

Département Océanographie et Dynamique des Ecosystèmes
Laboratoire Environnement & Ressources Morbihan-Pays de Loire
La Trinité sur mer

2015 – RST/LER/MPL/15.08

TREGUIER Cathy
SCHAEFFER Julien
LE SAUX Jean Claude
COCHENNEC-LAUREAU Nathalie
LE GUYADER Soizick F.



ifremer

Contamination des coquillages par les norovirus en rivière d'Auray (Norocoqauray)



Poches ostréicoles dans l'étier du Roch dû – Photo LER/MPL R. Gabellec

Contamination des coquillages
par les norovirus
en rivière d'Auray
(Norocoqauray)

Fiche documentaire

Numéro d'identification du rapport : RST/LER/MPL/15-08 Diffusion : libre <input checked="" type="checkbox"/> restreinte <input type="checkbox"/> interdite <input type="checkbox"/> Validé par : Nathalie Cochenec-Laureau, Soizick F. Le Guyader & Jean-Claude Le Saux	date de publication : mai 2015 nombre de pages : 51 bibliographie (Oui / Non) : illustration(s) : 26 figures, 3 tableaux langue du rapport : Française
Titre et sous-titre du rapport : Contamination des coquillages par les norovirus en rivière d'Auray	
Auteur(s) principal(aux) : SCHAEFFER Julien TREGUIER Cathy	Organisme / Direction / Service, laboratoire Ifremer/LSEM/Mic-LNR/SG2M/RBE Ifremer LER/MPL/la Trinité/mer.
Collaborateur(s) : ALLENOU Jean-Pierre CHAUVIN Jacky COCHENEC-LAUREAU Nathalie GABELLEC Raoul MANACH Soazig MROZ Sophie RAVAUD Emilie RETHO Michaël STANISIERE Jean-Yves	Organisme / Direction / Service, laboratoire Ifremer/LER/MPL/la Trinité/mer.
SCHAEFFER Julien LE SAUX Jean Claude LE GUYADER Soizick F	Ifremer/LSEM/Mic-LNR/SG2M/RBE
Cadre de la recherche : Programme : Norocoqauray Projet : _____ Autres (préciser) : _____	

Résumé :

Les norovirus (NoV) sont responsables des épidémies hivernales de gastroentérites aiguës dans la population. Ils sont excrétés dans les fèces humains, puis se retrouvent, après épuration insuffisante, dans le milieu marin naturel où ils peuvent contaminer des coquillages, qui à leur tour risquent de déclencher des gastroentérites chez les consommateurs.

Cette étude vise à améliorer les connaissances sur la contamination des coquillages en élevage en rivière d'Auray par les NoV, en lien avec les bactéries témoins de contamination fécale *Escherichia coli* (*E. coli*). L'objectif est de suivre les flux de NoV et d'*E. coli* apportés par différents rejets (dont une station d'épuration) impactant la zone conchylicole et leur influence sur la qualité des coquillages en élevage.

Le projet de remplacer la station d'épuration de Kerran (56) de type lagunage aéré par une nouvelle station à filtration membranaire a permis de réaliser un suivi des concentrations en NoV et *E. coli* dans les eaux et les coquillages, l'année précédant et l'année suivant le changement de filière de traitement, afin de vérifier si ce changement induit une amélioration de la qualité microbiologique des coquillages.

La nouvelle station d'épuration à boues activées et réacteur membranaire a permis d'améliorer considérablement la qualité microbiologique (*E. coli* et NoV) du rejet. L'abattement sur le paramètre *E. coli* passe de 4 unités Log pour la filière lagunaire, à plus de 6 unités Log pour la filière membranaire. Pour les NoV, l'abattement passe de 3 unités Log à plus de 4,6 unités Log. Sur les 13 échantillons analysés en sortie de filière membranaire, un seul s'est révélé supérieur au seuil de détection de la méthode.

Les apports en NoV des autres exutoires étudiés sont plus difficiles à quantifier en raison de la stratégie d'échantillonnage (prélèvements ponctuels) et de problèmes analytiques dus à la présence d'inhibiteurs dans les échantillons. Cependant, les résultats de quantification de NoV obtenus au cours de la première phase dans les différents exutoires montrent des concentrations de niveau équivalent à celles observées en sortie des lagunes. Les résultats positifs obtenus dans les échantillons d'eau ne sont pas préférentiellement obtenus durant la période épidémique GEA dans la population.

Dans les coquillages, les contaminations sont relativement homogènes sur l'ensemble de la zone et les concentrations en *E. coli* ne sont pas statistiquement différentes entre les différents points de prélèvement ni entre les deux phases. L'effet de l'amélioration du rejet de la station d'épuration ne peut pas être mis en évidence.

Pour les NoV, les concentrations dans les coquillages se situent également à des niveaux homogènes sur tous les points. Au cours de la seconde année de suivi, on observe une baisse à la fois du nombre d'échantillons positifs et du niveau de contamination des coquillages en NoV. Ce résultat peut être lié aux caractéristiques de l'épidémie de gastroentérites dans la population, plus courte dans le temps. Cependant, la présence de NoV dans les coquillages au cours de cette seconde année, en l'absence de rejet de NoV par la nouvelle station de traitement membranaire, confirme que cette station d'épuration n'est pas la seule source d'apport de NoV vers la zone conchylicole.

La modélisation hydrodynamique des flux de NoV de la première phase confirme les résultats dans les coquillages en démontrant par exemple l'impact du rejet du Reclus sur l'ensemble de la zone étudiée.

Mots-clés : Norovirus, coquillages, contamination, station d'épuration, flux, rivière d'Auray, *Escherichia coli*.

REMERCIEMENTS

Cette étude a été financée par le Fonds Européen pour la Pêche, le ministère de l'Ecologie, du Développement Durable et de l'Energie, la région Bretagne et le conseil général du Morbihan.

Elle a été réalisée en partenariat avec le Comité Régional de la Conchyliculture de Bretagne Sud.

Les auteurs remercient Mme Hirsch du Syndicat Mixte du Pays d'Auray pour son assistance dans le dossier de financement de l'étude, ainsi que l'intercommunalité Auray Quiberon Terre Atlantique (AQTA) et la SAUR pour l'accès à la station de traitement de Kerran.

Les auteurs tiennent également à remercier Mr Le Meitour, pour la fourniture des huîtres et la mise à disposition de ses parcs pour l'installation des poches ostréicoles.

Enfin, cette étude n'aurait pas été exhaustive sans l'accès au site de l'étang du Roch dû, pour les prélèvements complémentaires. Que Mme Digne propriétaire des lieux, ainsi que les agents de l'ONEMA qui ont apporté leur assistance aux prélèvements soient ici remerciés.

SOMMAIRE

1	INTRODUCTION	11
2	MATERIEL ET METHODES	13
2.1	<i>PRESENTATION DU SITE D'ETUDE</i>	13
2.2	<i>PRESENTATION DE LA STATION DE TRAITEMENT DES EAUX USEES ...</i>	15
2.3	<i>PROTOCOLE D'ECHANTILLONNAGE</i>	16
2.4	<i>PRELEVEMENTS.....</i>	16
2.4.1	Prélèvements d'eau.....	16
2.4.2	Mesure des débits	19
2.4.3	Prélèvements de coquillages.....	19
2.5	<i>ANALYSES.....</i>	21
2.5.1	Analyses d'E. coli dans l'eau et les coquillages.....	21
2.5.2	Analyses de NoV dans l'eau et les coquillages	21
2.6	<i>TRAITEMENTS STATISTIQUES.....</i>	23
2.7	<i>MODELISATION HYDRODYNAMIQUE</i>	23
3	RESULTATS	25
3.1	<i>DONNEES ENVIRONNEMENTALES.....</i>	25
3.1.1	Caractéristiques climatiques.....	25
3.1.2	Situation épidémique dans le Morbihan	26
3.2	<i>DEBITS AUX DIFFERENTS EXUTOIRES.....</i>	27
3.3	<i>PERFORMANCES EPURATOIRES DE LA STATION D'EPURATION.....</i>	28
3.3.1	Performances épuratoires pour les E. coli	28
3.3.2	Performances épuratoires pour les norovirus	29
3.4	<i>RESULTATS DES ECHANTILLONS D'EAUX.....</i>	30
3.4.1	Colimétrie dans les eaux.....	30
3.4.2	Norovirus dans les eaux.....	32
3.5	<i>RESULTATS COQUILLAGES.....</i>	34
3.5.1	Colimétrie dans les coquillages	34
3.5.2	Norovirus dans les coquillages	35
3.6	<i>MODELISATION.....</i>	38
4	DISCUSSION.....	41
5	CONCLUSION.....	43
	BIBLIOGRAPHIE	45
	ANNEXES.....	49

1 INTRODUCTION

Les zones de production de coquillages situées en zone littorale, peuvent être impactées par des apports microbiologiques d'origine fécale humaine ou animale en provenance des bassins versants. Ces apports peuvent représenter un danger pour les coquillages destinés à la consommation.

La protection du consommateur est assurée règlementairement au niveau Européen par les textes du paquet hygiène (Food law). Au niveau des zones d'élevage, le seul critère microbiologique correspond à la bactérie témoin de contamination fécale *Escherichia coli* (*E. coli*). Les niveaux d'*E. coli* sont actuellement estimés pour chaque zone de production par le réseau de surveillance REMI (Réseau Microbiologique) opéré par l'Ifremer.

Cependant, les Toxi Infections Alimentaires Collectives (TIAC) déclarées en France suite à la consommation de coquillages sont dans 54 % des cas liées aux virus et majoritairement à la présence de Norovirus (NoV) (Thomas *et al.*, 2011-a ; Vaillant *et al.*, 2012). Ces virus sont les principaux responsables des épidémies hivernales de gastroentérites aiguës dans la population.

Le genre Norovirus appartient à la famille des *Caliciviridae*. Ce sont des virus non enveloppés à capsidie icosaédrique de petite taille (27 à 40 nm). Le génome est constitué d'un ARN simple brin positif de 7 700 nucléotides organisé en 3 ORF (cadre de lecture). Génétiquement très divers, ils sont classés en six génogroupes, subdivisés en génotypes. Les souches infectant les humains appartiennent aux génogroupes I, II et IV (figure 1) (Atmar, 2010 ; Zheng *et al.*, 2006). Après une courte période d'incubation (24 heures environ), les symptômes sont caractérisés par des vomissements violents et une diarrhée durant quelques jours, accompagnée de douleurs abdominales (Thomas *et al.*, 2011-a).

