics of the recreational water quality indicator bacteria *Escherichia coli* and enterococci in gull faeces. *J App Microbiol*, 94, 865-878.
- Fremaux B., Boa T., Yost C.K., 2010. Quantitative real-time PCR assays for sensitive detection of Canada goose-specific fecal pollution in water sources. *Appl Environ Microbiol*, 76, 4886-4889.
- 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). *Techniques Sciences et Méthodes*, 4, 38-48.
- Gavini F., Pourcher A.M., Neut C., Monget D., Romond C., Oger C., Izard D., 1991. Phenotypic differentiation of Bifidobacteria of human and animal origins. *Int J Syst Bacteriol*, 41, 548-557
- Gawler A.H., Beecher J.E., Brandao J., Carroll N., Falcao L., Gourmelon M., Masterson B., Nunes B., Porter J., Rincé A., Rodrigues R., Thorp M., Walters J.M., Meijer W.G., 2007. Validation of host-specific *Bacteroidales* 16S rRNA genes as markers to determine the origin of faecal pollution in Atlantic Rim countries of the European Union. *Water Res*, 41, 3780-3784.
- Geldreich E. E., 1978. Bacterial populations and indicator concepts in faeces, sewage, stormwater and solid wastes. In: *Indicators of Viruses in Water and Food*. Edited by Berg, G Ann Arbor Science, Ann Arbor, 51-97.
- Gerba C.P. and Smith J.E., 2005. Sources of pathogenic microorganisms and their fate during land application of wastes. *J Environ Qual*, 34, 42-48.
- Glassmeyer S.T., Furlong E.T., Kolpin D.W., Cahill J.D., Zaugg S.D., Werner S.L., Meyer M.T., Kryak D.D., 2005. Transport of chemical and microbial compounds from known wastewater discharges: Potential for use as indicators of human fecal contamination. *Environ Sci Technol*, 39, 5157-5169.
- Gould L.H., Bopp C., Strockbine N., Atkinson R., Baselski V., Body B., Carey R., Crandall C., Hurd S., Kaplan R., Neill M., Shea S., Somsell P., Tobin-D'Angelo M., Griffin P.M., Gerner-Smidt P., 2009. Recommendations for diagnosis of Shiga-toxin-producing *Escherichia coli* infections by clinical laboratories. *MMWR Recommend Rep*, 58, 1-14.
- Gourmelon M., Cillard J., Pommepuy M., 1994. Visible light damage on *Escherichia coli* in seawater: oxidative stress hypothesis. *J Appl Microbiol*, 77, 105-112.

- Gourmelon M., 1995. Etude de la lumière visible comme facteur limitant de la survie d'*Escherichia coli* en milieu marin. Thèse de doctorat de l' Université de Rennes I, 1995. 144 p.
- Gourmelon M., Touati D., Pommepuy M., Cormier M., 1997. Survival of *Escherichia coli* exposed to visible light in seawater: analysis of *rpoS*-dependent effects. *Can J Microbiol*, 43, 1036-1043.
- Gourmelon M., Ménard D., Derrien A., Crenn I., Caprais M.P., Le Comte A., Pommepuy M., Le Cann P., 1999. Evaluation de la contamination microbienne des sédiments superficiels du bassin d'Arc (port autonome de Marseille) et du golfe de Fos prélevés le 29 juin 1999. Rapport Ifremer, 16 p.
- Gourmelon M., Le Saux J.C., Bassoulet P., Erard E., Le Cann P., L'Yavanc J., Boutier B., Michel P., Quiniou F., Alzieu C., 2002a. Land disposal of contaminated dredged-sediments: a solution for the safety of oyster-producing areas. Congrès ISEAC - Plymouth 18-20/06/2002, poster.
- Gourmelon M., Derrien A., Crenn I., Loaëc S., 2002b. Dénombrement des coliformes thermotolérants ou des *Escherichia coli* dans des sédiments côtiers vaseux. Rapport Ifremer RST DEL/MP/MIC/02.02/Brest, 72 p.
- Gourmelon M., Crenn I., Derrien A., Dupray E., Pommepuy M., 2002c. A wastewater survey into the adaptation of *Escherichia coli* to marine stresses. 10th International Congress of Bacteriology and Applied Microbiology, Paris, 27 juillet - 01 août 2002, poster.
- Gourmelon M., Le Saux J.C., Bassoulet P., Erard-Le Denn E., Le Cann P., L'Yavanc J., Boutier B., Michel P., Quiniou F., Alzieu C. 2003a. Suivi des apports en contaminants des dépôts à terre. In: Bioévaluation de la qualité environnementale des sédiments portuaires et des zones d'immersion. Edited by Alzieu C., Ifremer Publisher, Brest, 216-242.
- Gourmelon M., Montet M.P., Loaec S., Le Menec C., Hervio-Heath D., Pommepuy M., Bouvet J., Vernozy-Rozand C., 2003b. Determination of an adapted protocol to detect verotoxin-producing *Escherichia coli* (VTEC) and *E. coli* O157:H7 in shellfish collected from coastal environment. 5th International Symposium on "Shiga Toxin (Verotoxigenic)- producing *Escherichia coli* infections", 8-11 Juin 2003, Edimbourg, UK, poster.
- Gourmelon M., 2006. Recherche des *Escherichia coli* producteurs de Shiga-toxines (STEC) dans l'environnement marin (coquillages). Rapport de thèse pour le diplôme d'état de docteur en pharmacie. Université de Rennes I, 67 p.
- Gourmelon M., Montet M.P., Lozach S., Le Menec C., Pommepuy M., Beutin L., and Vernozy-Rozand C., 2006. First isolation of Shiga toxin 1d producing *Escherichia coli* variant strains in shellfish from coastal areas in France. *J Appl Microbiol*, 100, 85-97.
- Gourmelon M., Caprais M.P., Ségura R., Le Menec C., Lozach S., Piriou J.Y., Rincé A., 2007. Evaluation of two library-independent microbial source tracking methods to identify sources of fecal contamination in French estuaries. *Appl Environ Microbiol*, 7, 4857-4866.
- Gourmelon M., Caprais M.P., Mieszkin S., Marti R., Wéry N., Jardé E., Derrien M., Jadas-Hécart A., Communal P.Y., Jaffrezic A, Pourcher A.M., 2010a. Development of microbial and chemical MST tools to identify the origin of the faecal pollution in bathing and shellfish harvesting waters in France. *Water Res*, 44, 4812-4824.
- Gourmelon M., Caprais M.P., Le Menec C., Mieszkin S., Ponthoreau C., Gendronneau M., 2010b. Application of library-independent Microbial Source Tracking methods for identifying the sources of fecal contamination in coastal areas. *Water Sci Technol*, 61, 1401-1409.

- Gourmelon M., Lazure P., Hervio-Heath D., Le Saux J.C., Caprais M.P., Le Guyader F., Catherine M., Pommepuy M., 2010c. Microbial modelling in coastal environment and early warning system, useful tools to limit shellfish microbial contamination. Chap. 16. In: Water Quality Management and shellfish safety. WHO., Edited by Rees G., Pond K., Kay D., Bartram J., Santo Domingo J., IWA Publishing, London, UK, 297-318.
- Gourmelon M., Caprais M.P., Kay D., Stapleton C., 2010d. Techniques de dépistage des sources de pollution microbienne. TSM, 4, 54-64.
- Gourmelon M., Pourcher A.M., Caprais M.P., Soleski O., Jardé E., Jeanneau L., Jadas-Hécart A., Communal P.Y., Chesnot T., Algros E., Melikechi H., Durand G., 2013. Couplage de marqueurs microbiologiques et chimiques pour la détection de l'origine de la pollution organique des eaux. Rapport final du projet Marquopoleau, 134 p.
- Griffith J.F., Weisberg S.B., McGee C.D., 2003. Evaluation of microbial source tracking methods using mixed fecal sources in aqueous test samples. J Water Health, 1, 141-151.
- Grimes D.J., 1980. Bacteriological water quality effects of hydraulically dredging contaminated upper Mississippi river bottom sediment. Appl Environ Microbiol, 39, 782-789.
- Grimes D.J., 1982. Bacteriological water quality effects of clamshell dredging. J Freshwater Ecol, 1, 407-419.
- Guillaud J.F., Derrien A., Gourmelon M., Pommepuy M., 1997. T90 as a tool for engineers: interest and limits. Water Sci Technol, 35, 277-281.
- Guyon R., Dorey F., Collobert J.F., Foret J., Goubert C., Mariau V., Malas J.P., 2000. Detection of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O157 in shellfish (*Crassostrea gigas*). Sciences Des Aliments, 20, 457-465.
- Hancock D., Besser T., Lejeune J., Davis M., Rice D., 2001. The control of VTEC in the animal reservoir. Int J Food Microbiol, 66, 71-78.
- Hartel P.G., Summer J.D., Hill J.L., Collins J.V., Entry J.A., Segars W.I., 2002. Geographic variability of *Escherichia coli* ribotypes from animals in Idaho and Georgia. J Environ Qual, 31, 1273-1278.
- Harwood V.J., Whitlock J., Withington V., 2000. Classification of antibiotic resistance patterns of indicator bacteria by discriminant analysis: Use in predicting the source of fecal contamination in subtropical waters. Appl Environ Microbiol, 66, 3698-3704.
- Harwood V.J. and Stoeckel D.M., 2011. Performance criteria. In Microbial Source Tracking: methods, applications and case studies. Edited by C. Hagedorn, A. Blanch and V. J. Harwood, Springer Science+Business Media, London, UK, 7-30.
- Harwood V.J., Boehm A.B., Sassoubre L.M., Vijayavel K., Stewart J.R., Fong T.T., Caprais M.P., Converse R.R., Diston D., Ebdon J., Fuhrman J.A., Gourmelon M., Gentry-Shields J., Griffith J.F., Kashian D.R., Noble R.T., Taylor H., Wicki M., 2013. Performance of viruses and bacteriophages for fecal source determination in a multi-laboratory, comparative study Water Res, 47, 6929-6943.
- Hervio-Heath D., Gourmelon M., Martial C., 2011. Contamination des coquillages par des bactéries pathogènes. DCSMM / SRM MMN, 1-9; /SRM MC 1-6; /SRM GDG, 1-8; /SRM MO, 1-7.
- Hold G.L., Pryde S.E., Russell V.J., Furrrie E., Flint H.J., 2002. Assessment of microbial diversity in human colonic samples by 16S rDNA sequence analysis. FEMS Microbiol Ecol, 39, 33-39.

- Ibekwe A.M., Murinda S.E., Graves A.K., 2011. Genetic diversity and antimicrobial resistance of *Escherichia coli* from human and animal sources uncovers multiple resistances from human sources. PLoS One, 6, e20819.
- Imamovic L., Ballesté E., Jofre J., Muniesa M., 2010. Quantification of Shiga toxin-converting bacteriophages in wastewater and in fecal samples by real-time quantitative PCR. Appl Environ Microbiol, 76, 5693-56701.
- Irvine K.N. and Pettibone G.W., 1993. Dynamics of indicator bacteria populations in sediment and river water near a combined sewer outfall. Environ Technol, 14, 531-542.
- Iwamoto M., Ayers T., Mahon B.E., Swerdlow D.L., 2010. Epidemiology of seafood-associated infections in the United States. Clin Microbiol Rev, 23, 399-411.
- Jaffrezic A., Jardé E., Pourcher A.M., Gourmelon M., Caprais M.P., Heddadj D., Cottinet P., Bilal M., Derrien M., Marti R., Mieszkina S., 2011. Microbial and chemical markers. Runoff transfert in pig and cow manure amended soils. J Environ Qual, 40, 959-968.
- Jardé E., Gruau G., Mansuy-Huault L., 2007a. Detection of manure-derived organic compounds in rivers draining agricultural areas of intensive manure spreading. Appl Geochem, 22, 1814-1824.
- Jardé E., Gruau G., Mansuy-Huault L., Peu P. and Martinez J., 2007b. 5b-Cholestanol/C27-sterol to monitor pig slurry in amended soils. Water Air Soil Poll, 178, 169-178.
- Jeanneau L., Solecki O., Wéry N., Jardé E., Gourmelon M., Communal P.Y., Jadas-Hécart A., Caprais M.P., Gruau G., Pourcher A.M., 2012. Relative decay of fecal indicator bacteria and human-associated markers: a microcosm study simulating wastewater input into seawater and freshwater. Environ Sci Technol, 46, 2375-2382.
- Jones K. and Obiri-Danso K., 1999. Non-compliance of beaches with the EU directives of bathing water quality: evidence of non-point sources of pollution in Morecambe Bay. J Appl Microbiol, Symposium Supplement, 85, 101S-107S.
- Kay D., Stapleton C.M., Wyer M.D., McDonald A.T., Crowther J., Paul N., Jones K., Francis C., Watkins J., Wilkinson J., 2005. Decay of intestinal enterococci concentrations in high-energy estuarine and coastal waters: towards real-time T90 values for modelling faecal indicators in recreational waters. Water Res, 39, 655-667.
- Kildare B.J., Leutenegger C.M., McSwain B.S., Bambic D.G., Rajal V.B., Wuertz S., 2007. 16S rRNA-based assays for quantitative detection of universal, human-, cow-, and dog-specific fecal *Bacteroidales*: a Bayesian approach. Water Res, 41, 3701-3715.
- King L.A., Nogareda F., Weill F.X., Mariani-Kurkdjian P., Loukiadis E., Gault G., Jourdan-DaSilva N., Bingen E., Macé M., Thevenot D., Ong N., Castor C., Noël H., Van Cauteren D., Charron M., Vaillant V., Aldabe B., Goulet V., Delmas G., Couturier E., Le Strat Y., Combe C., Delmas Y., Terrier F., Vendrely B., Rolland P., de Valk H., 2012. Outbreak of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O104:H4 associated with organic fenugreek sprouts, France, June 2011. Clin Infect Dis, 54, 1588-1594.
- Koopmans M. and Duizer E., 2004. Foodborne viruses: an emerging problem. Int J Food Microbiol, 90, 23-41.
- Kosek M., Bern C., Guerrant R.L., 2003. The global burden of diarrhoeal diseases as estimated from studies published between 1992 and 2000. Bull World Health Organ, 81, 197-204.

- Kreader C.A., 1998. Persistence of PCR-detectable *Bacteroides distasonis* from human feces in river water. *Appl Environ Microbiol*, 64, 4103-4105.
- Kumar H.S., Otta S., Karunasagar I., 2001. Detection of Shiga-toxigenic *Escherichia coli* (STEC) in fresh seafood and meat marketed in Mangalore, India by PCR. *Lett Appl Microbiol*, 33, 334-338.
- Kumar H.S., Karunasagar I., Karunasagar I., Teizou T., Shima K., Yamasaki S., 2004. Characterisation of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) isolated from seafood and beef. *FEMS Microbiol Lett*, 233, 173-178.
- Lamendella R., Domingo J.W.S., Kelty C., Oerther D.B. 2008. Bifidobacteria in feces and environmental waters. *Appl Environ Microbiol*, 74, 575-584
- Lange R. and Hengge-Aronis R., 1991. Identification of a central regulator of stationary-phase gene expression in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol*, 5, 49-59.
- Lawson P.A., Collins M.D., Falsen E., Foster G., 2006. *Catelicoccus marimammalium* gen. nov., sp. nov., a novel Gram-positive, catalase-negative, coccus shaped bacterium from porpoise and grey seal. *Int J Syst Evol Microbiol*, 56, 429-432.
- Layton A., McKay L., Williams D., Garrett V., Gentry R., Sayler G., 2006. Development of *Bacteroides* 16S rRNA gene TaqMan-based real-time PCR assays for estimation of total, human, and bovine fecal pollution in water. *Appl Environ Microbiol*, 72, 4214-4224.
- Layton B.A., Cao Y., Ebentier D.L., Hanley K., Ballesté E, Brandão J., Byappanahalli M., Converse R., Farnleitner A.H., Gentry-Shields J., Gildey M.I., Gourmelon M., Lee C.S., Lee J., Lozach S., Madi T., Meijer W.G., Noble R., Peed L., Stewart J., Van De Werfhost L.C., Wang D., Whitman R., Wuertz S., Jay J., Holden P., Reischer G.H., Rodrigues R., Rose J.B., Schriewer A., Sinigalliano C., Boehm A.B., Shanks O., Griffith J.F., 2013. Performance of human fecal anaerobe-associated PCR-based assays in a multi-laboratory method evaluation study. *Water Res*, 47, 6897-6908.
- Lee R. and Murray L., 2010. Components of microbiological monitoring programmes. Chap. 6. In: *Water Quality Management and shellfish safety*. WHO., Edited by Rees G., Pond K., Kay D., Bartram J., Santo Domingo J., IWA Publishing, London, UK., 91-108.
- Le Guyader F.S., Parnaudeau S., Schaeffer J., Bosch A., Loisy F., Pommepuy M., Atmar R.L., 2009. Detection and quantification of noroviruses in shellfish. *Appl Environ Microbiol*, 75, 618-624.
- Le Guyader F.S., Atmar R.L., Le Pendu J., 2012a. Transmission of viruses through shellfish: when specific ligands come into play. *Curr Opin Virol*, 2, 103-110.
- Le Guyader F.S., Ollivier J., Le Saux J.C., Haugarreau L., Pommepuy M., 2012b. Les Norovirus humains et animaux. Intérêt pour la discrimination de l'origine de la contamination dans les eaux et les coquillages. *TSM*, 3, 36-42.
- LeJeune J.T., Besser T.E., Hancock D.D., 2001. Cattle water troughs as reservoirs of *Escherichia coli* O157. *Appl Environ Microbiol*, 67, 3053-3057.
- Ley V., Higgins J., Fayer R., 2002. Bovine enteroviruses as indicators of fecal contamination. *Appl Environ Microbiol*, 68, 3455-3461.
- Loewen P.C., Hu B., Strutinsky J., Sparling R., 1998. Regulation in the *rpoS* regulon of *Escherichia coli*. *Can J Microbiol*, 44, 707-717.

- Loukiadis E., Callon H., Mazuy-Cruchaudet C., Vallet V., Bidaud C., Ferré F., Giuliani L., Bouteiller L., Pihier N., Danan C., 2012. Surveillance des *E. coli* producteurs de shigatoxines (STEC) dans les denrées alimentaires en France (2005-2011). Bulletin épidémiologique, santé animale et alimentation, 5, 3-9.
- Love D.G., Lovelace G.L., Sobsey M.D., 2010. Removal of *Escherichia coli*, *Enterococcus faecalis*, coliphage MS2, poliovirus, and hepatitis A virus from oysters (*Crassostrea virginica*) and hard shell clams (*Mercinaria mercinaria*) by depuration. Int J Food Microbiol, 143, 211-217.
- Lu J., Santo Domingo J.W., Lamendella R., Edge T., Hill S., 2008. Phylogenetic diversity and molecular detection of bacteria in gull feces. Appl Environ Microbiol, 74, 3969-3976.
- Lu J., Ryu H., Hill S., Schoen M., Ashbolt N., Edge T.A., Domingo J.S., 2011. Distribution and potential significance of a gull fecal marker in urban coastal and riverine areas of southern Ontario, Canada. Water Res, 45, 3960-3968.
- Ludwing W., Euzéby J., Whitman W.B., 2008. Draft taxonomic outline of the *Bacteroidetes*, *Planctomycetes*, *Chlamydiae*, *Spirochaetes*, *Fibrobacteres*, *Fusobacteria*, *Acidobacteria*, *Verrucomicrobia*, *Dictyoglomi* and *Gemmatimonadetes*. In: Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, 2nd edn, vol. 4. Edited by N. R. Krieg, J.T. Staley, B. Hedlund, B.J. Paster, N. Ward, W. Ludwig & W.B. Whitman. New York: Springer.
- Lukjancenko O., Wassenaar T.M., Ussery D.W., 2010. Comparison of 61 sequenced *Escherichia coli* genomes. Microbiol Ecol, 60, 708-720.
- Luna G.M., Vignaroli C., Rinaldi C., Pusceddu A., Nicoletti L., Gabellini M., Danovaro R., Biavasco F., 2010. Extra intestinal *Escherichia coli* carrying virulence genes in coastal marine sediments. Appl Environ Microbiol, 76, 5659-5668.
- Luo C., Walk S.T., Gordon D.M., Feldgarden M., Tiedje J.M., Konstantinidis K.T., 2011. Genome sequencing of environmental *Escherichia coli* expands understanding of the ecology and speciation of the model bacterial species. Proc Natl Acad Sci U S A, 108, 7200-7205.
- Ma J., Ibekwe A.M., Yang C.H., Crowley D.E., 2013. Influence of bacterial communities based on 454-pyrosequencing on the survival of *Escherichia coli* O157:H7 in soils. FEMS Microbiol Ecol, 84, 542-554.
- Maalouf H., Zakhour M., Le Pendu J., Le Saux J.C., Atmar R.L., Le Guyader F.S., 2010. Distribution in tissue and seasonal variation of norovirus genogroup I and II ligands in oysters. Appl Environ Microbiol, 76, 5621-5630.
- Maalouf H., Schaeffer J., Parnaudeau S., Le Pendu J., Atmar R.L., Crawford S.E., Le Guyader F.S., 2011. Strain-dependent norovirus bioaccumulation in oysters. Appl Environ Microbiol, 77, 3189-3196.
- MacRae M., Strachan N.J.C., Jacklin M., Ogden I.D., 2003. Methods to isolate and incidence of *Escherichia coli* O157 in UK Shellfish. Présentation affichée, 5th International Symposium on Shiga toxin-producing *E. coli* infections, congrès VTEC, Edinburgh.
- Mara DD. and Oragui JL., 1983. Sorbitol-fermenting bifidobacteria as specific indicators of human faecal pollution. J Appl Bacteriol, 55, 349-357.
- Mariani-Kurdjian P. et Bigen E., 2012. *Escherichia coli* O104:H4 : un pathotype hybride. Archives de Pédiatrie ;19, S97-S100.

- Martellini A., Payment P., Villemur R., 2005. Use of eukaryotic mitochondrial DNA to differentiate human, bovine, porcine and ovine sources in fecally contaminated surface water. *Water Res*, 39, 541-548.
- Marti R., Dabert P., Pourcher A.M., 2009. Pig manure contamination marker selection based on the influence of biological treatment on the dominant fecal microbial groups. *Appl Environ Microbiol*, 75, 4967-4974.
- Marti R., Dabert P., Ziebal C., Pourcher A.M., 2010. Evaluation of *Lactobacillus sobrius/L. amylovorus* as a new microbial marker of pig manure. *Appl Environ Microbiol*, 76, 1456-1461.
- Marti R.*, Mieszkin S.*, Pourcher A.M., Hervio-Heath D., Gourmelon M., 2011. Effect of oxygen and temperature on the persistence of pig-specific genetic markers and on the dynamics of dominant pig manure bacterial populations in river water microcosms. *J Appl Microbiol*, 111, 1159-1175.
- Marti R., Gannon V.P., Jokinen C., Lanthier M., Lapen D.R., Neumann N.F., Ruecker N.J., Scott A., Wilkes G., Zhang Y., Topp E., 2013. Quantitative multi-year elucidation of fecal sources of waterborne pathogen contamination in the South Nation River basin using *Bacteroidales* microbial source tracking markers. *Water Res*, 47, 2315-2324.
- Martin Y., Troussellier M., Bonnefont J.L., 1998. Adaptative responses of *E. coli* to marine environmental stresses: a modelling approach based on viability and dormancy concepts. *Oceanol. Acta*, 21, 957-954.
- Martinez-Manzanares E., Morinigo M.A., Castro D., Balebona M.C., Sanchez J.M., Borrego J.J., 1992. Influence of the fecal pollution of marine sediments on the microbial content of shellfish. *Mar Pollut Bull*, 24, 342-349.
- Mauffret A., 2012. Evaluation du risque sanitaire microbiologique lié au dragage et à l'immersion de sédiments marins. Synthèse bibliographique et recommandations. Rapport pour GEODE, 33 p.
- Mauffret A., Caprais M.P., Gourmelon M., 2012. Relevance of *Bacteroidales* and F-specific RNA bacteriophages for efficient tracing of fecal contamination at catchment level. *Appl Environ Microbiol*, 78, 5143-5152.
- Mauffret A., Mieszkin S., Morizur M., Alfansiah Y., Lozach S., Gourmelon M., 2013. Recent innovation in microbial source tracking using bacterial real-time PCR markers in shellfish. *Mar Poll Bull*, 68, 21-29.
- Mauro S.A., Opalko H., Lindsay K., Colon M.P., Koudelka G.B., 2013. The microcosm mediates the persistence of shiga toxin-producing *Escherichia coli* in freshwater ecosystems. *Appl Environ Microbiol*, 79, 4821-4828.
- McCann M.P., Kidwell M.P., Matin A., 1991. The putative sigma factor KatF has a central role in development of starvation-mediated general resistance in *Escherichia coli*. *J Bacteriol*, 173, 4188-4194.
- Mieszkin S., Furet J.P., Corthier G., Gourmelon M., 2009a. Estimation of pig fecal contamination in river catchment by real-time PCR using two pig-specific *Bacteroidales* 16S rRNA genetic markers. *Appl Environ Microbiol*, 75, 3045-3054.
- Mieszkin S., Furet J.P., Corthier G., Pommepuy M., Le Saux J.C., Bougeard M., Hervio-Heath D. et Gourmelon M., 2009b. Discrimination between human, pig and ruminant faecal contaminations in a

- river catchment by real-time PCR using host-specific markers. Proceedings of the seventh International Conference on Molluscan Shellfish Safety (ICMSS). Nantes, 14-19 juin 2009, 340-349.
- 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 de l'Université de Bretagne Occidentale, 336 p.
- Mieszkin S., Yala, J.F., Joubrel R., Gourmelon M., 2010. Phylogenetic analysis of *Bacteroidales* 16S rRNA gene sequences from human and animal effluents and assessment of ruminant faecal pollution by real-time PCR. J Appl Microbiol, 108, 974-984.
- Mieszkin S., Caprais M.P, Le Mennec C., Le Goff M., Edge T., Gourmelon M., 2013. Identification of the origin of fecal contamination in shellfish and environmental waters from a French estuary using *Bacteroidales* markers and F-specific RNA bacteriophages. J Appl Microbiol, 115, 897-907.
- Mora A., López C., Dhahi G., López-Beceiro A.M., Fidalgo L.E., Díaz E. A., Martínez-Carrasco C., Mamani R., Herrera A., Blanco J.E., Blanco M., Blanco J., 2012. Seropathotypes, phylogroups, Stx Subtypes, and intimin types of wildlife-carried, Shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains with the same characteristics as human-pathogenic isolates. Appl Environ Microbiol, 78, 2578-2585.
- Morrison C.M., Armstrong A.E., Evans S., Mild R.M., 2011. Survival of *Salmonella* in oysters. Int J Food Microbiol, 148, 93-98.
- Morrison C.M., Dial S.M., Day W.A., Joens L.A., 2012. Investigations of *Salmonella enterica* serovar Newport infections of oysters by using immunohistochemistry and knockout mutagenesis. Appl Environ Microbiol, 78, 2867-2873.
- Mull B. and Hill V.R., 2012. Recovery of diverse microbes in high turbidity surface water samples using dead-end ultrafiltration. J Microbiol Methods, 91, 429-433.
- Muniesa M., Lucena F., Jofre J., 1999. Comparative survival of free Shiga toxin 2-encoding phages and *Escherichia coli* strains outside the gut. Appl Environ Microbiol, 65, 5615-5618.
- Muniesa M. and Jofre J., 2000. Occurrence of phages infecting *Escherichia coli* O157:H7 carrying the *stx 2* gene in sewage from different countries. FEMS Microbiol Lett, 183, 197-200.
- Munro P.M., Clément R.L., Flatau G.N., Gauthier M.J., 1994. Effect of thermal, oxidative, acidic, osmotic, or nutritional stresses on subsequent culturability of *Escherichia coli* in seawater. Microb Ecol, 27, 57-63.
- Munro P.M., Flatau G.N., Clément R.L., Gauthier M.J., 1995. Influence of the RpoS (KatF) sigma factor on maintenance of viability and culturability of *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium* in seawater. Appl Environ Microbiol, 61, 1853-1858.
- Obiri-Danso K., Jones K., 2000. Intertidal sediments as reservoirs for hippurate negative campylobacters, salmonellae and faecal indicators in three EU recognised bathing waters in north west england. Water Res, 34, 519-527.
- Ogorzaly L. and Gantzer C., 2006. Development of real-time RT-PCR methods for specific detection of F-specific RNA bacteriophage genogroups: application to urban raw wastewater. J Virol Methods, 138, 131-139.
- Ogorzaly L., Tissier A., Bertrand I., Maul A., Gantzer C., 2009. Relationship between F-specific RNA phage genogroups, faecal pollution indicators and human adenoviruses in river water. Water Res, 43, 1257-1264.

- Okabe S. and Shimazu Y., 2007. Persistence of host-specific *Bacteroides-Prevotella* 16S rRNA genetic markers in environmental waters: effects of temperature and salinity. *Appl Microbiol Biotechnol*, 76, 935-944.
- Oladeinde A., Bohrmann T., Wong K., Purucker S.T., Bradshaw K., Brown R., Snyder B., Molina M., 2014. Decay of fecal indicator bacterial populations and bovine-associated source-tracking markers in freshly deposited cow pats. *Appl Environ Microbiol*, 80, 110-118.
- Parveen S., Portier K.M., Robinson K., Edmiston L., Tamplin M.L., 1999. Discriminant analysis of ribotype profiles of *Escherichia coli* for differentiating human and nonhuman sources of fecal pollution. *Appl Environ Microbiol*, 65, 3142-3147.
- Paton J. C. and Paton A. W., 1998. Pathogenesis and diagnosis of Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* Infections. *Clin Microbiol Rev*, 11, 450-479.
- Pitkänen T., Ruy H., Elk M., Hokajarvi A.M., Siponen S., Vepsalainen A., Rasanen P., Santo Domingo J.W., in press. Detection of fecal bacteria and source tracking identifiers in environmental waters using rRNA-based RT-qPCR and rDNA-based qPCR Assays. *Environ Sci Technol*.
- Pina S., Puig M., Lucena F., Jofre J., Girones R., 1998. Viral pollution in the environment and in shellfish: human adenovirus detection by PCR as an index of human viruses. *Appl Environ Microbiol*, 64, 3376-3382.
- Pommepuy M., Guillaud J.F., Le Guyader F., Dupray E., Cormier M., 1990. Le devenir de la charge bactériologique des sédiments dragués. In: Actes du séminaire international sur les aspects environnementaux liés aux activités de dragage. Nantes, 27 novembre 1989-1^{er} décembre 1989, 65-78.
- Pommepuy M., Guillaud J.F., Dupray E., Derrien A., Le Guyader F., 1992. Enteric bacterial survival factors. *Water Sci Technol*, 25, 93-103.
- Pommepuy M., Butin M., Derrien A., Gourmelon M., Colwell R.R., Cormier M., 1996a. Retention of enteropathogenicity by viable but nonculturable *Escherichia coli* exposed to seawater and sunlight. *Appl Environ Microbiol*, 62, 4621-4626.
- Pommepuy M., Derrien A., Le Guyader F., Ménard D., Caprais M.P., Dubois E., Dupray E., Gourmelon M., 1996b. Microbial water quality on a Caribbean island (Martinique). In *Small islands: marine science and sustainable development, coastal and estuarine studies*. Edited by G.A. Maule, American Geophysical Union, Washington, D.C., USA, 284-297.
- Pommepuy M., Hervio-Heath D., Caprais M.P., Gourmelon M., Le Saux J.C., Le Guyader S., 2005. Fecal contamination in coastal areas: An engineering approach. In: *Oceans and health pathogens in the marine environment*, Edited by Belkin S., Colwell R.R., Springer, New York, USA, 331-359.
- Pommepuy M., Dupied S., Bougeard M., Le Saux J.C., Le Mennec C., Gueguen M., Stanisière J.Y., Le Guyader F., 2011. Etude des cinétiques de contamination et de décontamination de *Crassostrea gigas* en *Escherichia coli*). Rapport interne Ifremer. 35 p.
- Pourcher A.M., Devriese L.A., Hernandez J.F., Delattre J.M., 1991. Enumeration by a miniaturized method of *Escherichia coli*, *Streptococcus bovis* and *Enterococci* as indicators of the origin of fecal pollution of waters. *J Appl Bacteriol*, 70, 525-530.
- Pourcher A.M., Solecki O., Jardé E., Jeanneau J., Jadas-Hécart A., Caprais M.P., Durand G., Gourmelon M., 2013. Des micro-organismes et des composés chimiques pour identifier les sources de

contamination fécale : étude de la persistance en microcosmes et de leur présence dans les eaux à l'échelle d'un bassin versant. *Sciences Eaux Territoires*, 9, 92-97.