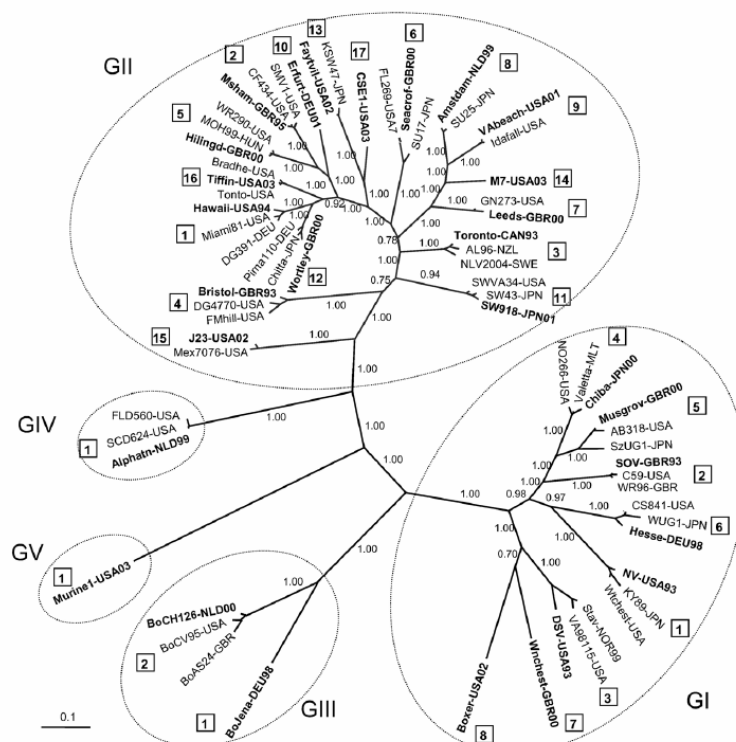


Figure 1 : Arbre phylogénétique des NoVs représentation des différents génogroupes (Zheng *et al.* 2006)

La principale source de contamination est la transmission de personne à personne dans environ 80 % des cas (Kroneman *et al.*, 2006 ; Van Duynhoven, 2005), la consommation d'aliments contaminés (produits de la mer, fruits et légumes consommés crus) pouvant représenter 12 à 15 % des cas (EFSA, 2011). La propagation rapide de l'épidémie est facilitée par une dose infectieuse très faible, dix particules virales pouvant déclencher l'apparition des symptômes chez des personnes sensibles (Teunis *et al.*, 2008). En période épidémique, les quantités de virus rejetés dans l'environnement peuvent être très importantes en raison des grandes concentrations de virus retrouvées dans les selles, jusqu'à 10^{12} copies d'ARN/g de selles (Thomas *et al.*, 2011-a). Ces virus sont excrétés par les personnes infectées, mais également par des porteurs sains et l'excrétion peut durer de deux à quatre semaines après la disparition de tous les symptômes (Atmar, 2010 ; Teunis *et al.*, 2014).

Parmi les nombreuses voies d'apport des NoV dans le milieu naturel, les stations de traitement des eaux usées représentent une source importante, les installations de traitement classique étant peu efficaces pour réduire la charge en virus.

Dans les prochaines années, les critères sanitaires au niveau des produits conchylicoles devraient intégrer ce danger viral, grâce à la normalisation des techniques d'analyses. Ces nouvelles contraintes sanitaires, si elles peuvent durablement pénaliser l'activité conchylicole littorale, apporteront une meilleure qualité microbiologique des coquillages mis sur le marché.

L'amélioration du traitement des eaux usées, avec la technologie de boues activées à réacteur membranaire, permet désormais d'obtenir un abattement significatif en NoV au cours du process, pouvant atteindre 6 unités Logarithmiques sur les eaux traitées (da Silva *et al.*, 2007 ; da Silva *et al.*, 2008 ; Sima *et al.*, 2011).

La présente étude s'inscrit dans une démarche de renforcement des connaissances sur la qualité de la zone de production conchylicole de la rivière d'Auray, concernant les NoV. La restructuration de la station de traitement des eaux usées de Kerran (Morbihan), évoluant d'une filière d'épuration de type lagunage aéré vers une filière de type membranaire, représente un contexte intéressant pour évaluer l'impact du changement de filière de traitement sur les niveaux de contamination du rejet, ainsi que sur la qualité de la zone conchylicole située en aval.

Dans ce cadre, les principaux objectifs de cette étude sont :

- d'étudier les performances épuratoires des deux filières de traitement (lagunage aéré et réacteur membranaire), sur l'abattement des NoV et des bactéries indicatrices de contamination fécale (*E. coli*),
- de calculer les flux d'*E. coli* et de NoV rejetés par la station de Kerran, ainsi que par d'autres rejets locaux. L'objectif n'étant pas d'effectuer un inventaire exhaustif des sources potentielles d'apports en NoV sur le secteur d'étude, seuls quelques rejets de typologie différente (rejet urbain, agricole, mixte, pluvial, ...) ont été retenus,
- d'estimer l'importance relative de ces flux entre eux, et de comparer les impacts respectifs de l'ancienne et de la nouvelle filière de traitement sur la contamination des zones conchylicoles situées en aval.

Enfin, le devenir des flux de NoV, à partir des différentes sources estimées durant l'étude sera simulé au moyen du modèle hydrodynamique tridimensionnel « Mars 3D ».

2 MATERIEL ET METHODES

2.1 PRESENTATION DU SITE D'ETUDE

Le site d'étude se situe sur la commune de Saint Philibert (56) à proximité de la rivière d'Auray, estuaire se déversant dans le golfe du Morbihan (figure 2).

Le choix de ce site a été motivé par la proximité entre le rejet de la station de traitement des eaux usées de Kerran et les premières concessions conchylicoles (environ un kilomètre).

La restructuration de cette station d'épuration, évoluant d'une filière d'épuration de type lagunage aéré vers une filière de type membranaire, permet d'étudier les effets de l'amélioration d'une filière de traitement sur la qualité du milieu.



Figure 2 : Secteur d'étude

La figure 3 présente en détail le site de la station d'épuration, à proximité de l'étang du Roch dû. L'étang du Roch dû est un étang à marée qui se rejette en rivière d'Auray par un petit étier, en partie privé.

Les effluents de la station de traitement par lagunage étaient rejetés dans le ruisseau à la sortie des deux roselières situées après les lagunes.

Ce ruisseau rejoint ensuite l'étang à marée du Roch dû. Par le passé, des digues avaient été construites autour de l'étang afin de l'utiliser en tant que nurserie de poissons, et le cours d'eau dévié

pour éviter les intrusions d'eau douce. Un système de vannes permettait la régulation du rejet des étangs d'eaux douces dans l'étang à marée en plusieurs points.

Actuellement, la digue est partiellement affaissée à son extrémité sud-ouest et le ruisseau se rejette directement dans l'étang. A basse mer, lorsque l'étang se vide, l'eau douce circule directement à travers l'étang jusqu'à l'étier. A pleine mer, lorsque l'étang est plein, l'eau douce se mélange à l'eau de mer dans l'étang.

Pour le rejet de la nouvelle station de traitement membranaire, une canalisation a été construite afin d'évacuer directement les effluents dans l'étier, sans passer par l'étang du Roch dû.

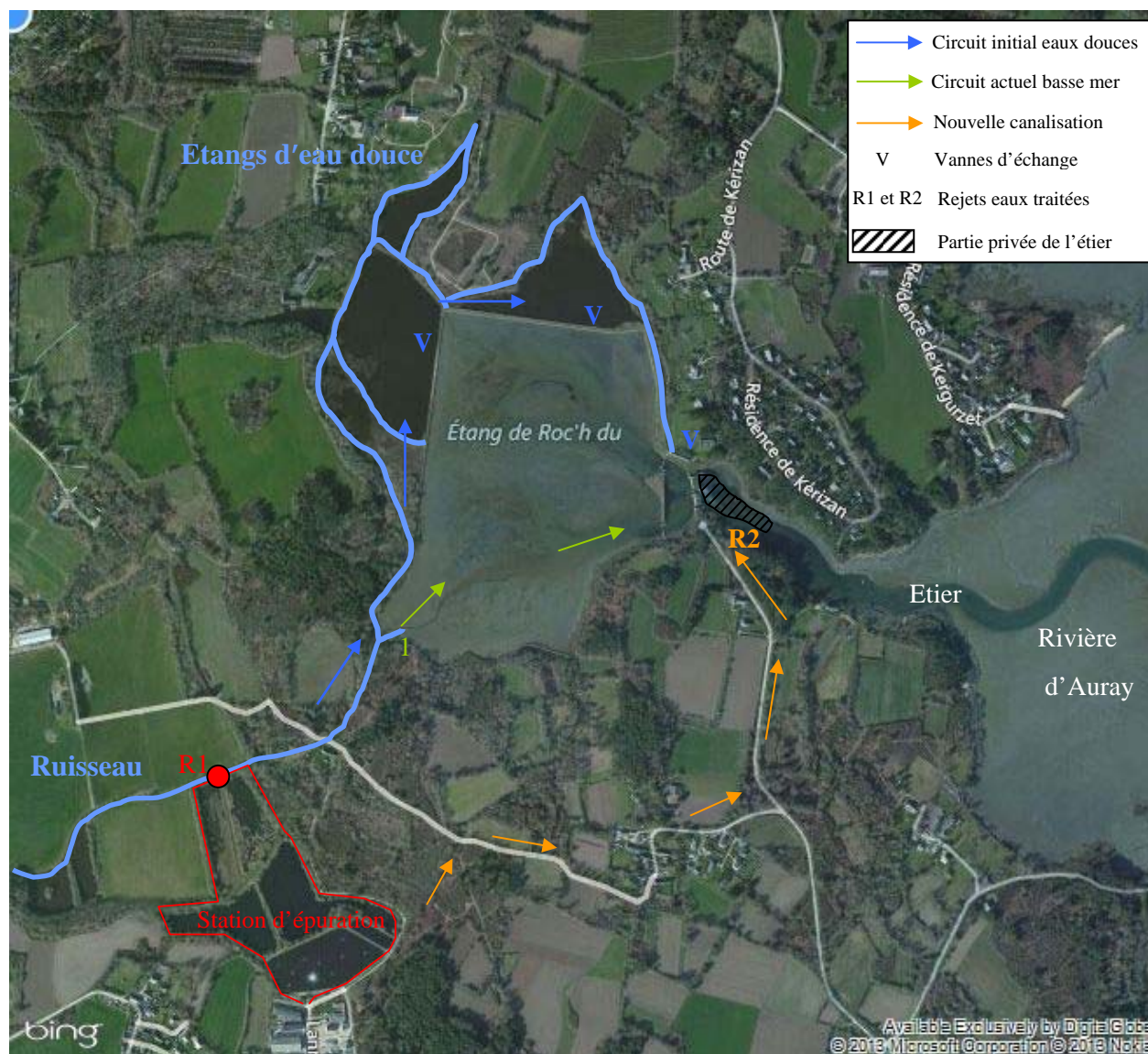


Figure 3: Présentation du site du Roch dû (R1, rejet des lagunes ; R2, rejet de la station d'épuration membranaire ; flèches bleues, circuit de l'eau douce avant l'affaissement de la digue au point 1 ; V, vannes d'échanges entre étangs d'eau douce et étang à marée ; flèches vertes, circuit actuel de l'eau douce à basse mer ; flèches oranges, canalisation de rejet des effluents de la station de traitement membranaire)

2.2 PRESENTATION DE LA STATION DE TRAITEMENT DES EAUX USEES

La station de traitement des eaux usées de Kerran traite les eaux des communes de Crac'h, Saint-Philibert et Locmariaquer (56). La station initiale, mise en service en juillet 1983, était constituée d'une filière de traitement de type lagunage aéré de 14 950 Equivalents-Habitants (EH) (figure 4a). Cette station n'étant plus conforme avec les objectifs de la directive « Eaux Résiduaires Urbaines » (directive n°91/271/CEE du 21 mai 1991), il était nécessaire de la faire évoluer. Le Syndicat Mixte Auray Belz Quiberon Pluvigner (SMABQP)¹ en charge de l'assainissement a fait le choix de la remplacer par une station de type boues activées avec réacteur membranaire de 21 500 EH.