Powell S.M., Chapman C.C., Bermudes M., Tamplin M.L., 2013. Dynamics of seawater bacterial communities in a shellfish hatchery. *Microbial Ecol*, 66, 245-256.

Prieur D., Mével G., Nicolas J.L., Plusquellec A., Vigneulle M., 1990. Interactions between bivalve molluscs and bacteria in the marine environment. *Oceanogr Mar Annu Rev*, 28, 277-352.

Raith M.R., Kelty C.A., Griffith J.F., Schriewer A., Wuertz S., Mieszkin S., Gourmelon M., Reischer G., Farnleitner A.H., Ervin J., Holden P., Jay J.A., Boehm A.B., Rose J.B., Meijer W.G., Sivaganesan M., Shanks O.C., 2013. Comparison of PCR-based assays for the characterization of ruminant and cattle fecal pollution. *Water Res*, 47, 6921-6928.

Rampersad F.S., Laloo S., La Borde A., Maharaj K., Sookhai L., Teelucksingh J., Reid S., McDougall L., Adesiyun A.A., 1999. Microbial quality of oysters sold in Western Trinidad and potential health risk to consumers. *Epidemiol Infect*, 123, 241-250.

Reischer G.H., Kasper D.C., Steinborn R., Mach R. L., Farnleitner A.H., 2006. Quantitative PCR method for sensitive detection of ruminant fecal pollution in freshwater and evaluation of this method in alpine karstic regions. *Appl Environ Microbiol*, 72, 5610-5614.

Reischer G.H., Kasper D.C., Steinborn R., Farnleitner A.H., Mach R. L., 2007. A quantitative real-time PCR assay for the highly sensitive and specific detection of human faecal influence in spring water from a large alpine catchment area. *Lett Appl Microbiol*, 44, 351-356.

Reischer G.H., Ebdon J.E., Bauer J.M., Schuster N., Ahmed W., Aström J., Blanch A.R., Blöschl G., Byamukama D., Coakley T., Ferguson C., Goshu G., Ko G., de Roda Husman A.M., Mushi D., Poma R., Pradhan B., Rajal V., Schade M.A., Sommer R., Taylor H., Toth E.M., Vrajmasu V., Wuertz S., Mach R.L., Farnleitner A.H., 2013. Performance characteristics of qPCR assays targeting human- and ruminant-associated *Bacteroidetes* for microbial source tracking across sixteen countries on six continents. *Environ Sci Technol*, 47, 8548-8556.

Riley L.W., Remis R.S., Helgerson S.D., Mac Gee H.B., Wells J.G., Davis B.R., Herbert R.J., Johnson L.M., Margrett N.T., Blake P.A., Cohen L.A., 1983. Hemorrhagic colitis associated with a rare *Escherichia coli* serotype. *New Engl J Med*, 308, 681-685.

Roslev P., Iversen L., Sonderbo H.L., Iversen N., Bastholm S., 2009. Uptake and persistence of human associated *Enterococcus* in the mussel *Mytilus edulis*: relevance for faecal pollution source tracking. *J Appl Microbiol*, 107, 944-953.

Roslev P., Bukh A.S., Iversen L., Sønderbo H., Iversen N., 2010. Application of mussels as biosamplers for characterization of faecal pollution in coastal recreational waters. *Water Sci Technol*, 62, 586-593.

Rozsak D.B. and Colwell R.R., 1987. Survival strategies of bacteria in the natural environment. *Microbiol Rev*, 51, 365-379.

Rozen Y. and Belkin S., 2001. Survival of enteric bacteria in seawater. *FEMS Microbiol Rev*, 25, 513-529.

Ruecker N.J., Matsune J.C., Wilkes G., Lapen D.R., Topp E., Edge T.A., Sensen C.W., Xiao L., Neumann N.F., 2012. Molecular and phylogenetic approaches for assessing sources of *Cryptosporidium* contamination in water. *Water Res*, 46, 5135-5150.

- Russo T.A. and Johnson J.R., 2003. Medical and economic impact of extraintestinal infections due to *Escherichia coli*: focus on an increasingly important endemic problem. *Microbes Infect*, 5, 449-456.
- Salomon J.C. and Pommepuy M., 1990. Mathematical model of bacterial contamination of the Morlaix estuary (France). *Water Res*, 24, 983-994.
- Salyers A.A., 1984. *Bacteroides* of the human lower intestinal tract. *Annu Rev Microbiol*, 38, 293-313.
- Samadpour M., Ongerth J.E., Liston J., Tran N., Nguyen D., Whittam T.S., Wilson R.A., Tarr P.I., 1994. Occurrence of shiga-like toxin-producing *Escherichia coli* in retail fresh seafood, beef, lamb, pork, and poultry from grocery stores in Seattle, Washington. *Appl Environ Microbiol*, 60, 1038-1040.
- Santo Domingo J.W. and Edge T.A., 2010. Identification of primary sources of faecal pollution. Chap. 5. In: *Water Quality Management and shellfish safety*. WHO. Edited by Rees G., Pond K., Kay D., Bartram J., Santo Domingo J., IWA Publishing, London, UK, 51-90.
- Savichtcheva O., Okayama N., Ito T., Okabe S., 2005. Application of a direct fluorescence-based live/dead staining combined with fluorescence *in situ* hybridization for assessment of survival rate of *Bacteroides* spp. in drinking water. *Biotechnol Bioeng*, 92, 356-363.
- Schmidt H., 2001. Shiga-toxin-converting bacteriophages. *Res Microbiol*, 152, 687-695.
- Schulz C.J. and Childers G.W., 2011. Fecal *Bacteroidales* diversity and decay in response to variations in temperature and salinity. *Appl Environ Microbiol*, 77, 2563-2572.
- Scott T.M., Rose J.B., Jenkins T.M., Farrah S.R., Lukasik J., 2002. Microbial source tracking: current methodology and future directions. *Appl Environ Microbiol*, 68, 5796-5803.
- Scott L., McGee P., Walsh C., Fanning S., Sweeney T., Blanco J., Karczmarczyk M., Earley B., Leonard N., Sheridan J.J., 2009. Detection of numerous verotoxigenic *E. coli* serotypes, with multiple antibiotic resistance from cattle faeces and soil. *Vet Microbiol*, 134, 288-293.
- Seurinck S., Defoirdt T., Verstraete W., Siciliano S.D., 2005. Detection and quantification of the human-specific HF183 *Bacteroides* 16S rRNA genetic marker with real-time PCR for assessment of human faecal pollution in freshwater. *Environ Microbiol*, 7, 249-259.
- Shanks O.C., Atikovic E., Blackwood A.D., Lu J., Noble R.T., Domingo J.S., Seifring S., Sivaganesan M., Haugland R.A., 2008. Quantitative PCR for detection and enumeration of genetic markers of bovine fecal pollution. *Appl Environ Microbiol*, 74, 745-752.
- Shanks O.C., White K., Kelty C.A., Hayes S., Sivaganesan M., Jenkins M., Varma M., Haugland R.A., 2010. Performance assessment PCR-based assays targeting *Bacteroidales* genetic markers of bovine fecal pollution. *Appl Environ Microbiol*, 76, 1359-1366.
- Shanks O.C., Kelty C.A., Archibeque S., Jenkins M., Newton R.J., McLellan S.L., Huse S.M., Sogin M.L., 2011. Community structures of fecal bacteria in cattle from different animal feeding operations. *Appl Environ Microbiol*, 77, 2992-3001.
- Shen Z., Duan C., Zhang C., Carson A., Xu D., Zheng G., 2013. Using an intervening sequence of *Faecalibacterium* 16S rDNA to identify poultry feces. *Water Res*, 47, 6415-6422.
- Shieh Y., Baric R., Woods J., Calci K., 2003. Molecular surveillance of enterovirus and norwalk-like virus in oysters relocated to a municipal-sewage-impacted gulf estuary. *Appl Environ Microbiol*, 69, 7130-7136.

- Silkie S.S. and Nelson K.L., 2009. Concentrations of host-specific and generic fecal markers measured by quantitative PCR in raw sewage and fresh animal feces. *Water Res*, 43, 4860-4871.
- Sinigalliano C.D., Ervin J., Van De Werfhorst L.C., Wang D., Wanless D., Bartkowiak J., Layton B., Raith M., Schriewer A., Badgley B., Lee C., Goodwin K.D., Lee J., Boehm A.B., Noble R., Holden P.A. Jay J., Wuertz S., Byappanahalli M., Whitman R., Sadowsky M.J., Meijer W.G., Ballesté E., Gourmelon M., Griffith J., Ryu H., Santo Domingo J.W., 2013. Multi-laboratory assessment on the performance of PCR assays targeting *Catellibacterium marimammalium* for microbial source tracking of coastal birds. *Water Res*, 47, 6883-6896.
- Sinton, L.W., Davies-Colley R.J., Bell R.G., 1994. Inactivation of enterococci and fecal coliforms from sewage and meatworks effluents in seawater chambers. *Appl Environ Microbiol*, 60, 2040-2048.
- Sokolova E., Aström J., Pettersson T.J., Bergstedt O., Hermansson M., 2012. Decay of *Bacteroidales* genetic markers in relation to traditional fecal indicators for water quality modeling of drinking water sources. *Environ Sci Technol*, 46, 892-900.
- 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 Res*, 45, 4623-4633.
- Solheim H.T., Sekse C., Urdahl A.M., Wasteson Y., Nesse L.L., 2013. Biofilm as an environment for dissemination of *stx* genes by transduction. *Appl Environ Microbiol*, 79, 896-900.
- Sonier R., Mayrand E., Boghen A.D., Ouellette M., Mallet V., 2008. Concentration of *Escherichia coli* in sediments as an indicator of the sanitary status of oyster (*Crassostrea virginica*) aquaculture sites. *J Appl Ichthyol*, 24, 678-684.
- Stewart-Pullaro J., Daugomah J., Chestnut D., Graves D., Sobsey M., Scott G., 2006. F+RNA coliphage typing for microbial source tracking in surface waters. *J Appl Microbiol*, 101, 1015-1026.
- Stewart J.R., Boehm A.B., Dubinsky E.A., Fong T.T., Goodwin K.D., Griffith J.F., Noble R.T., Shanks O.C., Vijayavel K., Weisberg S.B., 2013. Recommendations following a multi-laboratory comparison of microbial source tracking methods. *Water Res*, 47, 6829-6838.
- Stapleton C.M., Kay D., Wyer M.D., Davies C., Watkins J., Kay C., McDonald A.T., Porter J., Gawler A., 2009. Evaluating the operational utility of a *Bacteroidales* quantitative PCR-based MST approach in determining the source of faecal indicator organisms at a UK bathing water. *Water Res*, 43, 4888-4899.
- Stoeckel D.M., Mathes M.V., Hyer K.E., Hagedorn C., Kator H., Lukasik J., O'Brien T.L., Fenger T.W., Samadpour M., Strickler K.M., Wiggins B.A., 2004. Comparison of seven protocols to identify fecal contamination sources using *Escherichia coli*. *Environ Sci Technol*, 38, 6109-6117.
- Stoeckel D.M., Stelzera E.A., Dick L.K., 2009. Evaluation of two spike-and-recovery controls for assessment of extraction efficiency in microbial source tracking studies. *Water Res*, 43, 4820-4827.
- Tambalo D.D., Fremaux B., Boa T., Yost C.K., 2012. Persistence of host-associated *Bacteroidales* gene markers and their quantitative detection in an urban and agricultural mixed prairie watershed. *Water Res*, 46, 2891-2904.
- Tanji Y., Mizoguchi K., Yoichi M., Morita M., Kijima N., Kator H., Unno H., 2003. Seasonal change and fate of coliphages infected to *Escherichia coli* O157:H7 in a wastewater treatment plant. *Water Res*, 37, 1136-1142.

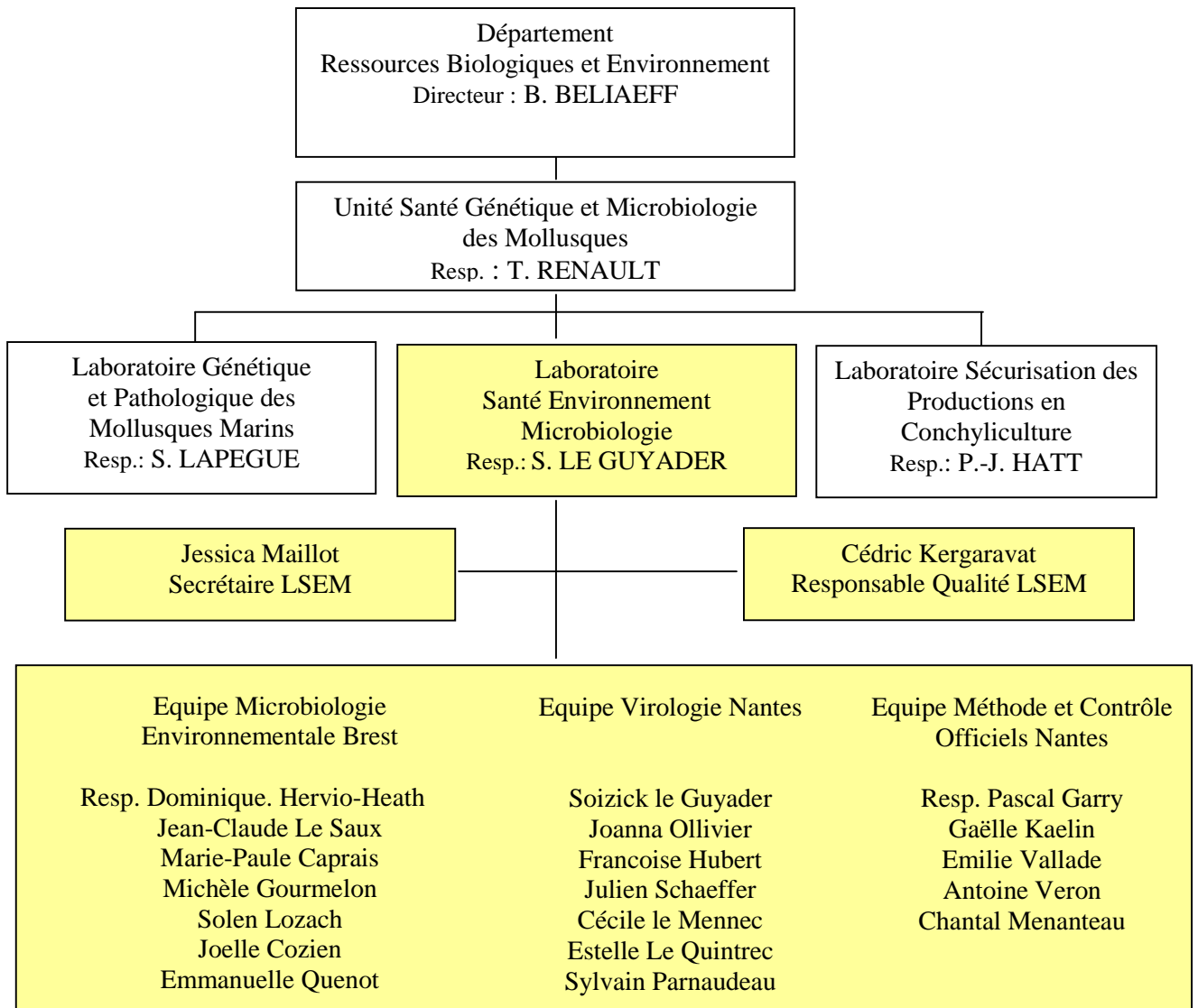
- Tenaillon O., Skurnik D., Picard B., Denamur E., 2010. The population genetics of commensal *Escherichia coli*. *Nat Rev Microbiol*, 8, 207-217.
- Touchon M., Hoede C., Tenaillon O., Barbe V., Baeriswyl S. et al., 2009. Organised genome dynamics in the *Escherichia coli* species results in highly diverse adaptive paths. *PLoS Genet* 5,1-25.
- Troussellier M., Bonnefont J.L., Courties C., Derrien A., Dupray E., Gauthier M., Gourmelon, M., Joux F., Lebaron P., Martin Y., Pommepuy M., 1998. Responses of enteric bacteria to environmental stresses in seawater. *Oceanol Acta*, 21, 965-981.
- Ufnar J.A., Ufnar D.F., Wang S.Y., Ellender R.D., 2007. Development of a swine-specific fecal pollution marker based on host differences in methanogen *mcrA* genes. *Appl Environ Microbiol*, 73, 5209-5217.
- Unno T., Jang J., Han D., Kim J.H., Sadowsky M.J., Kim O.S., Chun J., Hur H.G., 2010. Use of barcoded pyrosequencing and shared OTUs to determine sources of fecal bacteria in watersheds. *Environ Sci Technol*, 44, 7777-7782.
- U.S. Environmental Protection Agency. 2005. Microbial Source Tracking Guide Document. EPA Office of Research and Development. EPA/600/R-05/064, 133 p.
- US FDA, 2011. National Shellfish Sanitation Program: Guide for the Control of Molluscan Shellfish 2011 Revision <http://www.fda.gov/downloads/Food/GuidanceRegulation/FederalStateFoodPrograms/UCM350344.pdf>. 478 p.
- Vaillant V., Jourdan-Da Silva N., Quilici M.L., Couturier E., Le Guyader S., Delmas G., Le Saux J.C., 2012. Surveillance des risques biologiques liés à la consommation de coquillages en France. *Bulletin épidémiologique, santé animale et alimentation n°50/ Spécial Risques alimentaires microbiologiques*, 42-46.
- Vally H., Hall G., Dyda A., Raupach J., Knope K., Combs B., Desmarchelier P., 2012. Epidemiology of Shiga toxin producing *Escherichia coli* in Australia, 2000-2010. *BMC Public Health*, 12, 63. 1-12
- van Elsas J.D., Semenov A.V., Costa R., Trevors J.T., 2011. Survival of *Escherichia coli* in the environment: fundamental and public health aspects. *ISME J*, 5, 173-183.
- Vernozy-Rozand C., Feng P., Montet M.P., Ray-Gueniot S., Villard L., Bavai C., Meyrand A., Mazuy C., Atrache V., 2000. Detection of *Escherichia coli* O157:H7 in heifers' faecal samples using an automated immunoconcentration system. *Lett Appl Microbiol*, 30, 217-222.
- Vernozy-Rozand C., Montet M.P., Bertin Y., Trably F., Girardeau J.P., Martin C., Livrelli V., Beutin L., 2004. Serotyping, *stx2* subtyping, and characterisation of the locus of enterocyte effacement island of Shiga-toxin-producing *Escherichia coli* and *E. coli* O157:H7 strains isolated from the environment in France. *Appl Environ Microbiol*, 70, 2556-2559.
- Vignaroli C., Luna G.M., Rinaldi C., Di Cesare A., Danovaro R., Biavasco F., 2012. New sequence types and multidrug resistance among pathogenic *Escherichia coli* isolates from coastal marine sediments. *Appl Environ Microbiol*, 78, 3916-3922.
- Wait D.A. and Sobsey M.D., 2001. Comparative survival of enteric viruses and bacteria in Atlantic Ocean seawater. *Water Sci Technol*, 43, 139-142.
- Walters M., Piriou J.Y., Caprais M.P., Gourmelon M., Le Mennec C., Casseron R., Ségura R., Rincé A., Masterson B., Thorp M., Meijer W., Carroll N., Graham B., Fraser S., Falcao M.L., Brandao J.,

- Machado J., Nunes B., Rodrigues R., Mendonca R., Gawler A., Porter J., Bonsor R., 2006. Development of analytical tools for faecal source tracking. ICREW PA3, 130 p.
- Walters S.P., Yamahara K.M., Boehm A.B., 2009. Persistence of nucleic acid markers of health-relevant organisms in seawater microcosms: implications for their use in assessing risk in recreational waters. *Water Res*, 43, 4929-4939.
- Wang G.H., Clark C.G., Taylor T.M., Pucknell C., Barton C., Price L., Woodward D.L., Rodgers F.G., 2002. Colony multiplex PCR assay for identification and differentiation of *Campylobacter jejuni*, *C. coli*, *C. lari*, *C. upsaliensis*, and *C. fetus* subsp *fetus*. *J Clin Microbiol*, 40, 4744-4747.
- Wang L., Rothmund D., Curd H., Reeves P.R., 2003. Species-wide variation in the *Escherichia coli* flagellin (H-antigen) gene. *J Bacteriol*, 185, 2936-2943.
- Weber H., Polen T., Heuveling J., Wendisch V.F., Hengge R., 2005. Genome-wide analysis of the general stress response network in *Escherichia coli*: σ -dependent genes, promoters, and sigma factor selectivity. *J Bacteriol*, 187, 1591-1603.
- Wéry N., Monteil C., Pourcher A.M., Godon J.J., 2010. Human-specific fecal bacteria in wastewater treatment plant effluents. *Water Res*, 44, 1873-1883.
- Westrell T., Dusch V., Ethelberg S., Harris J., Hjertqvist M., *et al.*, 2010. Norovirus outbreaks linked to oyster consumption in the United Kingdom, Norway, France, Sweden and Denmark. *Euro Surveill*, 15, 1-4.
- Wetzel A.N. and Le Jeune J.T., 2007. Isolation of *Escherichia coli* O157:H7 strains that do not produce Shiga toxin from bovine, avian and environmental sources. *Lett Appl Microbiol*, 45, 504-507.
- Wiggins B., 1996. Discriminant analysis of antibiotic resistance patterns in fecal streptococci, a method to differentiate human and animal sources of fecal pollution in natural waters. *Appl Environ Microbiol*, 62, 3997-4002.
- Winfield M.D. and Groisman E.A., 2003. Role of nonhost environments in the lifestyles of *Salmonella* and *Escherichia coli*. *Appl Environ Microbiol*, 69, 3687-3694
- Wolf S., Hewitt J., Greening G.E., 2010. Viral Multiplex Quantitative PCR assays for tracking sSources of fecal contamination. *Appl Environ Microbiol*, 76, 1388-1394.
- Yamahara K.M., Sassoubre L.M., Goodwin K.D., Boehm A.B., 2012. Occurrence and persistence of bacterial pathogens and indicator organisms in beach sand along the California coast. *Appl Environ Microbiol*, 78, 1733-1744.
- Yoder J., Hlavsa M., Craun G., Hill V., Roberts V., Yu P., Hicks L., Alexander N., Calderon R., Roy S., Beach M., 2008a. Surveillance for waterborne disease and outbreaks associated with recreational water use and other aquatic facility-associated health events - United States, 2005-2006. *MMWR Surveill Summ*, 57, 1-29.
- Yoder J., Roberts V., Craun G., Hill V., Hicks L., Alexander N., Radke V., Calderon R., Hlavsa M., Beach M., Roy S., 2008b. Surveillance for waterborne disease and outbreaks associated with drinking water and water not intended for drinking - United States, 2005-2006. *MMWR Surveill Summ* 57, 39-62.

Annexes

A.1 Organigramme du Laboratoire Santé Environnement et Microbiologie (LSEM)

Personnel permanent



A.2 Liste des abréviations, sigles et acronymes

ACP	Analyse en Composante Principale
ADN	Acide désoxyribonucléique
AEE	Agence Européenne pour l'Environnement
ANR PRECODD	Agence Nationale de la Recherche Programme Ecotechnologies et Développement Durable
ARNr16S	Acide ribonucléique ribosomique 16S
ARS	Agence Régionale de la Santé
AFSSA	Agence Nationale de la Sécurité Sanitaire des Aliments
AFSSET	Agence Nationale de la Sécurité Sanitaire de l'Environnement et du Travail
ANSES	Agence Nationale de la Sécurité Sanitaire de l'Alimentation
CV	Coefficient de Variation
CE	Communauté Européenne
CEMAGREF	Centre National du Machinisme Agricole, du Génie Rural, des Eaux et des Forêts
CLI	Chairs et liquides intervalvaires
COT	Carbone Organique Total
CRISP	Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats
CTT	Coliformes thermotolérants
DAEC	<i>E. coli</i> à adhésion diffuse
DCE	Directive Cadre sur l'Eau
DCSMM	Directive Cadre Stratégie pour le Milieu Marin
DEL	Direction Environnement Littoral
DNQ	Données Non Quantifiées
EAEC	<i>E. coli</i> entéro-aggrégatives
ECDC	European Centre for Disease Prevention and Control
EFSA	Autorité Européenne de Sécurité des Aliments
EHEC	<i>E. coli</i> entéro-hémorragiques
EIEC	<i>E. coli</i> entéro-invasives
EMP/MIC	Environnement, Microbiologie et Phycotoxines / Laboratoire de Microbiologie
EPEC	<i>E. coli</i> entéro-pathogènes
ETEC	<i>E. coli</i> entéro-toxigéniques
ESIAB	Ecole supérieure d'ingénieurs en agroalimentaire de Bretagne atlantique
FEDER	Fonds Européen de Développement Economique et Régional
FISH	Hybridation <i>in situ</i> par fluorescence
FRNAPH	Bactériophages F ARN spécifiques
FUI	Fonds Unique Interministériel
GEODE	Groupe d'Etudes et d'Observation sur le Dragage et l'Environnement
HGMF	Hydrophobic Grid Membrane Filter
IFREMER	Institut Français de Recherche pour l'Exploitation de la Mer
INRA	Institut National de la Recherche Agronomique
IRSTEA	Institut de Recherche en Sciences et Technologies pour l'Environnement et l'Agriculture
ISO	International Organization for Standardization
LEE	Locus of Enterocyte Effacement
LER	Laboratoire Environnement Ressources de l'Ifremer
LGPM	Laboratoire de Génétique et Pathologie des Mollusques Marins

LSEM	Laboratoire Santé, Environnement et Microbiologie
LSPC	Laboratoire Sécurisation des Productions en Conchyliculture
MIC/LNR	Laboratoire de Microbiologie / Laboratoire National de Référence
MST	Microbial Source Tracking
NMEC	<i>E. coli</i> responsables de méningites néonatales
NPP	Nombre le Plus Probable
OTU	Operational Taxonomic Unit
PCR	Polymérase Chain Reaction
PFGE	Pulse Field Gel Electrophoresis
PMA	Propidium MonoAzide
PNEC	Programme National de l'Environnement Côtier
PRIR	Programme de Recherche d'Intérêt Régional
RBE	Département Ressources Biologiques et Environnement
REMI	Réseau de contrôle microbiologique de l'Ifremer
RT-PCR	Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction
SF	Streptocoques fécaux
SG2M	Unité Santé Génétique et Microbiologie des Mollusques
SHU	Syndrome Hémolytique et Urémique
SIPP	State of California Source Identification Pilot Project
STEC	<i>E. coli</i> producteurs de Shiga-toxines
T90	Temps nécessaire pour que 90 % des bactéries ne soient plus cultivables
TD	Tissus Digestifs
TCEP	Tri(2-chloroethyl)phosphate ;
TDCP	Tri(dichloroisopropyl)phosphate
TIAC	Toxi-infection alimentaire collective
TSM	Traceurs de Sources Microbiennes
UBO	Université de Bretagne Occidentale
UFC	Unité Formant Colonie
UPEC	<i>E. coli</i> uro-pathogènes
US EPA	United States Environmental Protection Agency
USGS	United States Geological Survey
SSCP	Single Strand Conformation Polymorphism
VNC	Viable Non Cultivable

A.3 Présentation du candidat

1 Curriculum vitae

1.1 Etat civil

Gourmelon Michèle, 46 ans

Vie maritale, 4 enfants

IFREMER

Laboratoire Santé, Environnement et Microbiologie (LSEM)

Unité SG2M, Département RBE

CS 10070

29280 Plouzané

Tel : 33 2 98 22 45 76

Email : Michele.Gourmelon@ifremer.fr

1.2 Situation professionnelle actuelle

Depuis Février 1995 : Cadre de recherche en microbiologie au centre de Brest de l'Institut Français de Recherche pour l'Exploitation de la Mer (Ifremer).

Depuis Janvier 2013, au Laboratoire Santé, Environnement et Microbiologie (LSEM), composante de l'Unité Santé, Génétique et Microbiologie des Mollusques (SG2M), dans le Département Ressources Biologiques et Environnement (RBE). Cadre de recherche 2A depuis 2009.

Responsable de la thématique sur les Traceurs de Sources Microbiennes à l'Ifremer depuis 2005.

1.3 Thématique de recherche

Travaillant sur la microbiologie sanitaire en environnement littoral principalement sur l'identification de l'origine des pollutions fécales dans l'environnement depuis 2005 et sur la recherche des bactéries entériques potentiellement pathogènes.

1.4 Formation universitaire

- Diplôme de Docteur en Pharmacie, 2006 Université de Rennes I « *Recherche des Escherichia coli producteurs de Shiga-toxines dans l'environnement marin* »

Directeur : Mr. M. Cormier, Professeur, Université de Rennes I

- Doctorat en Sciences Biologiques et Santé, Université de Rennes I, 1995

« *Etude de la lumière visible comme facteur limitant de la survie d'Escherichia coli en milieu marin* »

Directeur : Mr. M. Cormier, Professeur, Université de Rennes I. Thèse réalisée au Laboratoire de Microbiologie de la Direction de l'Environnement Littoral à l'Ifremer, centre de Brest.