Les travaux de construction de la nouvelle filière d'épuration ont démarré en octobre 2012. Durant les travaux, la station d'épuration a continué à fonctionner avec une lagune d'aération réduite, la nouvelle station étant construite sur une partie de la surface ainsi libérée.

La nouvelle filière membranaire a été mise en service le 17 juin 2013 (figure 4b). Cependant, à cette date le nouvel émissaire permettant le rejet de l'effluent dans l'étier du Roch dû n'était pas encore fonctionnel, et le rejet de la station d'épuration s'est poursuivi dans les lagunes de finition.

La première phase de l'étude a donc été entièrement réalisée sans changement du point de rejet. Le nouvel émissaire n'a été mis en service que le 02 octobre 2013, avec arrêt du rejet en sortie des roselières.

Pour le traitement des résultats, la phase II de l'étude démarre après la mise en service du nouvel émissaire.

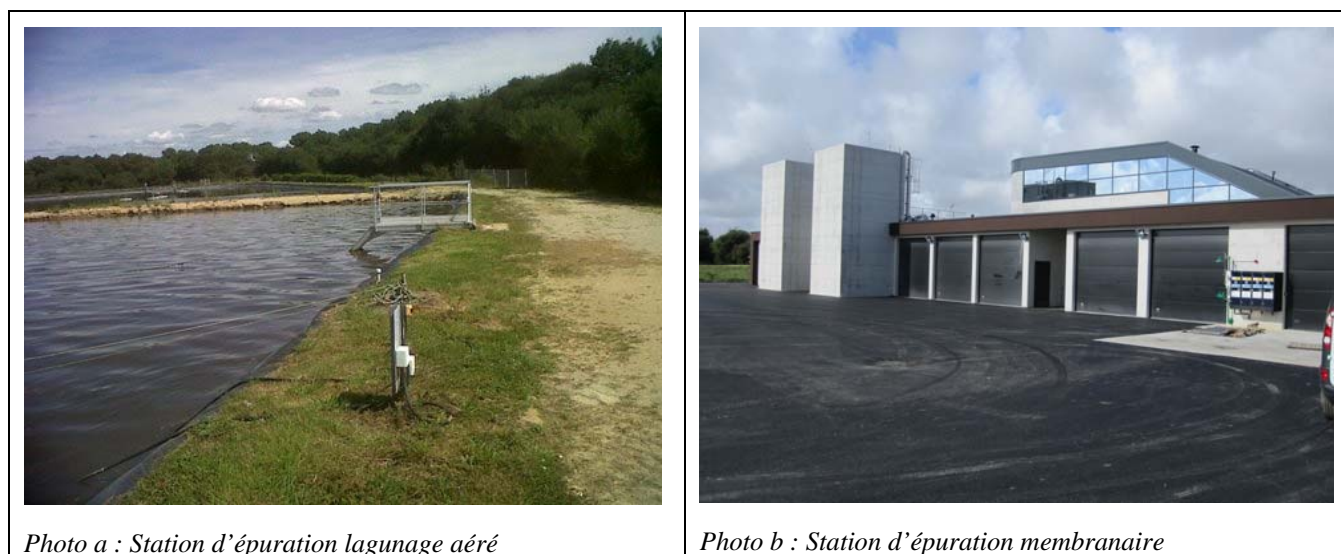


Figure 4 : Photos de la station de traitement des eaux usées de Kerran, avant et après travaux

¹ Le SMABQP a été intégré à la communauté de communes AQTA (Auray Quiberon Terre Atlantique) au 01/01/2014

2.3 PROTOCOLE D'ÉCHANTILLONNAGE

Les prélèvements d'eaux et de coquillages ont été réalisés entre octobre 2012 et mai 2014, avec une fréquence bimensuelle durant la période d'épidémie hivernale de gastroentérite aiguë (GEA) dans la population (décembre à avril) et mensuelle en dehors de cette période (figure 5). Le suivi a été réalisé de façon à couvrir deux périodes hivernales d'épidémie GEA, l'une correspondant à la filière lagunaire, l'autre à la nouvelle filière membranaire.

	Phase I												Phase II											
Année	2012				2013								2014											
Mois	08	09	10	11	12	01	02	03	04	05	06	07	08	09	10	11	12	01	02	03	04	05	06	07
Prélèvements					fréquence bimensuelle						fréquence mensuelle							fréquence bimensuelle						
Période épidémique																								

Mise en service nouvelle station d'épuration
Mise en service nouvel émissaire

Figure 5 : Fréquence d'échantillonnage

2.4 PRELEVEMENTS

2.4.1 Prélèvements d'eau

2.4.1.1 Prélèvements en station d'épuration

Les prélèvements en entrée et sortie de la station de traitement à lagunage sont réalisés au moyen d'échantillonneurs automatiques (figures 6 et 7) permettant d'obtenir un échantillon moyen sur 24 heures, du jour j-1 par rapport aux prélèvements de coquillages.



Figure 6 : Photo du préleveur automatique de la SAUR² en entrée de la station de lagunage



Figure 7 : Photo du Préleveur automatique ISCO 3700 en sortie de la station de lagunage

² SAUR : Société d'Aménagement Urbain et Rural, exploitant de la station de Kerran

Après la mise en service de la nouvelle station d'épuration, l'exploitant a installé un préleveur automatique en entrée et en sortie de station, au niveau des points ① et ④ de la figure 8.



Figure 8 : Schéma de la station de traitement des eaux usées de Kerran (d'après document Stereau et Cabinet Bourgois)

A partir de chaque échantillon moyen 24 heures, trois flacons sont remplis, un flacon de 500 ml pour le dénombrement des *E. coli* et deux flacons d'un litre pour la recherche des virus, l'un pour analyse directe et l'autre pour archivage au congélateur.

2.4.1.2 Prélèvements dans les cours d'eau

Des prélèvements ont été réalisés sur six points d'eaux douces de typologies diverses (figure 9), choisis en fonction de leur proximité et/ou de leur impact potentiel sur les zones conchylicoles de la rivière d'Auray (Allenou *et al.*, 2012).

Selon ces critères, les points suivants ont été retenus :

- **Amont rejet** : ruisseau recueillant les eaux d'un sous-bassin versant essentiellement urbain. Ce point permettra d'estimer les quantités d'*E. coli* et de NoV présents dans le cours d'eau en amont du rejet de la station d'épuration,
- **Aval rejet** : le prélèvement est réalisé en aval du rejet de la station d'épuration, juste avant l'arrivée dans l'étang à marée,
- **Le Plessis** : cours d'eau de sous-bassin versant essentiellement agricole, avec des habitations dispersées sous Assainissement Non Collectif (ANC),
- **Le Reclus** : cours d'eau recueillant les eaux pluviales d'un secteur urbain important, ainsi que le rejet de la station d'épuration d'Auray,
- **Le Bono** : rejet pluvial de la commune du Bono,
- **Amont anse de Baden** : cours d'eau d'un sous-bassin versant mixte agricole/urbain.

Deux points de prélèvement supplémentaires ont été définis, sur le site de l'étang du Roch dû afin de s'assurer que (i) la qualité de l'eau à l'arrivée dans l'étang d'eau salée est la même que celle du point « Aval rejet » et (ii) que les eaux en provenance des étangs d'eau douce ne sont pas source de contamination en NoV.

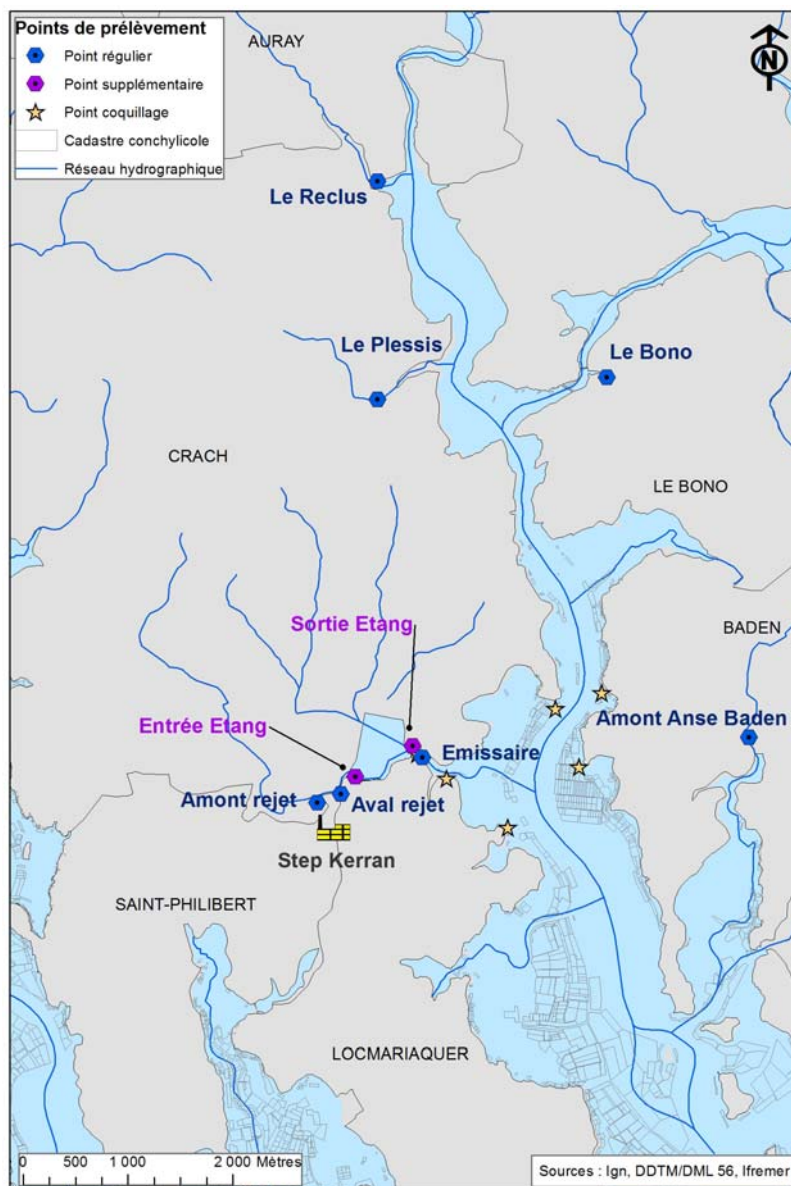


Figure 9 : Points de prélèvement des échantillons d'eaux

En raison des conditions d'accès au site (étang privé) ces points de prélèvement n'ont pas été échantillonnés de façon systématique au cours de l'étude, mais une fois aux mois de janvier, février, mars de chaque année, et une fois en dehors de la période épidémique au mois de juin 2013.

Après la mise en service du nouvel émissaire de rejet de la station d'épuration (octobre 2013), le point « Aval rejet » a été remplacé par le point « Emissaire ».

Sur chaque point, un prélèvement ponctuel est réalisé, et trois flacons sont remplis, répartis de la même manière que les échantillons de la station d'épuration.

Les prélèvements d'eau sont réalisés le jour J-1 par rapport aux prélèvements de coquillages, par les agents Ifremer du LER/MPL de la Trinité/mer et acheminés au laboratoire en glacière isotherme.

2.4.2 Mesure des débits

La mesure du débit est réalisée lors des prélèvements d'eau au moyen d'un courantomètre numérique acoustique ADC (Acoustic Digital Current Meter) de marque « OTT » fonctionnant selon le principe des ultrasons (figure 10). Plusieurs points de mesure de vitesse sont réalisés, à plusieurs profondeurs, et le débit moyen est directement calculé par l'appareil. Les mesures ont été réalisées de janvier (maximum hydrologique) à août (minimum hydrologique) 2013.