Composition du jury :

Président : Mr. M. Cormier, Professeur, Université de Rennes I

Rapporteurs : Mme. I. Barcina, Professeur, Université du pays basque, Bilbao, Espagne
Mme. D. Touati, Directeur de Recherche CNRS, Institut Jacques Monod, Paris

Examineurs : Mr. P. Bourlioux, Professeur, Université de Paris XI

Mme. M. Pommepuy, Professeur associé, Université de Rennes I

Mr. M. Trousselier, Chargé de Recherche CNRS, Université de Montpellier II

- Diplôme d'Etudes Approfondies en Biologie Cellulaire et Moléculaire et Sciences de la Santé, Université de Rennes I, 1991

« *Etude de la toxicité de la lumière visible sur E. coli en eau de mer : rôle des espèces réactives de l'oxygène* »

Directeur : Mme. J. Cillard, Professeur, Université de Rennes I

- Etude de Pharmacie, Université de Rennes I, 1986-1992

1.5 Activités d'enseignements

- Faculté de Médecine, Université de Bretagne Occidentale (UBO), Brest, Master II Alimentation, Droit, Nutrition et Santé (ADSN), 1,5 h depuis 2004. Contamination microbienne du littoral et identification des sources de contamination fécale.

- UBO/Brest, Master II Recherche, Sciences, technologies, santé ; spécialité microbiologie fondamentale et appliquée, 3 h depuis 2006 - Contamination microbienne du littoral : Identification des sources de contamination fécale.

- ENSTA Paris, 3^{ème} année école d'ingénieur, 2 h 2010-2012 – Contamination microbiologique du littoral.

- Master I et II Expertise et Gestion de l'Environnement Littoral (EGEL) – IUEM, 2 décembre 2008, 2 h. La contamination microbienne du littoral et l'identification de l'origine des contaminations fécales dans l'environnement.

- BTS Anabiotech, Quimper, 2 h, 2007-2008. Contamination microbienne du littoral et les méthodes de dénombrement des microorganismes.

- Master Sciences Halieutiques et Aquacoles (SHA), Agrocampus, Rennes, 27 Janvier 2006, 3 h. Contamination microbienne en milieu marin.

- DU Médecine maritime, 2004-2005, 2 h. Contamination microbienne en milieu marin.

- Journées de formation aux modèles hydrodynamiques à l'intention des laboratoires côtiers, organisées par DEL/AO, Ifremer, Brest : Application à la microbiologie, 1 h, 2000.

1.6 Activités d'encadrements de stagiaires

Les activités de recherche que j'ai initiées m'ont amené à encadrer deux doctorants (un en cours) et un post-doctorant (Tab. 15). Par ailleurs, depuis 1998, j'ai encadré une quinzaine de

stagiaires sur des périodes de 2 à 8 mois (masters I et II, écoles d'ingénieur et IUT 2^{ème} année) dont les titres des rapports sont reportés dans le tableau 15.

Tableau 15 : Chercheurs et étudiants encadrés et titres des rapports

Chercheur / Etudiant (implication dans l'encadrement)	Formation	Période	Titres des rapports
Post-doctorat			
Aourell Mauffret (<u>Responsable scientifique</u>)	Post-doctorat sur le Projet Interreg IVA AquaManche	Avril 2010- Oct 2011	Détection et quantification de marqueurs bactériens dans l'environnement littoral et relation entre la contamination des coquillages et les apports par le bassin versant en amont.
Doctorat			
Charlotte Balière (<u>Co-directeur</u>)	Doctorat Directeur de thèse : Prof. A. Rincé EDSM, Plouzané	Oct 2012-2015 ¹	Evaluation de la présence de bactéries entériques potentiellement pathogènes dans des coquillages et détermination de leur origine.
Sophie Mieszkin (<u>Responsable scientifique</u>)	Doctorat – Directeurs de thèse : Dr. G. Corthier, UESPD, INRA Jouy en Josas Dr. D.Hervio-Heath, Ifremer EDSM, Plouzané	2007-2010 ²	Diagnostic moléculaire de l'origine des contaminations fécales dans l'environnement littoral (développement de marqueurs <i>Bacteroidales</i> spécifiques de l'hôte).
Master II Recherche			
Yustian Alfansiah ⁴	Master II « Microbiologie fondamentale et appliquée » (MFA) ; UBO, Brest	Nov 2010 – Juin 2011	Identification de l'origine de la contamination fécale dans les coquillages : recherche de marqueurs bactériens par PCR en temps réel dans des coquillages artificiellement ou naturellement contaminés.
Sophie Mieszkin	Master II Sciences de la mer et du littoral ; Mention sciences biologiques marines, UBO, IUEM, Brest	Janv – Juin 2007	Identification de l'origine humaine ou animale d'une contamination fécale de l'environnement : recherche par PCR en temps réel de marqueurs hôte-spécifiques de <i>Bacteroidetes</i> .
Jean-Fabrice Yala	Master II “ MFA ” ; UBO Brest	Nov 2005- Juin 2006	Discrimination de l'origine d'une contamination fécale de l'environnement : recherche de marqueurs de <i>Bacteroides</i> spécifiques de l'hôte.
Etudiant Bac +2 à Bac +5			
Benoit Chaumard ⁵	DUT- Option Industries Alimentaires et Biologiques, IUT de Saint-Brieuc	Avril - Juin 2013	Isolement de <i>Campylobacter</i> par migration passive et caractérisation par PCR en temps réel.
Gautier Buquen ⁶	DUT- Option Analyses Biologiques et biochimiques (ABB), IUT de Brest	Avril - Juin 2012	Détection des salmonelles dans les coquillages par méthode culturale et PCR en temps réel.
Théodore Thomas	DUT option Génie de	Avril - Juin 2011	Identification de l'origine aviaire

	l'Environnement (GE), IUT de Brest		d'une contamination fécale dans l'environnement : recherche de <i>Catelliococcus marimammalium</i> par PCR en temps réel.
Mael Morizur ³	DUT option Industrie Alimentaire et Biochimique, IUT de Quimper	Avril- Juin 2009	Détection et quantification de marqueurs de l'origine de la contamination fécale dans les coquillages par la méthode de PCR en temps réel : comparaison de différents protocoles d'extraction d'ADN.
Laura Leroi	Master I, biologie santé Faculté des Sciences et des Techniques, Université de Nantes	2009	Identification de l'origine de la contamination fécale par les oiseaux dans l'environnement : recherche de <i>Catelliococcus marimammalium</i> par PCR en temps réel.
Aude Arzel ³	DUT option ABB, IUT de Brest	Avril- Juin 2008	Détection de l'origine de la contamination fécale des ruminants dans l'environnement, par la méthode de PCR en temps réel.
Laurence Herry ⁷	Ingénieur (retour à l'emploi)	Mai - Juil 2006	Cultures de bactériophages et de <i>Bacteroides</i> en vue de séquencages.
Laetitia Picault ⁷	Ecole supérieure de microbiologie et sécurité alimentaire de Brest (ESMISAB), Brest Ingénieur, Bac + 4	Juin –Août 2005	Utilisation de méthodes de biologie moléculaire pour la détection de contaminations fécales dans l'environnement littoral.
Pierre-Yves Hardy	DUT option ABB, IUT de Quimper	Avril - Juin 2005	Détection de marqueurs de contamination fécale par une technique de biologie moléculaire.
Fanny Soulé	DUT option ABB, IUT de Brest	Avril - Juin 2004	Recherche des <i>Escherichia coli</i> producteurs de Shiga toxines (STEC) dans des coquillages ou des eaux : adaptation et réalisation de techniques de PCR et de Dot Blot.
Pascale Ceceille	DUT option GE, IUT de Brest	Avril - Juin 2003	Recherche de bactéries potentiellement pathogènes, les <i>Escherichia coli</i> vérotoxiques dans les coquillages et essais d'amélioration de leur recherche par PCR.
Julia Belkin	DUT option GE, IUT de Brest	Avril – Juin 2002	Recherche d' <i>Escherichia coli</i> dans des sédiments vaseux.
Marie-Laure Le Mercier	DUT option ABB, IUT de Quimper	Avril- Juin 1998	Etude des bactéries d'origine entérique dans les sédiments marins.

¹ financement de la thèse de Charlotte Balière, Ifremer/Agence de l'Eau Loire-Bretagne ; ² financement de la thèse de Sophie Mieszkin, Ifremer/Région Bretagne.

³ co-encadrement avec S. Mieszkin ; ⁴ co-encadrement avec A. Mauffret ; ⁵ co-encadrement avec J. Cozien ; ⁶ co-encadrement avec S. Lozach ; ⁷ co-encadrement avec M.P. Caprais.

1.7 Responsabilités – participation à des programmes de recherche

Depuis 1998, j'ai participé à 3 projets européens et 8 projets nationaux. J'ai été impliqué principalement dans le montage des projets européens « AquaManche » et « RiskManche » et des projets nationaux « Marquopoleau », « Traces I et II » et « VTEC PNEC Art5 ».

Projets européens

Thématique : Traceurs de Sources Microbiennes (TSM)

- **RISKMANCHE**, Interreg IVA, Risk Management of Catchments and Coasts for Health and Environment ; 2012-2015 ; FEDER - 7 Partenaires : University of Brighton (coord.), National Laboratory Service, Environment Agency, Laboratoire de Microbiologie de l'environnement, Université de Caen Basse Normandie, CEFAS, Weymouth, EHESP de Rennes, CNRS Geosciences de Rennes, Ifremer. **Responsable du projet au sein de l'Ifremer et du principal WP – évaluation des risques.** Coût total du projet : 4 495 K€ - coût total Ifremer : 1 246 K€ (recette Ifremer 623 K€). Financement FEDER 50 %.

- **AQUAMANCHE**, Interreg IVA, Aquatic Management of Catchments for Health & Environment ; 2009-2012 ; FEDER - 4 Partenaires : University of Brighton (coord.), National Laboratory Service, Environment Agency, Laboratoire de Microbiologie de l'environnement, Université de Caen Basse Normandie, Laboratoire de Microbiologie, Ifremer. **Responsable du projet au sein de l'Ifremer.** Coût total du projet : 2 900 K€ - Coût total Ifremer : 1 170 K€ (recette Ifremer 585 K€). Financement FEDER 50 %.

- **ICREW**, Interreg IIB, Improving Coastal and Recreational Waters (pilot action N°3) ; 2003-2006 ; Projet FEDER 3311 conv.042 735 du 09/09/05. Convention de partenariat 04/2 210 852/F- 6 Partenaires : National Laboratory Service, Environment Agency (coord.) ; University of Exeter, Grande-Bretagne ; Conway Institute of Biomolecular and Biomedical Research, University College Dublin, Irlande ; Instituto Nacional De Saude Dr. Ricardo Jorge, Lisbonne, Portugal ; Laboratoire de Microbiologie de l'environnement, Université de Caen Basse Normandie, Laboratoire de Microbiologie, Ifremer. Coût total du projet : 8 500 K€ - Financement FEDER 50 %.

Projets nationaux

Thématique : Traceurs de Sources Microbiennes

- **MARQUOPOLEAU**, Couplage de marqueurs microbiologiques et chimiques pour la détection de l'origine de la pollution organique des eaux ; 2009-2013 ; 9 partenaires ; FUI/Région Bretagne et collectivités, coord. administrative G. Durand, IDHESA, Plouzané. – Coût total du projet : 2 300 K€ - coût total Ifremer : 591 K€ (recette Ifremer 195 K€) **Coordinateur scientifique du projet.**

- **Traces I et II**, Traceurs de contamination fécale des eaux de surface : recherche de marqueurs microbiologiques et chimiques de l'origine de la contamination fécale du milieu aquatique ; 6 partenaires - AFSSET (2007-2009 et 2009-2010), coord. A.M. Pourcher, Cemagref, Rennes ; **responsable du projet au sein de l'Ifremer** ; Convention n° EST-2006/1/36 - Convention n°EST-2008/1/13. Coût total des 2 projets : 200 K€ (recette Ifremer 31,6 K€).

- **GERRICO** du programme Qualipro (2006-2009) - Gestion globale des ressources marines et des risques dans les espaces côtiers. Participants : 15 équipes de recherche Ifremer/Université de

Nantes. **Responsable de l'action « Risques microbiologiques » dans l'axe « Identification et analyse pour une gestion durable ».**

- **Contrat Cap-Atlantique** n° 06/2 210 208/F - Recherche de l'origine humaine ou animale des contaminations bactériologiques de l'eau et des coquillages. **Responsable du projet.**

Thématique : Recherche des *Escherichia coli* producteurs de Shiga-toxines

- **VTEC PNEC ART5** (2 partenaires) : **coordinateur de 2 projets successifs dans le Programme National Environnement Côtier**, (ART.5, A11016, 2004-2005) Recherche des *Escherichia coli* producteurs de Shiga-toxines (STEC) dans l'environnement marin et mise au point de la PCR en temps réel pour les détecter dans les eaux.

Thématique : *E. coli* et les sédiments

- **Rejet de dragage**, projet pluridisciplinaire interne Ifremer (1998-2003). Coordinateur C. Alzieu. **Responsable de la partie microbiologie.**

Responsabilités au sein de l'Ifremer

- Responsable de la thématique Traceurs de Sources Microbiennes depuis 2005
- Responsable de 3 actions concernant l'approche TSM (A090104) du projet PJ0901 (contaminations microbiologiques et usages littoraux) à l'Ifremer depuis 2009.

1.8 Collaborations

Principales collaborations au niveau européen et international Collaborations dans le cadre Traceurs de Sources Microbiennes

Université de Brighton, Grande-Bretagne : H. Taylor et J. Ebdon (coord. projet Interreg IVA Aquamanche et Riskmanche)

Dave Dilson, Swiss Department of Health, Bern, Suisse, post-doctorant, 2011 (formation marqueurs *Bacteroidales*)

Sarah Purnell, Université de Brighton, GB, doctorant puis post-doctorant, 2009-2013

Environmental Agency, Grande-Bretagne : J. Porter et A. Gawler

- Séjour à l'Environment Agency, National Laboratory Service à Starcross 3-24 Novembre 2006. Analyses d'échantillons en commun - recherche des marqueurs *Bacteroidales* associés à l'hôte par PCR en temps réel et discussions sur l'état d'avancement des développements méthodologiques des marqueurs *Bacteroidales*.

United States Environmental Protection Agency (US EPA), Cincinnati, Etats-Unis : J. Santo Domingo, O. Shanks, T. Pitkänen

Tarja Pitkänen, post-doctorant à l'US EPA, Cincinnati (resp. J. Santo Domingo, en collaboration avec N. Neumann, Canada et I. T. Miettinen, Finlande), 2012-2013.

Environment Canada, Burlington, Canada : T. Edge

University of Regina, Canada : C. Yost

- Collaboration franco-canadienne sur l'approche Microbial Source Tracking : présentations des approches dans les 2 pays - en 2010, Ifremer, Plouzané et University of Regina, Canada ; soumission de projets en commun, collaboration dans le cadre de la thèse sur les bactéries entériques dans les coquillages (2012-2015) et du projet RiskManche : caractérisation de souches *E. coli* isolées en France par la puce à ADN *E. coli* développée au Canada, comparaison des résultats de contamination bactérienne de zones conchylicoles en France et au Canada.

- Participation à l'intercalibration SIPP (State of California Source Identification Pilot Project) concernant 41 méthodes de recherche de traceurs de sources microbiennes et 27 laboratoires américains et européens – 2011 (analyse en aveugle – 64 échantillons d'eaux contaminées par des fèces et des effluents de différentes origines) : marqueurs testés (marqueurs *Bacteroidales* associés à l'Homme, aux ruminants et aux porcs et marqueur *C. marimammaliium* associé aux oiseaux de bord de mer ; bactériophages F ARN spécifiques), analyses des données, participation à la rédaction d'articles pour publication dans Water Research.