Figure 10a : Capteur du courantomètre

Figure 10b : Terminal mobile du courantomètre

Figure 10 : Photos du courantomètre OTT ADC

2.4.3 Prélèvements de coquillages

L'étude porte sur six points de prélèvements d'huîtres creuses (figure 11). Deux d'entre eux correspondent aux points du réseau REMI de la zone conchylicole (Le Guilvin et Le Parun), auxquels ont été rajoutés quatre points plus proches du rejet de la station d'épuration.

Le point Roch dû est situé le plus en amont du rejet, à la limite de la partie privée de l'étier. Les points Fort Espagnol, Toul inis et Bascatique ont été positionnés respectivement en amont, en aval et de l'autre côté du chenal par rapport au rejet.

Un point de prélèvement supplémentaire, situé à la sortie de l'étang du Roch dû (sortie étang) a été échantillonné selon la même fréquence que les points eaux supplémentaires (§ 2.4.1.2).



Figure 11 : Points de prélèvement des échantillons de coquillages

Sur chaque point, un lot de coquillages d'origine unique, issu de la rivière d'Auray, en quantité suffisante pour une année de suivi, a été placé dans des poches ostréicoles clairement identifiées au moyen de plaquettes. Deux approvisionnements ont été effectués le 20 septembre 2012 et le 08 octobre 2013, soit avant chaque période d'épidémie hivernale de gastro-entérite aiguë dans la population.

Sur chaque point, deux sous-échantillons d'huîtres sont prélevés, l'un réservé au dénombrement des *E. coli* et l'autre à l'analyse des NoV. Les prélèvements sont réalisés par les agents Ifremer du LER/MPL de la Trinité/mer et acheminés au laboratoire en glacière isotherme.

2.5 ANALYSES

2.5.1 Analyses d'*E. coli* dans l'eau et les coquillages

2.5.1.1 Analyses d'eau

Le dénombrement des *E. coli* dans l'eau a été réalisé au laboratoire Ifremer LER/MPL de la Trinité/mer selon la technique des microplaques, norme NF EN ISO 9308-3 : "Recherche et dénombrement des *Escherichia coli* et des bactéries coliformes dans les eaux de surface et résiduaires - Partie 3 : méthode miniaturisée (nombre le plus probable) pour ensemencement en milieu liquide". Les analyses débutent dans les 24 heures suivant le prélèvement.

Les résultats sont exprimés en nombre d' *E. coli* pour 100 ml d'eau, et la limite de détection (LD) de la méthode est de 38 *E. coli*/100 ml.

2.5.1.2 Analyses de coquillages

Le dénombrement des *E. coli* dans les coquillages a été réalisé par le laboratoire Ifremer LER/MPL de la Trinité/mer, selon la norme NF V 08-106 "Dénombrement des *Escherichia coli* dans les coquillages vivants – Technique indirecte par impédancemétrie directe".

Les résultats sont exprimés en nombre d'*E. coli* pour 100 grammes de chair et de liquide intervalvaire (CLI) et la LD est de 67 *E. coli*/100 g CLI.

2.5.2 Analyses de NoV dans l'eau et les coquillages

Les analyses virologiques ont été réalisées au Laboratoire Santé Environnement et Microbiologie (LSEM) de l'Ifremer à Nantes.

2.5.2.1 Concentration en NoV dans les eaux

Des essais préliminaires ont permis de définir pour chaque point de prélèvement la méthode d'analyse la plus adaptée, sur la base de l'efficacité d'extraction. Les prélèvements des points : Amont rejet, le Plessis et entrée de station ont été analysés selon une méthode directe ; et les prélèvements des points: Baden, Aval rejet, le Bono, le Reclus, et sortie de station ont été analysés selon une méthode incluant une étape préliminaire de concentration, afin d'augmenter la sensibilité de détection.

→ Méthode directe : la prise d'essais de 40 mL d'échantillon a été mélangée avec du polyéthylène glycol 8000 (PEG) et 10^5 copies de génome de mengovirus (virus témoin d'extraction). Après incubation une nuit à 4°C et centrifugation 13500 x g pendant 1 heure, les particules virales ont été précipitées dans le culot.

→ Méthode avec étape de concentration : la prise d'essais d'1 litre a été concentrée par ultrafiltration grâce au système de cassette Vivaflow50 (Sartorius, Aubagne, France). Les 40 ml de concentrât obtenus après le processus ont été traités avec du PEG comme dans la méthode directe.

Durant la phase II, malgré la méthodologie mise en oeuvre, l'efficacité d'extraction de certains prélèvements d'eaux était insuffisante. Une étape de purification à l'aide d'un mélange de chloroforme et de butanol (V/V) a été systématiquement ajoutée. Cette purification a été réalisée après la dissolution de culot de PEG par addition du mélange de chloroforme/butanol. Après homogénéisation vigoureuse et centrifugation la phase aqueuse contenant les virus a été collectée avant d'être lysée comme décrit ci-dessous. De plus pour les prélèvements d'eaux dont l'efficacité d'extraction n'était pas satisfaisante, l'extraction a été répétée avec une prise d'essai de 3 mL, moins sensible aux inhibiteurs de PCR.

2.5.2.2 Elution des NoV des échantillons de coquillages

Les coquillages ont été analysés selon la méthode ISO/TS 15216-1:2013, modifiée pour analyser la totalité du surnageant (Uhrbrand *et al.*, 2010). Les tissus digestifs de 12 huîtres ont été disséqués et répartis en portions de 2 g, prise d'essais de la méthode. L'éluion des NoV a été réalisée grâce à un traitement enzymatique à l'aide de la protéinase K. Après centrifugation, le surnageant contenant les particules virales a été collecté.

2.5.2.3 Extraction des acides nucléiques viraux (AN)

L'extraction des AN a été réalisée à l'aide du kit Nuclisens, (bioMérieux, Lyon France) sur les culots dissous des prélèvements d'eau, et sur les éluats des tissus de coquillages. Les AN ont été libérés par lyse chimique de la capsid virale en présence d'un tampon de thiocyanate de guanidium. Les AN ont été purifiés à l'aide d'une silice magnétique et d'un automate d'extraction.

2.5.2.4 Détection et quantification des NoV.

Les AN extraits ont été analysés en RT-PCR en temps réel (rRT-PCR) en utilisant le kit Ultrasens one step Quantitative RT-PCR System (Invitrogen, France) auxquels sont ajoutés les amorces et sondes marquées spécifiques des virus recherchés. Après extraction, les échantillons ont été analysés en rRT-PCR spécifique du mengovirus. Le Ct (signal en rRT-PCR) de l'échantillon a été comparé au Ct du contrôle positif pour déterminer l'efficacité d'extraction (Costafreda *et al.*, 2006 - Le Guyader *et al.*, 2009). L'efficacité d'extraction a été jugée acceptable au-dessus de 1% et non acceptable en dessous. Une fois l'extraction validée, l'utilisation d'une rRT-PCR générique pour NoV a permis de réaliser le screening et la quantification des échantillons (Miura *et al.*, 2013). En effet, cette rRT-PCR générique permet de détecter la présence d'un moins l'un des trois génogroupes de NoV humains (NoVGI, NoVGII et NoVGIV).

Afin de minimiser les variations dans l'approche quantitative, les échantillons positifs ont été analysés en même temps. Ainsi en utilisant des coefficients standard moyens les Ct ont été convertis en un nombre de copies et les résultats exprimés pour les coquillages en nombre de copies d'ARN par gramme de tissus digestif (cARN/gTD) et pour les prélèvements d'eau en nombre de copies d'ARN par litre (cARN/L), les limites de détection et de quantification de chaque méthode sont présentées dans le tableau I.

Tableau I : Limites de Quantification et de Détection

Méthode	Prise d'essais	Limite de Quantification	Limite de Détection
Coquillages	2g	50 cARN/gTD	25 cARN/gTD
Eaux	1 L	100 cARN/L	50 cARN/L
	40 mL	2500 cARN/L	1250 cARN/L
	3 mL	3300 cARN/L	1600 cARN/L

TD : tissus digestifs, cARN : copies d'ARN

2.6 TRAITEMENTS STATISTIQUES

Les tests statistiques (analyses de variance) ont été réalisés avec le logiciel « Statgraphics® centurion » (distribué par Sigma plus).

2.7 MODELISATION HYDRODYNAMIQUE

A partir des flux estimés durant l'étude, la simulation du transport et de la dilution des NoV en rivière d'Auray a été réalisée grâce au modèle hydrodynamique tridimensionnel MARS3D « MORBRAS » de résolution horizontale 165 m et vingt niveaux verticaux. Il est forcé à ses limites en marée, température et salinité par le modèle « BRETSUD » (résolution 500 m) à la fréquence de 15 minutes. Les débits journaliers des fleuves côtiers sont fournis par la Banque Hydro (<http://www.hydro.eaufrance.fr>). L'effet de la turbidité des eaux dans l'échauffement de la colonne d'eau est pris en compte quotidiennement grâce aux « re-jeux » interpolés des observations satellites « Méris » et « Modis » (Saulquin *et al.*, 2011). Les forçages climatiques appliqués sont issus de Météo France (analyses météorologiques du système de prévision « Arome ») : ils fournissent à une résolution spatiale (2.5 km) et temporelle (une heure) très fine, les champs de vent, de pression, de température et d'humidité de l'air et de rayonnement.

Le modèle « MARS3D MORBRAS 165 m » employé dans cette étude a fait l'objet d'une validation en marée, température, courants et salinité. Elle témoigne d'une représentation satisfaisante du transport et de l'échauffement de la masse d'eau selon les régimes de vents, les échanges de chaleur air/mer et la marée (Annexe I).

La simulation a été réalisée sur la période du 15/12/2012 au 15/01/2013, sous forçages réalistes, à partir des flux maximums observés aux différents exutoires suivis.

En raison des temps de persistance importants des NoV dans le milieu (Yang *et al.*, 2012 ; Campos and Lees, 2014), aucun taux de mortalité n'a été appliqué aux particules virales, les seuls effets étant la dispersion et la dilution en rivière d'Auray.

3 RESULTATS

3.1 DONNEES ENVIRONNEMENTALES

3.1.1 Caractéristiques climatiques

Les deux hivers au cours desquels l'étude s'est déroulée (2012-2013 et 2013-2014) ont connu des pluviométries supérieures aux moyennes décennales (figure 12).

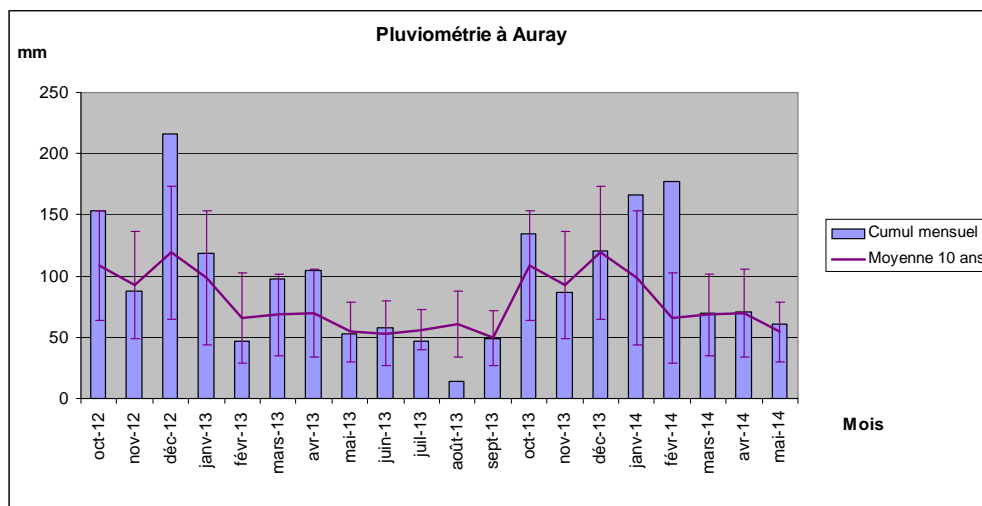


Figure 12 : Cumuls mensuels de pluviométrie à Auray d'octobre 2012 à mai 2014 (données Météofrance)

Le premier hiver a connu un mois de décembre particulièrement pluvieux, puis une baisse de pluviométrie importante aux mois de janvier et surtout février. Au cours du second hiver, la pluviométrie est restée élevée d'octobre à février, avec des cumuls bien supérieurs aux moyennes décennales en janvier et février.

La figure 13 représente les débits mesurés sur le Loc'h, principal affluent du bassin versant de la rivière d'Auray équipé d'une station de jaugeage automatisée.

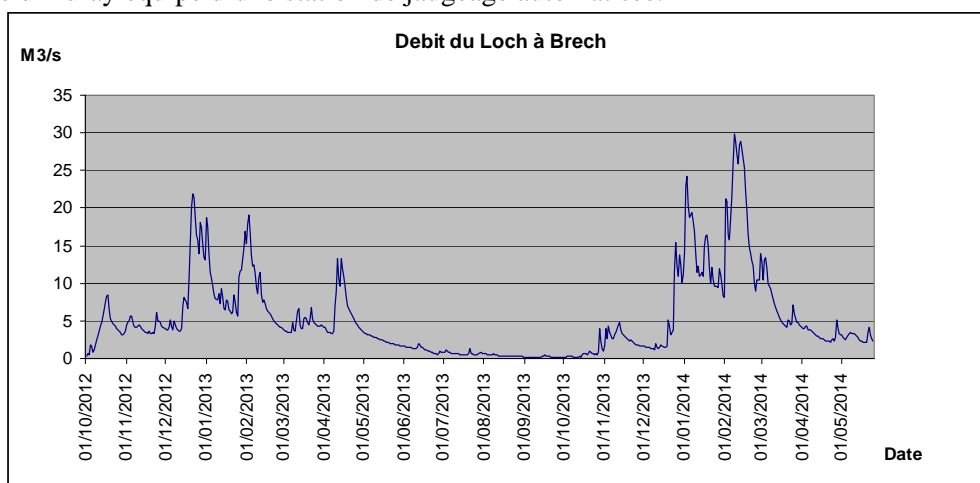


Figure 13 : Débits moyens journaliers du Loc'h à Brech'h. Source : Banque hydro, <http://www.hydro.eaufrance.fr/>

En lien avec la pluviométrie, les débits du second hiver sont plus élevés que ceux du premier, avec des maxima à 30 m³/s, contre 20 m³/s. Ces débits importants, correspondant à des niveaux de crue décennale, peuvent contribuer à une plus grande dilution des apports anthropiques, mais peuvent également induire des dysfonctionnements des ouvrages d'assainissement.

Deux pics de débit sont observés chaque hiver, en décembre 2012 et février 2013 pour le premier hiver, et en janvier et février 2014 pour le second.

3.1.2 Situation épidémique dans le Morbihan

La base « SURSAUD » (Surveillance Sanitaire des Urgences et des décès) gérée par l'INVS (Institut de Veille Sanitaire) recense, entre autres, les appels reçus par les associations SOS médecins au motif de gastroentérite aiguë (GEA). Cette base ne permet pas de recenser l'ensemble des cas de GEA dans la population car la majorité d'entre eux ne font l'objet d'aucun signalement, mais elle permet d'avoir une estimation de l'importance de l'épidémie, et notamment de la variabilité interannuelle.

La figure 14 représente le nombre hebdomadaire d'appels au motif GEA reçu par les associations SOS médecins de Lorient et de Vannes, d'octobre 2012 à mai 2014.

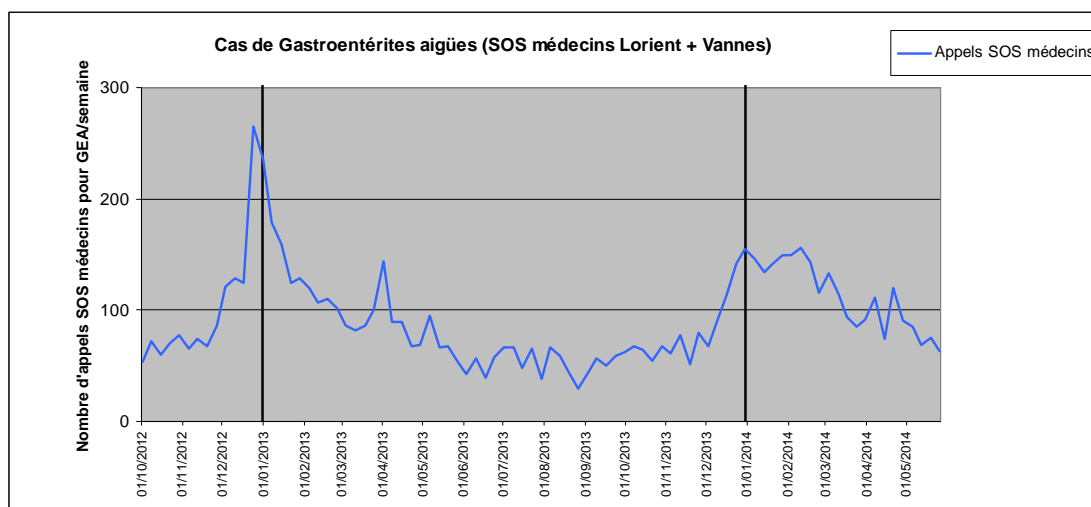


Figure 14 : Nombre d'appels à SOS médecins Lorient et Vannes pour cause de GEA (base SURSAUD)

L'épidémie de gastroentérites aiguës dans la population est plus précoce et plus importante au cours de la première saison hivernale. Le maximum d'appels (265) est atteint la dernière semaine de 2012 et le pic se prolonge durant 3 semaines. Le second hiver, deux maxima d'appels (155 et 156) sont observés la première et septième semaine de 2014 respectivement, mais avec des valeurs bien inférieures à celles du premier hiver.

3.2 DEBITS AUX DIFFERENTS EXUTOIRES

La méthodologie de calcul des débits est présentée en annexe II.

Les débits mesurés ou calculés sont présentés pour chaque journée de prélèvement sur la figure 15.

Le rejet du Reclus est celui qui présente ponctuellement le plus fort débit des exutoires étudiés (jusqu'à $0,6 \text{ m}^3/\text{seconde}$).

Les volumes rejetés par la station de Kerran (sortie lagune) sont minoritaires par rapport aux volumes provenant de l'amont. Ceci est particulièrement vérifié en période hivernale où le débit de la station ne représente qu'un dixième du débit de l'amont.

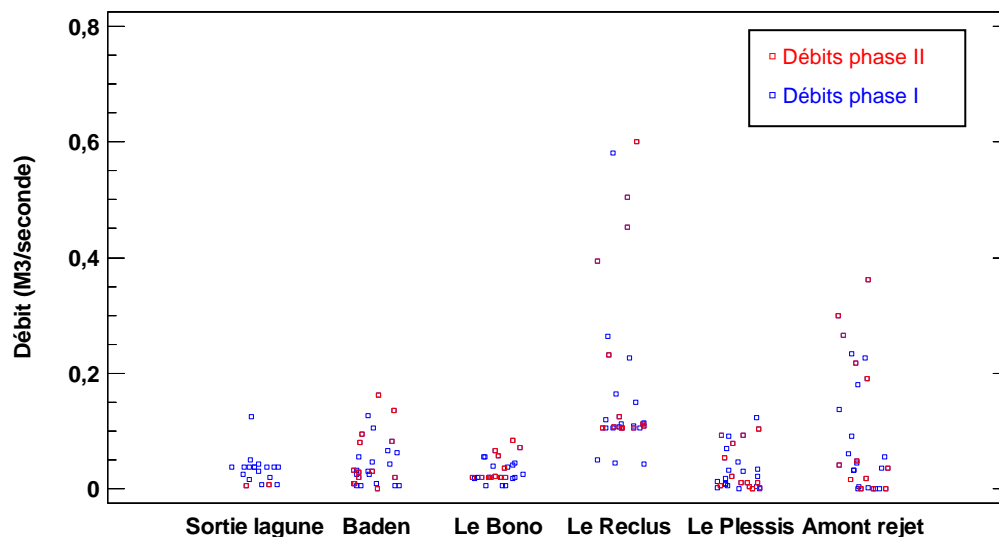


Figure 15 : Débits aux différents exutoires (bleu = phase I, rouge = phase II)

Au cours de l'étude, les exutoires suivis représentent des débits relativement faibles, par rapport à ceux du Loc'h, affluent principal de la rivière d'Auray. En effet, avec la majorité des débits mesurés ou calculés, comprise entre 0 et $0,2 \text{ m}^3/\text{s}$, ils représentent moins d'un centième de ceux du Loc'h ($22 \text{ m}^3/\text{s}$ le 21 décembre 2012 et $30 \text{ m}^3/\text{s}$ le 08 février 2014)

3.3 PERFORMANCES EPURATOIRES DE LA STATION D'EPURATION

3.3.1 Performances épuratoires pour les *E. coli*

La figure 16 représente les concentrations en *E. coli* en entrée et sortie de station d'épuration pour toute la durée de l'étude.

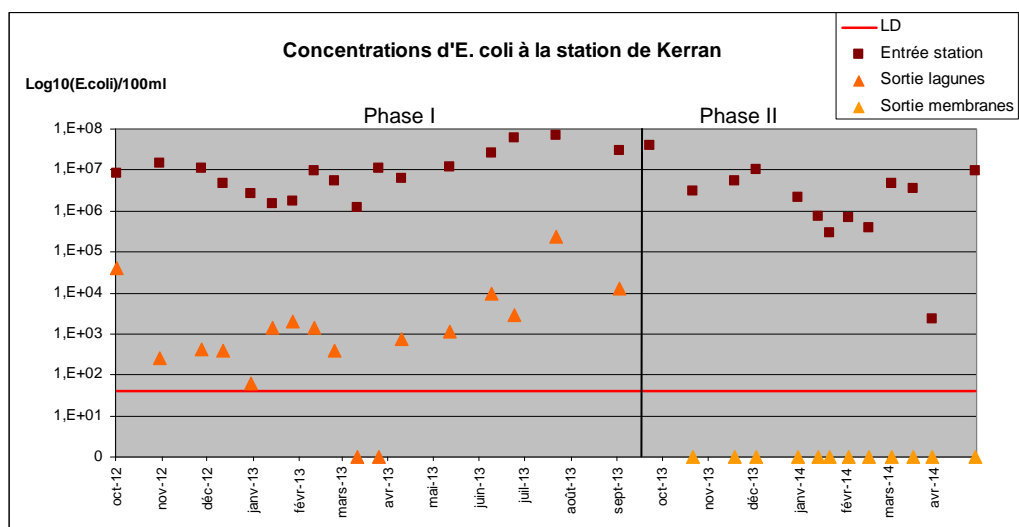


Figure 16 : Concentrations en *E. coli* en entrée et sortie de station d'épuration (les valeurs inférieures à la limite de détection de la méthode sont représentées à « 0 »)

Les concentrations d'*E. coli* en entrée de station d'épuration se situent entre 10^6 et 7×10^7 *E. coli*/100ml d'eau pour la phase I, et entre $2,8 \times 10^5$ et 1×10^7 *E. coli*/100 ml d'eau pour la phase II (à l'exception d'une valeur extrêmement faible de 2×10^3 *E. coli*/100 ml observée le 14 avril 2014). Les concentrations les plus élevées sont observées en période estivale, les valeurs les plus basses se situant au cours du second hiver.