Principales collaborations au niveau national

UEPSD (Unité d'Ecologie et de Physiologie du Système Digestif), INRA Jouy en Josas : G. Corthier et J.P. Furet (dans le cadre de la thèse de S. Mieszkin, 2007-2010 ; G. Corthier, Directeur de thèse)

Irstea de Rennes : A.M. Pourcher, R. Marti (Traceurs de Sources Microbiennes ; partenaires dans les projets AFSSET Traces et FUI/Région Bretagne Marquopoleau)

Université de Caen : A. Rincé (Traceurs de Sources Microbiennes ; partenaires dans les projets Interreg IIIB ICREW et Interreg IVA AquaManche et RiskManche ; co-directeur de la thèse de C. Balière, 2012-2015)

INRA de Narbonne : N. Wéry (Traceurs de Sources Microbiennes ; partenaires dans les projets Traces)

CNRS Géosciences, Rennes : E. Jardé, L. Jeanneau, L. Harrault (Traceurs de Sources Microbiennes ; partenaires dans les projets Traces, Marquopoleau et Interreg IVA RiskManche)

Agence de l'Eau Loire-Bretagne : P. Fera (Traceurs de Sources Microbiennes ; partenaire projet Marquopoleau)

IDHESA Bretagne Océane : G. Durand, H. Melikechi (Traceurs de Sources Microbiennes ; coord. projet Marquopoleau)

Eurofins : T. Chesnot, E. Algros (Traceurs de Sources Microbiennes ; partenaire projet Marquopoleau)

Université d'Angers : A. Jadas-Hécart et P.Y. Communal (Traceurs de Sources Microbiennes ; partenaire projet Marquopoleau)

Unité de Microbiologie Alimentaire et Prévisionnelle, Ecole Nationale Vétérinaire de Lyon : C. Vernozy-Rozand (Recherche des STEC dans le cadre des projets PNEC) et AgroSupVet de Lyon : D. Thevenot et E. Loukiadis (Recherche des STEC dans le cadre du projet RiskManche et de la thèse de C. Balière)

1.9 Expertises

Expertise d'articles de revues scientifiques internationales de rang A : Water Research, Environmental Science & Technology, Environmental Microbiology and Environmental Microbiology Reports, Journal of Applied Microbiology, Letter of Applied Microbiology, Microbial Ecology, New Zealand Journal of Marine and Freshwater Research, Applied Microbiology and Biotechnology, Environmental Science and Pollution Research, Water Science and Technology.

Evaluation d'un projet de recherche pour la " Kentucky science & engineering foundation ", 2010

Participation à des jurys de thèse (examinateur)

- M. Ratajczak, Devenir des populations d'*E. coli* dans les environnements aquatiques : structure, viabilité et attachement aux particules. Université de Rouen, 11 Mai 2011.
- R. Marti, Recherche de marqueurs de contamination spécifiques des effluents d'élevages porcins. Université de Rennes I, 28 Septembre 2009.

Participation à des comités de thèse

- R. Marti, Irstea, Rennes (2007 - 2008)
- J. Desneux, Irstea, Rennes (21 Mai 2013)

2 Liste des travaux scientifiques

2.1 Publications

La liste des publications, présentée par ordre chronologique décroissant, est subdivisée en 4 principales parties : 1) les publications avec comité de lecture (28), 2) les chapitres de livres (5), 3) les proceedings, articles techniques et de vulgarisation scientifique (11), 4) les manuscrits en cours de rédaction (2). Les principaux rapports sont présentés dans la dernière partie (20).

2.1.1 Publications avec comité de lecture

- Ebentier D., Hanley K., Cao Y., Bradgey B., Boehm A., Ervin J., Goodwin K., **Gourmelon M.**, Griffith J., Holden P., Kelty C.A., Lozach S., McGee C., Peed L., Raith M., Sadowsky M.J., Scott E., Santo Domingo J., Sinigalliano C., Shanks O., Van De Werfhost L.C., Wang D., Wuertz S., Jay J., 2013. Evaluation of the repeatability and reproducibility of a suite of PCR-based microbial source tracking methods. *Water Research*, 47, 6839-6848.
- Harwood V.J., Boehm A.B., Sassoubre L.M., Kannappan V., Stewart J.R., Fong T.T., Caprais M.P., Converse R.R., David Diston D., Ebdon J., Fuhrman J.A., **Gourmelon M.**, Gentry-Shields J., Griffith J.F., Kashian D., Noble R.T., Taylor H., Wicki M., 2013. Performance of viruses and bacteriophages for fecal source determination in a multi-laboratory, comparative study (SIPP). *Water Research*, 47, 6929-6943.
- Layton B., Cao Y., Ebentier D., Hanley K., Ballesté E., Brandão J., Byappanahalli M., Converse R., Farnleitner A., Gentry-Shields J., Gildey M.I., **Gourmelon M.**, Lee J., Lozach S., Madi T., Meijer W., Noble R., Peed L., Lee C.S., Stewart J., Van De Werfhost L.C., Wang D., Whitman R., Wuertz S., Jay J.A., Holden P., Reischer G., Rodrigues R., Rose J., Schriewer A., Sinigalliano C., Boehm A.B., Shanks O., Griffith J., 2013. Performance of human fecal-associated PCR-based assays: an international source identification method evaluation. *Water Research*, 47, 6897-6908.
- Mauffret A., Mieszkin S., Morizur M., Alfansiah Y., Lozach S., **Gourmelon M.**, 2013. Recent innovation in microbial source tracking using bacterial real-time PCR markers in shellfish. *Marine Pollution Bulletin*, 68, 21-29.
- Mieszkin S., Caprais M.P., Le Mennec C., Le Goff M., Edge T., **Gourmelon M.** 2013. Identification of the origin of fecal contamination in shellfish and environmental waters from a French estuary using *Bacteroidales* markers and F-specific RNA bacteriophages. *Journal of Applied Microbiology*, 115, 897-907.
- Raith M.R., Kelty C.A., Griffith J.F., Schriewer A., Wuertz S., Mieszkin S., **Gourmelon M.**, Reischer G., Farnleitner A.H., Ervin J., Holden P., Jay J.A., Boehm A.B., Rose J.B., Meijer W.G., Sivaganesan M., Shanks O.C., 2013. Comparison of PCR-based assays for the characterization of ruminant and cattle fecal pollution. *Water Research*, 47, 6921-6928.
- Ryu H., Henson M., Elk M., Toledo-Hernandez C., Griffith J., Blackwood D., Noble R., **Gourmelon M.**, Glassmeyer S., Santo Domingo J., 2013. Development of quantitative PCR assays targeting 16S rRNA gene of *Enterococcus* spp. and their application to the identification of *Enterococcus* species in environmental samples. *Applied and Environmental Microbiology*, 79, 196-204.
- Sinigalliano C.D., Ervin J., Van De Werfhost L.C., Wang D., Wanless D., Bartkowiak J., Layton B., Raith M., Schriewer A., Badgley B., Lee C., Goodwin K.D., Lee J., Boehm A.B., Noble R., Holden P.A., Jay J.A., Wuertz S., Byappanahalli M., Whitman R., Sadowsky M.J., Meijer W.G., Ballesté E.,

- Gourmelon M.**, Griffith J., Ryu H., Santo Domingo J.W., 2013. Multi-laboratory assessment on the performance of PCR assays targeting *Catellibacterium marimammalium* for microbial source tracking of coastal birds. *Water Research*, 47, 6883-6896.
- Derrien M., Jardé E., Gruau G., Pourcher A.M., **Gourmelon M.**, Jadas-Hécart A., Pierson Wickmann A.C., 2012. Testing the capacity of stanols to identify the origin of fecal contamination in waters: comparison of human and animal signatures and confrontation with microbial markers. *Water Research*, 46, 4009-4016.
- Jeanneau L., Solecki O., Wéry N., Jardé E., **Gourmelon M.**, Communal P.Y., Jadas-Hécart A., Caprais M.P., Gruau G., Pourcher A.M., 2012. Relative decay of fecal indicator bacteria and human-associated markers: a microcosm study simulating wastewater input into seawater and freshwater. *Environmental Science & Technology*, 46, 2375-2382.
- Mauffret A., Caprais M.P., **Gourmelon M.**, 2012. Relevance of *Bacteroidales* and F-specific RNA bacteriophages for efficient tracing of fecal contamination at catchment level. *Applied and Environmental Microbiology*, 78, 5143-5152.
- Jaffrezic A., Jardé E., Pourcher A.M., **Gourmelon M.**, Caprais M.P., Heddadj D., Cottinet P., Bilal M., Derrien M., Marti R., Mieszkin S., 2011. Microbial and chemical markers. Runoff transfert in pig and cow manure amended soils. *Journal of Environmental Quality*, 40, 959-968.
- Marti R.*¹, Mieszkin S.*, Pourcher A.M., Hervio-Heath D., **Gourmelon M.**, 2011. Effect of oxygen and temperature on the persistence of pig-specific genetic markers and on the dynamics of dominant pig manure bacterial populations in river water microcosms. *Journal of Applied Microbiology*, 111, 1159-1175.
- 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, 4623-4633.
- **Gourmelon M.**, Caprais M.P., Mieszkin S., Marti R., Wéry N., Jardé E., Derrien M., Jadas-Hécart A., Communal P.Y., Jaffrezic A., Pourcher A.M., 2010a. Development of microbial and chemical MST tools to identify the origin of the faecal pollution in bathing and shellfish harvesting waters in France. *Water Research*, 44, 4812-4824.
- **Gourmelon M.**, Caprais M.P., Le Mennec C., Mieszkin S., Ponthoreau C., Gendronneau M., 2010b. Application of library-independent Microbial Source Tracking methods for identifying the sources of fecal contamination in coastal areas. *Water Science Technology*, 61, 1401-1409.
- Mieszkin S., Yala, J.F., Joubrel R., **Gourmelon M.**, 2010. Phylogenetic analysis of *Bacteroidales* 16S rRNA gene sequences from human and animal effluents and assessment of ruminant faecal pollution by real-time PCR. *Journal of Applied Microbiology*, 108, 974-984.
- Furet J.P., Firmesse O., **Gourmelon M.**, Bridonneau C., Doré J., Corthier G., 2009. Comparative assessment of human and farm animal's fecal microbiota using real-time quantitative PCR. *FEMS Microbiology Ecology*, 68, 351-362.
- Mieszkin S., Furet J.P., Corthier G., **Gourmelon M.**, 2009. Estimation of pig fecal contamination in river catchment by real-time PCR using two pig-specific *Bacteroidales* 16S rRNA genetic markers. *Applied and Environmental Microbiology*, 75, 3045-3054.
- Gawler A.H., Beecher J.E., Brandao J., Carroll N., Falcao L., **Gourmelon M.**, Masterson B., Nunes B., Porter J., Rincé A., Rodrigues R., Thorp M., Walters J.M., Meijer W.G., 2007. Validation of host-specific *Bacteroidales* 16S rRNA genes as markers to determine the origin of faecal pollution in Atlantic Rim countries of the European Union. *Water Research*, 41, 3780-3784.

¹ Co-premiers auteurs

- **Gourmelon M.**, Caprais M.P., Ségura R., Le Mennec C., Lozach S., Piriou J.Y., Rincé, A., 2007. Evaluation of two library-independent microbial source tracking methods to identify sources of fecal contamination in French estuaries. *Applied and Environmental Microbiology*, 7, 4857-4866.
- **Gourmelon M.**, Montet MP., Lozach S., Le Mennec C., Pommepuy M., Beutin L., Vernozy-Rozand C., 2006. First isolation of Shiga toxin 1d producing *Escherichia coli* variant strains in shellfish from coastal areas in France. *Journal of Applied Microbiology*, 100, 85-97.
- Troussellier M., Bonnefont J.L., Courties C., Derrien A., Dupray E., Gauthier M., **Gourmelon M.**, Joux F., Lebaron P., Martin Y., Pommepuy M., 1998. Responses of enteric bacteria to environmental stresses in seawater. *Oceanologica Acta*, 21, 965-981.
- **Gourmelon M.**, Touati D., Pommepuy M., Cormier M., 1997. Survival of *Escherichia coli* exposed to visible light in seawater: analysis of *rpoS*-dependent effects. *Canadian Journal of Microbiology*, 43, 1036-1043.
- Guillaud J.F., Derrien A., **Gourmelon M.**, Pommepuy M., 1997. T90 as a tool for engineers: interest and limits. *Water Science and Technology*, 35, 277-281.
- Pommepuy M., Fiksdal L., **Gourmelon M.**, Melikechi H., Caprais M.P., Cormier M., Colwell R.R., 1996. Effect of seawater on *Escherichia coli* beta-galactosidase activity. *Journal of Applied Bacteriology*, 81, 174-180.
- Pommepuy M., Butin M., Derrien A., **Gourmelon M.**, Colwell R.R., Cormier M., 1996. Retention of enteropathogenicity by viable but nonculturable *Escherichia coli* exposed to seawater and sunlight. *Applied and Environmental Microbiology*, 62, 4621-4626.
- **Gourmelon M.**, Cillard J., Pommepuy M., 1994. Visible light damage on *Escherichia coli* in seawater: oxidative stress hypothesis. *Journal of Applied Microbiology*, 77, 105-112.

2.1.2 Chapitres de livres

- **Gourmelon M.**, Lazure P., Hervio-Heath D., Le Saux J.C., Caprais M.P., Le Guyader F., Catherine M., Pommepuy M., 2010. Microbial modelling in coastal environment and early warning system, useful tools to limit shellfish microbial contamination. Chap. 16. In: *Water Quality Management and shellfish safety*. WHO., Edited by Rees G., Pond K., Kay D., Bartram J., Santo Domingo J., IWA Publishing, London, UK, 297-318.
- Pommepuy M., Hervio-Heath D., Caprais M.P., **Gourmelon M.**, Le Saux J.C., Le Guyader S.F., 2005. Fecal contamination in coastal areas: An engineering approach. In: *Oceans and health pathogens in the marine environment*. Edited by Belkin S., Colwell R.R., Springer, New York, USA, 331-359.
- **Gourmelon M.**, Le Saux J.C., Bassoullet P., Erard-Le Denn E., Le Cann P., L'Yavanc J., Boutier B., Michel P., Quiniou F., Alzieu C., 2003. Suivi des apports en contaminants des dépôts à terre. In: *Bioévaluation de la qualité environnementale des sédiments portuaires et des zones d'immersion*. Edited by Alzieu C., Ifremer Publisher, Brest, 216-242.
- Crenn I., **Gourmelon M.**, Le Cann P., Ménard D., Le Guyader F., Derrien A., Pommepuy M., 1999. Microbiologie sanitaire des sédiments. In: *Dragages et environnement marin. Etat des connaissances*. Edited by Alzieu C., Ifremer Publisher, Brest, 37-56.
- Pommepuy M., Derrien A., Le Guyader F., Ménard D., Caprais M.P., Dubois E., Dupray E., **Gourmelon M.**, 1996. Microbial water quality on a Caribbean island (Martinique). In *Small islands: marine science and sustainable development, coastal and estuarine studies*. Edited by G.A. Maule, American Geophysical Union, Washington, D.C., USA, 284-297.