En sortie des lagunes (phase I), les concentrations s'échelonnent de la limite de détection de la méthode (38 *E. coli*/100ml) à $2,4 \times 10^5$ *E. coli*/100 ml, valeur observée le 06 août 2013. La concentration moyenne (moyenne géométrique) est de 1 200 *E. coli*/100 ml d'eau.

L'abattement moyen pour cette filière de traitement, représenté par la différence entre les concentrations en entrée et en sortie de station, est de 3,9 Log d'*E. coli*. Cependant, le temps de séjour estimé des effluents dans les lagunes est de quatre mois. En tenant compte de ce décalage (c'est-à-dire en comparant la concentration d'entrée d'un mois *m* avec la concentration de sortie du mois *m+4*), la performance de la station est légèrement moindre avec un abattement de 3,5 Log d'*E. coli*.

En sortie du système membranaire (phase II), tous les résultats se sont révélés inférieurs au seuil de détection de la méthode (38 *E. coli*/100 ml d'eau). Un résultat est manquant, le 07 octobre 2013 en raison de l'arrêt du système de traitement ce jour là.

L'abattement moyen entre l'entrée et la sortie pour cette nouvelle filière de traitement atteint les 6 Log d'*E. coli*.

3.3.2 Performances épuratoires pour les norovirus

Les résultats des concentrations en NoV en entrée et sortie de station d'épuration sont présentés figure 17.

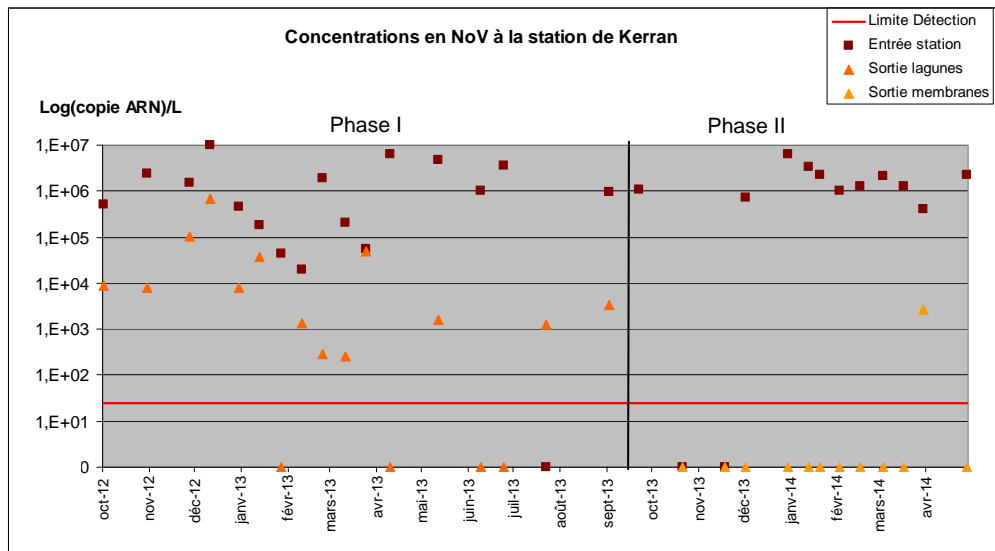


Figure 17 : Concentrations en NoV en entrée et sortie de station d'épuration (les valeurs inférieures à la limite de détection de la méthode sont représentées à « 0 »)

Durant la première phase, les concentrations de NoV en entrée de station d'épuration s'échelonnent de 2×10^4 à 1×10^7 cARN/L. Les concentrations les plus faibles sont observées au mois de février 2013, et les plus élevées en décembre 2012, et avril-mai 2013. En dehors d'un résultat inférieur au seuil de détection de 1 250 cARN/L le 06 août 2013, il n'est pas observé de diminution importante de concentration en NoV en dehors de la période épidémique.

Au cours de la seconde phase, les concentrations de NoV en entrée de station d'épuration sont plus stables, de 4×10^5 à 6×10^6 cARN/L, à l'exception de deux résultats inférieurs au seuil de détection de la méthode en octobre et novembre 2013.

Sur la durée totale de l'étude, la moyenne géométrique des concentrations de NoV en entrée de station d'épuration est de 5×10^5 cARN/L (respectivement $4,8$ et $5,2 \times 10^5$ cARN/L pour les première et seconde phase).

Pour la phase I, les concentrations en sortie de lagune s'échelonnent de 5×10^2 à 7×10^5 cARN/L, avec quatre résultats inférieurs au seuil de détection de la méthode (50 cARN/L). Les concentrations les plus basses sont observées durant les mois d'avril à septembre.

En phase II, à la sortie du système membranaire, tous les résultats sont inférieurs au seuil de détection de la méthode de 50 cARN/L, à l'exception d'un résultat à $2,5 \times 10^3$ cARN/L le 14 avril 2014.

Les abattements en NoV entre l'entrée de la station d'épuration et la sortie des lagunes sont variables au cours de la phase I. Ils sont globalement moins importants durant la période hivernale (abattement de 2 Log d'octobre à mars) que pendant la période printanière avril à août (abattement de 3,5 Log). L'abattement moyen pour cette phase est de 2,6 Log(cARN)/L. En tenant compte du temps de

séjour des effluents dans les lagunes (c'est-à-dire en comparant la concentration d'entrée du mois m avec la concentration de sortie du mois $m+4$), l'abattement est de $3,3 \text{ Log(cARN)/L}$.

Au cours de la phase II, l'abattement moyen devient supérieur à $4,6 \text{ Log (cARN)/L}$, soit un gain d'au moins 2 Log entre les deux phases. Les abattements sont calculés pour chacune des phases en excluant les dates pour lesquelles la concentration en NoV en entrée de station est inférieure au seuil de détection.

3.4 RESULTATS DES ECHANTILLONS D'EAUX

3.4.1 Colimétrie dans les eaux

Les moyennes géométriques ainsi que les écarts-types des concentrations en *E. coli* des six exutoires d'eaux douces pour chaque date de prélèvement sont présentées figure 18.

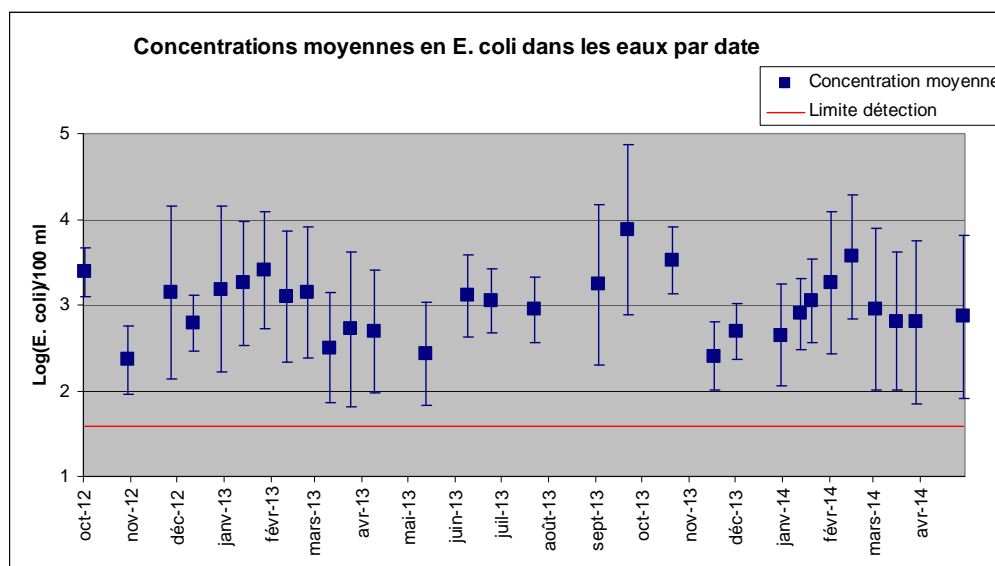


Figure 18 : Concentrations moyennes en *E. coli* et écarts-types dans les eaux par date de prélèvement

Ces moyennes géométriques se répartissent à l'intérieur d'une plage de 1,5 unités Log (2,35 à 3,88). La concentration moyenne la plus basse est observée pour la série de novembre 2012 avec une moyenne de 220 *E. coli*/100 ml d'eau, et la plus élevée en octobre 2013 avec 7 600 *E. coli*/100 ml. Certaines moyennes présentent un écart type très large (jusqu'à 2 unités Log), ce qui est dû aux valeurs élevées observées aux points le Bono et le Reclus.

Les deux années de suivi présentent un profil similaire avec des concentrations élevées en début d'automne, une diminution des concentrations en début d'hiver puis une nouvelle augmentation jusqu'en février. Les deux périodes printanières sont caractérisées par des valeurs relativement basses, mais au cours de la seule période estivale suivie, les concentrations augmentent à nouveau.

Les concentrations moyennes mesurées par point de prélèvement d'eau et par phase sont représentées figure 19, en $\text{Log}_{10} (E. coli)/100 \text{ ml}$ d'eau.

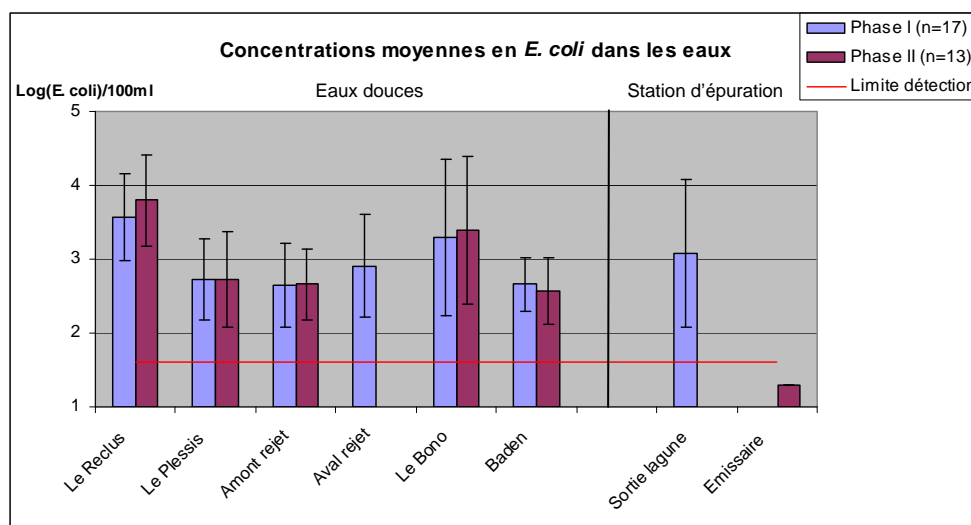


Figure 19 : Concentrations en *E. coli* aux différents exutoires par phase (moyennes et écarts types)

Les concentrations moyennes les plus élevées sont observées aux points Le Reclus et Le Bono pour les deux phases de l'étude. En résultats ponctuels, les concentrations observées sur ces deux points sont également les plus élevées avec des valeurs dépassant les 10 000 *E. coli*/100 mL d'eau dans un tiers des échantillons. La concentration moyenne observée en sortie de la lagune de Kerran au cours de la phase I (environ 1 000 *E. coli*/100 mL) est plus faible, mais avec un écart-type relativement étendu.

Les autres points (Baden, Le Plessis, Amont Rejet et Aval Rejet) se situent à des niveaux inférieurs, que ce soit en moyenne (environ 500 *E. coli*/100 mL d'eau) ou en valeurs maximums qui restent en permanence en dessous des 10 000 *E. coli*/100 mL d'eau.

L'analyse statistique par analyse de variance (Statgraphics®) démontre que les résultats des deux points le Reclus et le Bono, diffèrent significativement des résultats des autres points, par ailleurs homogènes entre eux (LSD 95%).

En phase II, les résultats obtenus au point « Emissaire » sont tous inférieurs au seuil de détection de 38 *E. coli*/100 ml d'eau.

Pour chacun des points suivis durant toute l'étude, aucune différence significative ne peut être mise en évidence entre les résultats des deux phases.

Les résultats des analyses de colimétrie effectuées sur le point supplémentaire « entrée étang » se situent à des concentrations en *E. coli* équivalentes, voire inférieures à celles mesurées dans le ruisseau au point « aval rejet ».

La figure 20 représente les apports de chacun des exutoires en flux d'*E. coli*/M³/seconde.

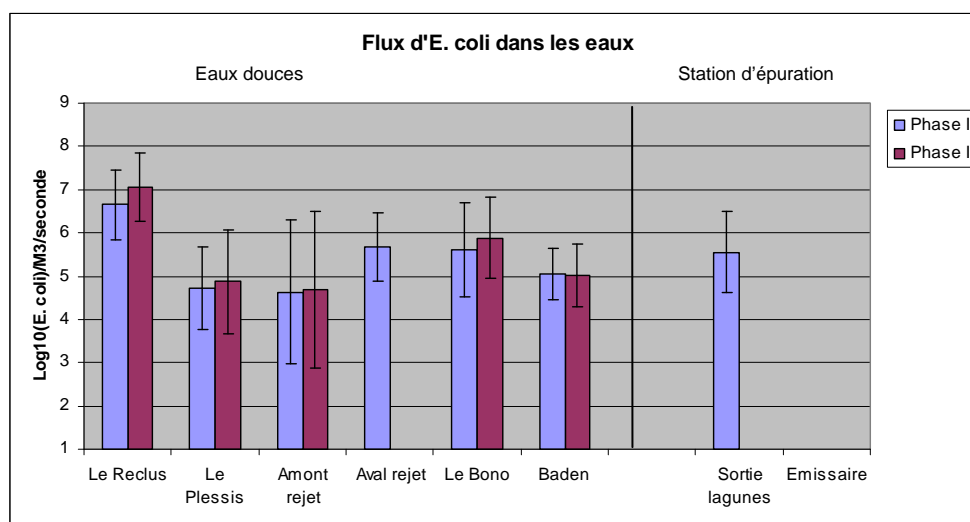


Figure 20 : Flux en *E. coli* aux différents exutoires par phase (moyennes et écarts-types)

Sur les exutoires suivis, le Reclus, qui présente les concentrations ainsi que les débits les plus élevés, est le plus gros contributeur en *E. coli* avec des moyennes géométriques de 4×10^6 et 1×10^7 *E. coli*/M³/seconde pour les phases I et II respectivement. Cependant, ce point est également le plus éloigné des sites de prélèvement de coquillages.

Le Bono est le second contributeur, malgré des débits peu élevés, en raison des concentrations élevées observées sur ce point.

Les lagunes de la station d'épuration représentent le troisième contributeur avec une moyenne géométrique de 3×10^5 *E. coli*/M³/seconde au cours de la première phase.

Les points Amont Rejet et le Plessis présentent les flux les plus faibles avec une moyenne géométrique de respectivement 4×10^4 et 5×10^4 *E. coli*/M³/seconde pour la première phase, et de 5×10^4 et 7×10^4 *E. coli*/M³/seconde pour la seconde phase.

Sur les sites étudiés, les apports en *E. coli* sont donc en diminution pour la phase II en raison de l'arrêt d'émission de la station d'épuration de Kerran, en revanche les apports restent stables pour les autres exutoires étudiés.

3.4.2 Norovirus dans les eaux

Les résultats de NoV dans les eaux des différents exutoires ainsi que dans le rejet des lagunes sont présentés par classe de concentration dans le tableau II. Au cours de la phase II, aucun échantillon positif en NoV n'a été détecté pour les différents exutoires.

Le faible nombre d'échantillons positifs obtenu au cours de la phase I ne permet pas une comparaison statistique des concentrations obtenues sur chaque point.

Tableau II : Résultats de NoV par classe de concentration dans les eaux par date et point de prélèvement

Année		2012							2013							Nb +	% +			
Date		16/10	14/11	12/12	26/12	14/01	28/01	11/02	25/02	11/03	26/03	08/04	24/04	27/05	24/06			09/07	06/08	17/09
Phase I	Sortie Lagunes (*)																		13	76
	Le Reclus (*)																		8	50
	Le Plessis (**)																		3	18
	Amont Rejet (**)																		5	29
	Aval Rejet (*)																		3	18
	Le Bono (*)																		0	0
	Anse de Baden (*)																		4	29
	Entrée Etang (*)																			
	Sortie Etang (*)																			
Année		2013							2014											
Date		07/10	05/11	03/12	17/12	14/01	28/01	04/02	17/02	03/03	18/03	01/04	14/04	13/05						
Phase II	Emissaire (*)																			
	Le Reclus (*)																			
	Le Plessis (**)																			
	Amont Rejet (**)																			
	Le Bono (*)																			
	Anse de Baden (*)																			
	Entrée Etang (*)																			
	Sortie Etang (*)																			

(*) : LQ = 50 cARN/L	< LQ	
(**) : LQ = 1250 cARN/L	10 ² à 10 ³ cARN/L	
	10 ³ à 10 ⁴ cARN/L	
	10 ⁴ à 10 ⁵ cARN/L	
	10 ⁵ à 10 ⁶ cARN/L	
	10 ⁶ à 10 ⁷ cARN/L	

Les NoV sont détectés dans les exutoires à partir du mois de novembre 2012 jusqu'au mois de juin 2013 selon une fréquence très irrégulière. Durant la période de plus forte épidémie (décembre-janvier), ni le nombre d'échantillons positifs, ni les concentrations observées ne sont en augmentation notable. Au total, environ 22 % des échantillons analysés dans les exutoires sont positifs.

Le point le Reclus pour lequel le maximum d'échantillons positifs est observé (8 sur 16), présente également le maximum de concentration à $1,6 \times 10^6$ cARN/L au mois de décembre 2012. Cependant les autres valeurs sur ce point sont relativement faibles en NoV, inférieures à 4×10^3 cARN/L.

Au point Amont rejet ainsi qu'au Plessis, pour les échantillons positifs tous les résultats de concentration en NoV sont élevés, cependant les analyses ont été réalisées sans phase de concentration, ce qui augmente la limite de détection des NoV à $2,5 \times 10^3$ cARN/L (cf § 2.5.2.4). Une concentration particulièrement élevée en NoV ($1,3 \times 10^6$ cARN/L) est observée au mois de juin 2013 au point Amont rejet, en dehors de la période épidémique.

Sur le point Aval rejet, seulement 3 échantillons sont positifs avec des concentrations relativement faibles, malgré l'apport venant des lagunes de la station d'épuration.

Au Plessis, trois échantillons sont positifs en mars et avril 2013, avec des concentrations assez élevées. Les concentrations les plus faibles sont observées pour le point Anse de Baden avec 4 valeurs positives toutes inférieures à 10^3 cARN/L.

Au Bono, malgré une contamination importante en *E. coli*, aucun échantillon positif en NoV n'est détecté.

Les résultats obtenus dans les étangs d'eau douce montrent la présence ponctuelle de NoV avec un seul résultat positif à $7,4 \times 10^3$ cARN/L au point « sortie étang » le 25 février 2013.

En comparaison de ces résultats sur les exutoires, les échantillons prélevés en sortie des lagunes de la station d'épuration se caractérisent par une fréquence plus élevée d'échantillons positifs (13 sur 17) et une plage de valeurs très large de $2,6 \times 10^2$ à 7×10^5 cARN/L, mais se situant dans la même gamme de concentration.

3.5 RESULTATS COQUILLAGES

3.5.1 Colimétrie dans les coquillages

La figure 21 présente les concentrations moyennes en *E. coli* dans les six points coquillages par date de prélèvement.

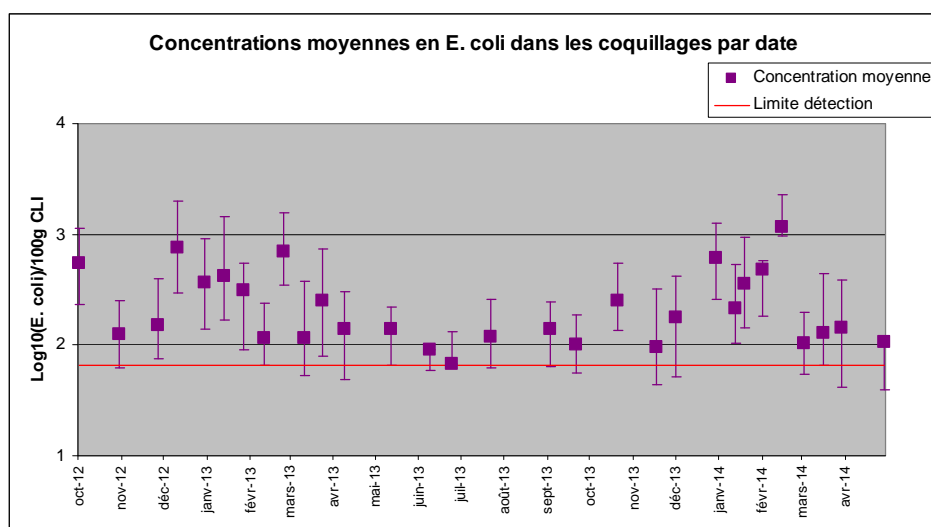


Figure 21 : Concentrations moyennes en *E. coli* et écarts-types dans les coquillages par date de prélèvement

Les moyennes géométriques sont comprises entre la limite de détection de la méthode 67 *E. coli*/100g CLI (1,82 Log) observé en juillet 2013, et 1 260 *E. coli*/100g CLI (3,1 Log) en mars 2014. Les écarts types sont relativement faibles (inférieurs à 1 unité Log) ce qui traduit une homogénéité de la contamination dans la zone d'étude. Une saisonnalité dans les concentrations peut être observée avec des valeurs plus élevées lors des deux périodes hivernales et des valeurs plus faibles en période estivale.