2.1.3 Proceedings, articles techniques et de vulgarisation scientifique

- Pourcher A.M., Solecki O., Jardé E., Jeanneau J., Jadas-Hécart A., Caprais M.P., Durand G., **Gourmelon M.**, 2013. Des micro-organismes et des composés chimiques pour identifier les sources de contamination fécale : étude de la persistance en microcosmes et de leur présence dans les eaux à l'échelle d'un bassin versant. *Sciences Eaux Territoires*, 9, 92-97.
- Coordination d'un dossier dans la revue *Techniques Sciences Méthodes : Tracer les pollutions microbiennes dans les eaux*. 2012, suite au colloque « Qualité sanitaire des eaux de baignade et conchylicoles » *Technique Sciences et Méthodes de l'ASTEE*, 5 articles, 3, 13-80.
- Pourcher A.M., Jardé E., Caprais M.P., Wéry N., Jadas-Hécart A., Communal P.Y., Jaffrezic A., Marti R., Mieszkin S., Derrien M., Solecki O., Jeanneau L., **Gourmelon M.**, 2012. Sélection des marqueurs microbiologiques et chimiques de traçage des sources microbiennes : application à des eaux de rivières impactées par des pollutions ponctuelles ou diffuses en France. *Techniques Sciences et Méthodes de l'ASTEE*, 3, 43-56.
- Hervio-Heath D., **Gourmelon M.**, Martial C., 2011. Contamination des coquillages par des bactéries pathogènes. *DCSMM / SRM MMN*, 1-9; */SRM MC* 1-6; */SRM GDG*, 1-8; */SRM MO*, 1-7.
- **Gourmelon M.**, Caprais M.P., Kay D., Stapleton C., 2010. Techniques de dépistage des sources de pollution microbiennes. *Techniques Sciences et Méthodes de l'ASTEE*, 4, 54-64.
- Caprais M.P., Le Mennec C., Pommeppy M., Le Saux J.C., **Gourmelon M.**, 2009. Potential of F-specific RNA specific bacteriophages to discriminate sources of faecal pollution in French shellfish. *Proceedings of the seventh International Conference on Molluscan Shellfish Safety (ICMSS)*. Nantes, France, 14-19 Juin 2009, 326-332.
- Mieszkin S., Furet J.P., Corthier G., Pommeppy M., Le Saux J.C., Bougeard M., Hervio-Heath D., **Gourmelon M.**, 2009. Discrimination between human, pig and ruminant faecal contaminations in a river catchment by real-time PCR using host-specific markers. *Proceedings of the seventh International Conference on Molluscan Shellfish Safety (ICMSS)*. Nantes, 14-19 Juin 2009. 340-349.
- Pagny J., Belin C., Amouroux I., Delisle F., Véron G., **Gourmelon M.**, Doudet J., Panaget T., 2009. Pourquoi les produits de la pêche peuvent-ils être pollués ? <http://www.eaubretagne.fr/Usages-de-l-eau/La-peche-a-pied>.
- Pommeppy M., Hervio-Heath D., **Gourmelon M.**, Caprais M.P., Le Cann P., Le Saux J.C., Le Guyader F., 2004. Emerging pathogens in coastal areas. Novel contaminants and pathogens in coastal waters – Neuchâtel, Suisse, 12-15 Mai 2004. *CIESM Workshop Monographs*, 26, 79-85.
- Pommeppy M., Le Guyader F., Miossec L., **Gourmelon M.**, Derrien A., Dupray E., Le Cann P., Caprais M.P., Haugrarreau L., Menard D., Hervio-Heath, 2001. Le devenir des micro-organismes en zone côtière. *Techniques Sciences et Méthodes de l'ASTEE*, 11, 31-38.
- Alzieu C., Quiniou F., Erard-Le Denn E., Le Grand J., **Gourmelon M.**, Pommeppy M., Le Magueresse A., Cyberouest, Delesmont R., Derrien A., Forget J., Le Cann P., Casanova C. 2001. Géodrisk - Logiciel d'évaluation des risques liés à l'immersion des boues de dragage des ports maritimes. Cd-rom. ISBN 2-84433-049-5. CD 01 01.

2.1.4 Les manuscrits en cours de préparation

- Balière C., Rincé A., Thevenot D., **Gourmelon M.**, en préparation. Detection of highly pathogenic Shiga toxin-producing *E. coli* in shellfish and environmental waters in France.

- Penny C., Ragimbeau C., **Gourmelon M.**, Cauchie H.M., en préparation. Comparative evaluation of an optimized passive-filtration method for enhanced detection of genetically diverse *Campylobacter* in water and fecal samples.

2.1.5 Principaux rapports

- **Gourmelon M.**, Pourcher A.M., Caprais M.P., Soleski O., Jardé E., Jeanneau L., Jadas-Hécart A., Communal P.Y., Chesnot T., Algros E., Melikechi H., Durand G., 2013. Couplage de marqueurs microbiologiques et chimiques pour la détection de l'origine de la pollution organique des eaux. Rapport final du projet Marquopoleau. Conventions Ifremer n° 09004744 et n° 092906205, 134 p.

- **Gourmelon M.**, Marin C., Caprais M.P., Le Mennec C., Soleski O., Jardé E., Jeanneau L., Jadas-Hécart A., Communal P.Y., Mélikechi H., Durand G., Pourcher A.M., 2012. Application des outils aux pollutions diffuses d'un bassin versant. Rapport final de la tâche 4. Projet Marquopoleau. Convention Ifremer n° 09004744, 27 p.

- Pourcher A.M., **Gourmelon M.**, Jardé E., Jaffrezic A., Wéry N., Communal P.Y. *et al.*, 2011. Recherche de marqueurs microbiologiques et chimiques de l'origine de la contamination fécale du milieu aquatique : adaptation des outils aux eaux de baignade. Rapport final. Convention n°EST-2008/1/13, 46 p.

- Mauffret A., Caprais M.P., Mieszkin S., Le Saux J.C., Le Mennec C., Le Goff M., Pommepuy M., Bougeard M., Gonzales R., Mazé M.C., **Gourmelon M.**, 2011. Etat d'avancement du projet AquaManche, année 2010 / Ifremer Aquamanche progress report. 26 p.

- Pourcher A.M., **Gourmelon M.**, Jardé E., Jaffrezic A., Wéry N., Communal P.Y. *et al.*, 2010. Recherche de marqueurs microbiologiques et chimiques de l'origine de la contamination fécale du milieu aquatique : aspect méthodologique. Rapport final. Convention n°EST-2006/1/36 AFSSET. 167 p + résumé long 31 p.

- Caprais M.P., **Gourmelon M.**, Le Mennec C., 2010. Identification de l'origine de la contamination observée en baie de La Baule. Rapport Ifremer. 60 p.

- **Gourmelon M.**, Caprais M.P., Mieszkin S., Le Mennec C., Marin C., Pourcher A.M., Soleski O., Jardé E., Jeanneau L., 2010. Développements analytiques concernant la recherche des marqueurs microbiens et chimiques. Rapport final de la tâche 2. Projet Marquopoleau. Convention Ifremer n° 09004744, 64 p.

- Pourcher A.M., Solecki O., Jeanneau L., Jardé E., Caprais M.P., Guillerm E., Jadas-Hécart A., Communal P.Y., **Gourmelon M.**, 2010. Etude de la persistance de marqueurs de pollution fécale. Rapport final de la tâche 3. Projet Marquopoleau. 56 p.

- **Gourmelon M.**, Caprais M.P., Mieszkin S., Le Saux J.C., Le Mennec C., Pommepuy M., Bougeard M., Gonzales R., Mazé M.C., 2010. Etat d'avancement du projet AquaManche, année 2009 / Ifremer Aquamanche progress report. 23 p.

- Pourcher A.M., **Gourmelon M.**, Jardé E., Jaffrezic A., Wéry N., Communal P.Y. *et al.*, 2009. Recherche de marqueurs microbiologiques et chimiques de l'origine de la contamination fécale du milieu aquatique : adaptation des outils aux eaux de baignade. Rapport intermédiaire. Convention n°EST-2008/1/13. 40 p.

- Pourcher A.M., **Gourmelon M.**, Jardé E., Jaffrezic A., Wéry N., Communal P.Y. *et al.*, 2008. Recherche de marqueurs microbiologiques et chimiques de l'origine de la contamination fécale du milieu aquatique : aspect méthodologique. Rapport intermédiaire. Convention n° EST-2006/1/36, 66p.

- Caprais M.P., **Gourmelon M.**, Le Menec C., Joubrel R., 2008. Identification de l'origine de la contamination observée en baie de La Baule : Première partie de l'étude pour Cap Atlantique. Juin 2008. 45 p.
- **Gourmelon M.**, 2006. Recherche des *Escherichia coli* producteurs de Shiga-toxines (STEC) dans l'environnement marin (coquillages). Rapport de thèse pour le Diplôme d'Etat de Docteur en Pharmacie. Université de Rennes I, 67 p.
- Piriou J.Y., Caprais M.P., **Gourmelon M.**, Rincé A., Walters *et al.*, 2006. Développement d'outils analytiques pour identifier l'origine d'une contamination fécale. Rapport Ifremer RST.LER/CC/06/06, nov 2006, 79 p. et annexes.
- Walters M., Piriou J.Y., Caprais M.P., **Gourmelon M.**, Le Menec C., Casseron R., Ségura R., Rincé A., Masterson B., Thorp M., Meijer W., Carroll N., Graham B., Fraser S., Falcao M.L., Brandao J., Machado J., Nunes B., Rodrigues R., Mendonca R., Gawler A., Porter J., Bonsor R., 2006. Development of analytical tools for faecal source tracking. ICREW PA3, 130 p.
- **Gourmelon M.**, Montet M.P., Le Menec C., Loaec S., Le Cann P., Pommepuy M., Vernozy-Rozand C., 2004. Recherche des *Escherichia coli* producteurs de Shiga-toxines (STEC) dans l'environnement marin et mise au point de la PCR en temps réel pour les détecter dans les eaux. Programme National d'Environnement Côtier (PNEC), ART 5 : Microorganismes et environnement côtier, 58 p.
- **Gourmelon M.**, Montet M.P., Loaec S., Le Menec C., Pommepuy M., Vernozy-Rozand C., 2003. Recherche des *Escherichia coli* vérotoxiques (VTEC) dont *E. coli* O157 :H7 dans l'environnement marin (coquillages). Programme National d'Environnement Côtier, ART 5. 31 p.
- **Gourmelon M.**, Derrien A., Crenn I., Loaec S., 2002. Dénombrement des coliformes thermotolérants ou des *Escherichia coli* dans des sédiments côtiers vaseux. Rapport Ifremer RST DEL/MP/MIC/02.02/Brest, 72 p.
- **Gourmelon M.**, Ménard D., Derrien A., Crenn I., Caprais M.P., Le Comte A., Pommepuy M., Le Cann P., 1999. Evaluation de la contamination microbienne des sédiments superficiels du bassin d'Arc (port autonome de Marseille) et du golfe de Fos prélevés le 29 juin 1999. Rapport Ifremer, 16 p.
- Alzieu C., Andral B., Bassoulet P., **Gourmelon M.**, Le Quillec R., L'Yavanc J., Quiniou F., 1999. Biodragages : protocole de suivi de l'efficacité et de l'impact potentiel. Rapport Ifremer RST/DEL/99.11/Sète, 37 p.

2.2 Communications

La liste des communications est subdivisée en trois parties : 1) les communications orales à des conférences internationales ou nationales (24), 2) les communications affichées (21) et 3) les présentations au public ou de vulgarisation (17).

2.2.1 Communications orales

- **Gourmelon M.**¹, Mieszkin S., Mauffret A., Lozach S., Caprais M.P., Quenot E., Jardé E., Pourcher A.M., 2013. The use of host-associated *Bacteroidales* markers with field water and shellfish samples : interests and limits. 17th International Symposium on Health-Related Water Microbiology, WaterMicro2013, Florianopolis, Brésil, 15-20 Septembre 2013.

¹ Auteur : Auteur présentant

- Jardé E., Jeanneau L., Derrien M., Pourcher A.M., Solecki O., Jadas-Hécart A., **Gourmelon M.**, 2013. An interdisciplinary toolbox to track the sources of fecal contaminations in water. European Geosciences Union (EGU) 2013, Vienne, Autriche, 7-12 Avril 2013.
- Lozach S., Mieszkin S., **Gourmelon M.**, 2013. Validation de Traceurs de Sources Microbiennes par PCR temps réel lors d'une intercalibration internationale. Congrès Société Française de Microbiologie (SFM), Lille, France, 7-8 Février 2013.
- **Gourmelon M.**, Lozach S., Caprais M.P., 2011. Ifremer's contribution to SIPP method evaluation: *Bacteroidales* markers - Gull2 marker and genotypes I-IV of F-RNA bacteriophages. Meeting SCCWRP, Costa Mesa, Etats-Unis, 13-14 Décembre 2011.
- **Gourmelon M.**, *et al.*, 2011. Identification des sources de pollution fécale : application en milieu littoral. Eau & Santé. GRAIE, 3^{ème} conférence Eaux, chaîne trophique et santé, Lyon, France, 20 Janvier 2011 (invitée).
- Jeanneau L., Jardé E., Derrien M., Gruau G., Solecki O., Marti R., Pourcher A.M., Wéry N., Caprais M.P., Mieszkin S., **Gourmelon M.**, Jadas-Hécart A., Communal P.Y., 2011. Tracking the sources of fecal contaminations: an interdisciplinary toolbox. American Geophysical Union, San Francisco, Etats-Unis, 9 Décembre 2011.
- Mauffret A., Caprais M.P., Le Mennec C., Marin C., Mieszkin S., Le Saux J.C., Pommepuy M., Bougeard M., **Gourmelon M.**, 2011. Long term monitoring of host-specific markers for microbial source tracking and catchment management, International Water Association IWA, Rotorua, Nouvelle-Zélande, 18-23 Septembre 2011.
- **Gourmelon M.**, Caprais M.P., Mieszkin S., Marti R., Wéry N., Jardé E., Derrien M., Jadas-Hécart A., Communal P.Y., Jaffrezic A., Durand G., Melikechi H., Algros E., Chesnot T., Le Fur I., Pourcher A.M., 2010. Identification de l'origine de la contamination fécale dans l'environnement : les outils développés dans les projets Traces et Marquopoleau. Rencontres d'Hendaye autour de la qualité des eaux de baignade, Hendaye, France, 23-24 Juin 2010 (invitée).
- **Gourmelon M.**, Caprais M.P., Mieszkin S., Marti R., Wéry N., Jardé E., Derrien M., Jadas-Hécart A., Communal P.Y., Jaffrezic A. et Pourcher A.M., 2010. Development of microbial and chemical MST tools to identify the origin of the faecal pollution in bathing and shellfish harvesting waters in France The WR conference, Lisbonne, Portugal, 11-14 Avril 2010.
- Mauffret A., Mieszkin S., **Gourmelon M.**, 2010. Développement et applications des traceurs de sources microbiennes aux coquillages. Colloque « Qualité sanitaire des eaux de baignade et conchylicoles » Ifremer, Plouzané, 29 Octobre 2010.
- Pourcher A.M., Jardé E., Caprais M.P., Jaffrezic A., Marti M., Mieszkin S., Solecki O., Derrien M., **Gourmelon M.**, 2010. Identification of livestock faecal contamination in surface waters using chemical and microbiological tools. 14th RAMIRAN International Conference, Lisbonne, Portugal, 13-15 Septembre 2010.
- Pourcher A.M., Jarde E., Caprais M.P., Jaffrezic A., Wery N., Jadas-Hecart A., Communal P.Y., Marti R., Mieszkin S., Derrien M., Solecki O., Jeanneau L., **Gourmelon M.**, 2010. Développement de marqueurs spécifiques de contamination fécale : application aux profils de baignade. Les rencontres scientifiques de l'ANSES, Paris, 6 Décembre 2010.
- **Gourmelon M.**, 2010. Development of *Bacteroidales* markers to identify the origin of the faecal pollution in coastal areas in France. Workshop on Microbial Source Tracking Research in Canada. Regina, Canada, 21-22 Septembre 2010 (keynote speaker).
- **Gourmelon M.**, Caprais M.P., 2010. Recherche d'un nouveau marqueur de contamination aviaire. Assemblée générale du projet Gerrico. Pornic, 23 Juin 2010.

- Jardé E., Derrien M., Jaffrezic A., **Gourmelon M.**, Caprais M.P., Mieszkin S., Marti R., Pourcher A.M., 2010. Microbial and chemical markers : runoff transfer in pig and cow manure-amended soils. Society for Environmental Geochemistry and Health conference 2010, Galway, Irlande, 27 Juin- 02 Juillet 2010.

- **Gourmelon M.**, Caprais M.P., Kay D., 2009. Techniques de dépistage des sources de pollutions microbiennes : méthodologies, application et retour d'expériences concernant l'identification des pollutions en zones littorales en France et au Royaume-Uni. Colloque Mareclean, Granville, 30 Septembre 2009 (invitée).

- Marti M., Mieszkin S., **Gourmelon M.**, Pourcher A.M., 2009. Effet de l'oxygène et de la température sur la persistance de deux bactéries fécales dans l'eau de rivière. 4^{ème} congrès de l'Association Francophone d'Ecologie Microbienne, Lyon, Septembre 2009.

- Mieszkin S., Marti R., Pourcher A.M., **Gourmelon M.**, 2009. Effects of oxygen and temperature on persistence of two pig-specific 16S rRNA genetic markers in river water. 15th International Symposium on Health-Related Water Microbiology, IWA, Naxos, Grèce, 2-5 Juin 2009.

- Mieszkin S., Furet J.P., Corthier G., Pommepuy M., Le Saux J.C., Bougeard M., Hervio-Heath D., **Gourmelon M.**, 2009. Discrimination between human, pig and ruminant faecal contaminations in a river catchment by real-time PCR using host-specific markers. ICMSS09, Nantes, France, 15-19 Juin 2009.

- Pourcher A.M., Marti R., Dabert P., **Gourmelon M.**, Caprais M.P., Mieszkin S., Jardé E., Gruau G., Petitjean P., Jaffrezic A., Wery N., Communal P.Y., Jadas-Hécart A., Durand G., 2009. Détermination de l'origine des pollutions fécales des eaux : Exemple d'outils développés dans le cadre du projet « Traceurs de contamination fécale ». 1^{ères} Rencontres nationales « Gestion des baignades en eau douce », Cahors, 24-25 Juin 2009.

- **Gourmelon M.**, Mieszkin S., Yala J.F., Joubrel R. and Pommepuy M., 2008. Phylogenetic analysis of *Bacteroidales* 16S rRNA genes from human and animal fecal samples. The third international meeting on environmental biotechnology and engineering, Palma de Mallorca, Espagne, 21-25 Septembre 2008.

- Mieszkin S., Furet J.P., Corthier G. and **Gourmelon M.**, 2008. Estimation of pig contaminations in catchment by real-time PCR using two pig-specific *Bacteroidales* 16S rRNA genetic markers. The third international meeting on environmental biotechnology and engineering, Palma de Mallorca, Espagne, 21-25 Septembre 2008.

- **Gourmelon M.**, Le Saux J.C., Lazure P., Hervio-Heath D., Caprais M.P., Le Guyader F., Catherine M., Pommepuy M., 2005. Microbial modelling in coastal environment and implementation of early warning system to limit shellfish microbial contamination. Water quality in shellfish growing areas (Coastal ERA-NET seminar), Tarragona, Espagne, 8-9 Juillet 2005.

- **Gourmelon M.**, Lazure P., Hervio-Heath D., Le Saux J.C., Caprais M.P., Le Guyader F., Catherine M., Pommepuy M., 2004. Microbial modeling in coastal environment and implementation of early system, useful tools to limit shellfish microbial contamination. Emerging issues in water and infectious disease: safe management of shellfish and harvest waters. Communication au WHO/USEPA Workshop. Kuala Lumpur, Malaisie, 30 Novembre -2 Décembre 2004.

2.2.1 Communications affichées

- **Gourmelon M.**, Jeanneau L., Solecki O., Jardé E., Caprais M.P., Jadas-Hécart A., Durand G., Pourcher A.M., 2013. Identification des sources de pollution fécale à l'échelle bassin versant (projet Marquopoleau). Congrès Société Française de Microbiologie (SFM), Lille, 7-8 Février 2013.

- Ebentier D., Hanley K., Boehm A., Cao Y., Ervin J., Goodwin K., **Gourmelon M.**, Griffith J., Hoang N., Holden T., Jiang N., Kely C.A., Lozach S., McGee C., Peed L., Raith M., Scott E., Santo Domingo J., Sinigalliano C., Shanks O., Van De Werfhost L.C., Wang D., Wuertz S., Jay J.A., 2012. Evaluation of the intra- and inter-laboratory reproductibility of a suite of PCR-based microbial source tracking assays. 112th General Meeting of the American Society for Microbiology San Francisco, Juin 2012.
- Kely C.A., Raith M.R., Griffith J.F., Schriewer A., Wuertz S., Mieszkin S., **Gourmelon M.**, Reischer G., Farnleitner A.H., Ervin J., Holden P., Jay J.A., Boehm A.B., Sivaganesan M., Shanks O.C., 2012. Comparison of PCR-based assays for the characterization of cattle fecal pollution in California. 112th General Meeting of the American Society for Microbiology San Francisco, Juin 2012.
- Layton B., Cao Y., Ballesté E., Farnleitner A., Lozach S., **Gourmelon M.**, Lee J., Meijer W., Noble R., Peed L., Reischer G., Van De Werfhorst L., Boehm A.B., Holden P., Jay J., Shanks O., Griffith J., 2012. Performance of Human Fecal-Associated PCR-Based methods in the California Source Identification Protocol Project, 112th General Meeting of the American Society for Microbiology, San Francisco, Juin 2012.
- Pourcher A.M., Jadas-Hécart A., Jardé E., Jeanneau L., Caprais M.P., Solécki O., Durand G., Communal P.Y., **Gourmelon M.**, 2012. Développement d'outils permettant de déterminer l'origine de la contamination fécale des eaux, Eaux et Milieux, Angers, France, 16 Novembre 2012.
- **Gourmelon M.**, Wéry N., Mieszkin S., Marti R., Pourcher A.M., 2011. Development of bacterial markers for tracking human, ruminant and pig faecal pollution in surface waters. Federation of European Microbiology Societies (FEMS), Genève, Suisse, 26-30 Juin 2011.
- Mauffret A., Mieszkin S., Alfiansah Y., **Gourmelon M.**, 2011. Recent innovation in bacterial source tracking in shellfish, IWA, Rotorua, Nouvelle-Zélande, 18-23 Septembre 2011.
- Mauffret A., Mieszkin S., Marin C., Caprais M.P., Le Mennec C., Solecki O., **Gourmelon M.**, 2011. Long term monitoring *Bacteroidales* host specific markers in a catchment (Daoulas) and identifying possible correlations with microbial faecal indicators and hydrological parameters. Federation of European Microbiology Societies (FEMS), Genève, Suisse, 26-30 Juin 2011.
- Mieszkin S., Caprais M.P., Le Mennec C., Le Goff M., **Gourmelon M.**, 2011. Identification of the origin of faecal contamination in water and shellfish from a French estuary using Bacteroidales markers and F-specific RNA bacteriophages. 111th General Meeting of the American Society for Microbiology, New Orleans, Etats-Unis, 21-24 Mai 2011.
- Solecki O., **Gourmelon M.**, Caprais M.P., Marin C., Wéry N., Jeanneau L., Jardé E., Pourcher A.M., 2011. Persistence of microbial human markers in freshwater and seawater microcosms. Federation of European Microbiology Societies (FEMS), Genève, Suisse, 26-30 Juin 2011.
- Caprais M.P., Le Mennec C., Lozach S., Marin C., **Gourmelon M.**, 2010. Evaluation of library-independent microbial source tracking methods to identify seabird faecal contamination of the coastal environment in France. The Water Research Conference, Lisbonne, Portugal, 11-14 Avril 2010.
- Wéry N., **Gourmelon M.**, Mieszkin S., Marti R., Godon J.J., Pourcher A.M., 2010. Development of bacterial markers for tracking human, ruminant and pig fecal pollution in natural surface waters. ISME 13, Seattle, Etats-Unis, 22-27 Août 2010.
- Caprais M.P., Le Mennec C., Pommepuy M., **Gourmelon M.**, 2009. Possible use of F+specific RNA bacteriophage to discriminate faecal pollution: first investigation on French shellfish harvesting areas. 15th International Symposium on Health-Related Water Microbiology, IWA, Naxos, Grèce, 2-5 Juin 2009.

- **Gourmelon M.**, Caprais M.P., Le Menec C., Joubrel R., Ratiskol G., Ponthoreau C., Gendronneau M., 2009. Identifying the sources of fecal contamination to shellfish-harvesting areas in La Baule bay in France using library-independent microbial source tracking methods. ICMSS09, Nantes, France. 15-19 Juin 2009.

- **Gourmelon M.**, Caprais M.P., Le Menec C., Mieszkin S., Ponthoreau C., Gendronneau M., 2009. Application of library-independent Microbial Source Tracking methods for identifying the sources of fecal contamination in coastal areas. 15th International Symposium on Health-Related Water Microbiology, IWA, Naxos, Grèce, 2-5 Juin 2009.

- **Pourcher A.M.**, Dabert P., Marti R., **Gourmelon M.**, Caprais M.P., Mieszkin S., Jardé E., Gruau G., Petitjean P., Jaffrezic A., Wery N., Communal P.Y., Jadas-Hécart A., 2008. Recherche de marqueurs microbiologiques et chimiques de l'origine de la contamination fécale du milieu aquatique. Rencontres scientifiques de l'AFSSET, programme "Eaux et Santé", Lyon, France, 10-11 Décembre 2008.

- **Caprais M.P.**, **Gourmelon M.**, Rincé A. Le Menec C., Ségura R., Pommepey M., 2007. Etude de l'efficacité de méthodes de détermination de l'origine de la contamination fécale dans l'environnement : II- Application à des zones côtières. Congrès de la Société Française de Microbiologie, Nantes, France, 30 Mai - 01 Juin 2007.

- **Gourmelon M.**, Caprais M.P., Rincé A. Le Menec C., Ségura R., Pommepey M., 2007. Etude de l'efficacité de méthodes de détermination de l'origine de la contamination fécale dans l'environnement : I- Validation sur des échantillons fécaux. Congrès de la Société Française de Microbiologie, Nantes, France, 30 Mai - 01 Juin 2007.

- **Gourmelon M.**, Montet M.P., Loac S., Le Menec C., Hervio-Heath D., Pommepey M., Bouvet J., Vernozy-Rozand C., 2003. Determination of an adapted protocol to detect verotoxin-producing *Escherichia coli* (VTEC) and *E. coli* O157:H7 in shellfish collected from coastal environment. 5th International Symposium on " Shiga Toxin (Verocytotoxin)- producing *Escherichia coli* infections", Edimbourg, GB, 8-11 Juin 2003.

- **Gourmelon M.**, Crenn I. Derrien A., Dupray E., Pommepey M., 2002. A wastewater survey into the adaptation of *Escherichia coli* to marine stresses. Xth International Congress of Bacteriology and Applied Microbiology, Paris, 27 Juillet – 01 Août 2002.

- **Gourmelon M.**, Le Saux J.C., Bassoulet P., Erard E., Le Cann P., L'Yavanc J., Boutier B., Michel P., **Quiniou F.**, Alzieu C., 2002. Land disposal of contaminated dredged-sediments: a solution for the safety of oyster-producing areas. Congress ISEAC, Plymouth, GB, 18-20 Juin 2002.

2.3.1 Présentation au public - Vulgarisation

- **Gourmelon M.**, Mauffret A., Caprais M.P., Le Menec C., Mieszkin S., Marin C., Le Goff M., Lozach S., Alfansiah Y., Bougeard M., Le Saux J.C., Pommepey M., 2012. Aquamanche. Relevance of MST markers for efficient fecal contamination tracking at the level of a catchment in France (Brittany). Brighton, AquaManche dissemination event. 31 Mai 2012.

- **Gourmelon M.**, Rincé A., Mauffret A., Caprais M.P., Le Saux J.C., 2012. Colloque de restitution fin du projet AquaManche. Brest, 12 Mars 2012, 70 personnes et Lessay, Normandie, 13 Mars 2012, 30 personnes.

- **Gourmelon M.**, 2011. Marquopoleau - état d'avancement. Groupe de travail " conchyliculture " du bassin versant de Daoulas et de l'Elorn, Daoulas, 16 Juin 2011.

- Mauffret A., Mieszkin S., Marin C., Caprais M.P., Le Menec C., **Gourmelon M.**, 2011. Suivi de la qualité des eaux du bassin versant de Daoulas. Groupe de travail " conchyliculture " du bassin versant de Daoulas et de l'Elorn, Daoulas, 16 Juin 2011.

- **Gourmelon M.**, Taylor H., 2011. Aquamanche - Etat d'avancement du projet et perspectives. Manifestation annuelle 2011 du programme Interreg IVA France-Angleterre, Rouen, France, 22-23 Juin 2011 (P orale et stand ; Gourmelon M., Taylor H. et Gonzales R.)
- **Gourmelon M.** & Gourmelon V., avec la participation de l'ensemble du personnel du Laboratoire de Microbiologie de l'Ifremer de Brest, 2010. Organisation d'un colloque international sur le thème : Qualité sanitaire des eaux de baignade et conchylicoles. Le point sur les traceurs de sources microbiennes pour identifier l'origine des pollutions fécales. Ifremer, Plouzané, 29 Octobre 2010 - http://wwz.ifremer.fr/tsm_2010.
- **Gourmelon M.**, Caprais M.P., 2010. Recherche d'un nouveau marqueur de contamination aviaire. Assemblée générale du projet Gerrico. Pornic, 23 Juin 2010.
- **Gourmelon M.**, 2010. Traquer les sources de contamination fécale, les outils : intérêts et limites. Journée technique LNR du 17 Mars 2010, Ifremer, Nantes.
- **Gourmelon M.** et Bougeard M., 2010. Présentation du projet AquaManche. Application sur le bassin versant de Daoulas au groupe de travail " conchyliculture " du bassin versant de Daoulas, Daoulas, 12 Février 2010.
- **Gourmelon M.**, Mieszkina S., Caprais M.P., Le Menec C., Lozach S., 2009. Discrimination de l'origine humaine ou animale de la contamination. Chambre d'agriculture, Quimper, 7 Janvier 2009.
- **Gourmelon M.**, Caprais M.P., 2008. Identification de l'origine humaine ou animale des contaminations fécales de l'environnement : recherche de marqueurs hôte-spécifiques Journée technique LNR, Nantes, 29 Janvier 2008.
- **Gourmelon M.**, 2007. Identification de l'origine humaine ou animale des contaminations fécales de l'environnement : recherche de marqueurs hôte-spécifiques. Observatoire Scientifique des Côtes d'Armor, Ploufragan, Juillet 2007.
- **Gourmelon M.**, Le Cann P., 2004. Les conséquences pour le développement durable des rejets urbains et agricoles en mer. I - Les aspects bactériologiques, II - Les aspects virologiques. Conférence à l'Institut Océanographique, Paris, 15 Mars 2004.
- Le Cann P., **Gourmelon M.** (coord.). Dossier « Contamination microbienne en mer par les rejets urbains et agricoles » (français/anglais) 2005
<http://envlit.ifremer.fr/var/envlit/storage/documents/dossiers/microbio/index.htm>
- **Gourmelon M.**, Le Cann P., 2001. Rejets urbains et agricoles en mer. Les conférences de l'Ifremer, Nantes, 29 Novembre 2001.
- **Gourmelon M.**, 2001. Rejets urbains ou agricoles en mer et contamination bactérienne. Conférence Ifremer, Brest, 16 Mai 2001.
- **Gourmelon M.**, 2000. Rejets urbains et agricoles en mer et contamination bactériennes. Conférence aux journées portes ouvertes Ifremer, 22 Octobre 2000.