Les moyennes géométriques et écarts-types de colimétrie dans les coquillages pour chacune des phases et chacun des points de prélèvement sont présentés figure 22. En raison de la forte saisonnalité et de l'absence de suivi en période estivale en phase II, les résultats des mois de juin à septembre n'ont pas été utilisés dans ce graphique (13 valeurs par phase).

Les moyennes géométriques observées au Roch dû pour les phases I et II (respectivement 350 et 460 *E. coli*/100 g CLI) sont légèrement supérieures à celles des autres points, cependant, il n'existe aucune différence statistique significative entre les résultats des six points de prélèvement (différences de Fischer LSD au niveau de confiance 95 %). Les valeurs obtenues sur le point supplémentaire en sortie d'étang sont proches de celles obtenues sur le point Roch dû.

Aucune différence significative des concentrations moyennes en *E. coli* ne peut être mise en évidence entre les deux phases de l'étude quel que soit le point de prélèvement.

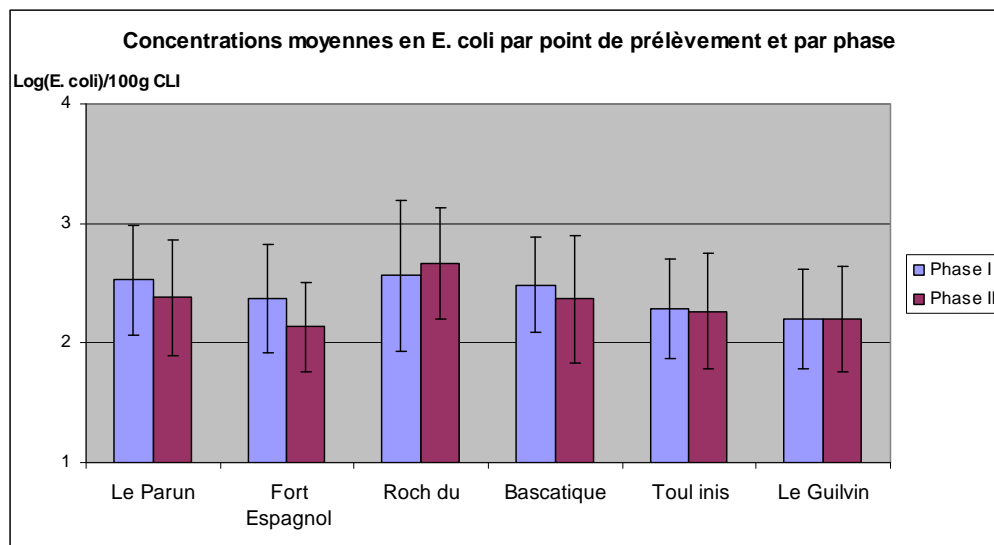


Figure 22 : Concentrations en E. coli dans les coquillages par phase et point de prélèvement (moyennes et écarts types)

3.5.2 Norovirus dans les coquillages

Les résultats de NoV par classe de concentration pour chaque date de prélèvement sont présentés dans le tableau III. Contrairement à ce qui a été observé dans les eaux, les échantillons positifs ainsi que les fortes concentrations en NoV sont regroupés durant les deux saisons épidémiques.

Pour la phase I, l'apparition d'échantillons positifs intervient à partir du 13 décembre 2012 et se prolonge jusqu'au mois de mai 2013, si l'on excepte deux valeurs très basses observées en juillet et août sur les points Roch dû et Fort Espagnol respectivement. Les concentrations maximales sont principalement observées en janvier et février 2013 sur l'ensemble des points de prélèvement.

Pour la phase II, l'apparition d'échantillons positifs intervient seulement à partir du 15 janvier 2014, soit un mois plus tard que lors de la phase I, et la disparition est également plus précoce, avec la présence d'un seul échantillon positif dès le 19 mars 2014.

Les résultats obtenus en sortie d'étang sont globalement conformes à ceux des autres sites, à l'exception du 26 février 2013 où une valeur légèrement plus élevée est observée sur ce point ($1,5 \times 10^3$ cARN/gTD) par rapport aux autres résultats compris entre 10^2 et 10^3 cARN/gTD.

Sur l'ensemble des résultats obtenus, 75 échantillons sont positifs, soit un pourcentage global de 42 %.

Tableau III : Résultats de NoV par classe de concentration dans les coquillages par date et point de prélèvement

	Année		2012													2013													Nb +	% + (n=13)*
	Date		17/10	15/11	13/12	27/12	15/01	29/01	12/02	26/02	12/03	27/03	09/04	25/04	28/05	25/06	10/07	07/08	18/09											
Phase I	Le Parun																			9	69									
	Fort Espagnol																			10	69									
	Roc'h du																			11	77									
	Bascatique																			5	38									
	Toul inis																			7	54									
	Le Guilvin																			7	54									
	Etang																													

	Année		2013				2014										Nb +	% +
	Date		08/10	06/11	04/12	18/12	15/01	29/01	05/02	18/02	04/03	19/03	02/04	15/04	14/05			
Phase II	Le Parun															5	38	
	Fort Espagnol															4	31	
	Roc'h du															4	31	
	Bascatique															4	31	
	Toul inis															3	23	
	Le Guilvin															6	46	
	Etang																	

< LQ (50 cARN/gTD)	Vert clair
LQ à 10^2 cARN/gTD	Vert
10^2 à 10^3 cARN/gTD	Orange
10^3 à 10^4 cARN/gTD	Rouge
10^4 à 10^5 cARN/gTD	Rouge foncé

(* : Le pourcentage de résultats positifs pour la première phase est calculé sur les valeurs jusqu'à fin mai)

Pour la première phase seule, le pourcentage d'échantillons positifs est de 60 %, et 33 % pour la seconde. En raison du nombre plus important de résultats acquis en première phase en période non épidémique, et afin de comparer les résultats entre les phases, seuls les résultats d'octobre à mai ont été retenus dans ce calcul pour chacune des phases (13 valeurs).

Le nombre d'échantillons positifs par phase (résultats d'octobre à mai) sur chaque point de prélèvement est présenté figure 23.

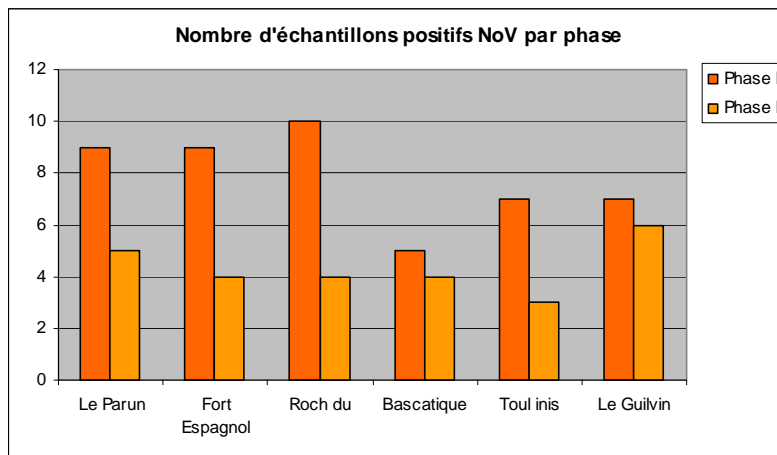


Figure 23 : Nombre d'échantillons positifs en NoV par site et par phase (sur 13 valeurs par phase pour chaque site)

Pour la phase I, le nombre d'échantillons positifs varie d'un minimum de 5 à Bascatique, à un maximum de 10 au Roch dû. Le nombre de positifs est plus élevé sur les trois points situés en amont du rejet (Le Parun, Fort Espagnol et le Roch dû).

Pour la phase II, le nombre d'échantillons positifs est plus faible sur tous les points avec un minimum de 3 à Toul inis et un maximum de 6 au Guilvin.

La baisse du nombre d'échantillons positifs entre les deux phases n'est pas homogène sur tous les points, elle est plus importante au Roch dû, à Toul inis et à Fort Espagnol (diminution de plus de la moitié) qu'à Bascatique ou au Guilvin où une diminution d'un seul échantillon est observée.

Les concentrations en NoV par point de prélèvement en fonction de la phase sont représentées figure 24.

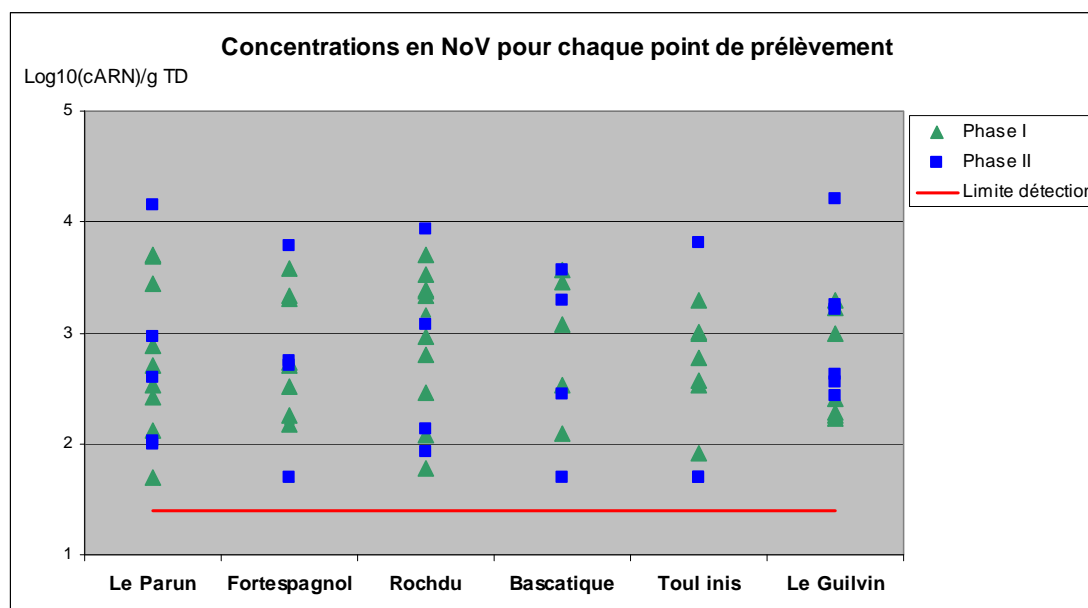


Figure 24 : Concentrations en NoV par point de prélèvement (les résultats inférieurs à la limite de détection de la méthode ne sont pas représentés sur ce graphique)

Ces résultats montrent une variabilité importante des valeurs observées, quel que soit le point de prélèvement, avec des résultats situés entre la limite de quantification de la méthode (non représentés sur ce graphique), soit 50 cARN/g TD (5×10^1) et un maximum de 16 200 cARN/g TD ($1,6 \times 10^4$) observé au Guilvin au cours de la phase II, le 18/02/2014.

Aucune différence statistique (analyse de variance) des concentrations en NoV ne peut être mise en évidence entre les différents points de prélèvement. Le point Roch dû, situé au plus près du rejet de la station d'épuration ne présente pas de concentrations plus élevées que les autres points. Au Guilvin, à l'exception de la valeur observée le 18/02/2014, les concentrations en NoV sont légèrement inférieures à celles des autres points.

Bien que le nombre d'échantillons positifs soit plus faible au cours de la phase II, les valeurs observées se situent dans des gammes de concentration équivalentes à celles de la première phase.

La figure 25 présente les concentrations moyennes des six points de prélèvement observées pour chaque date, ainsi que le nombre hebdomadaire d'appels à SOS médecins Lorient et Vannes, au cours de l'étude.

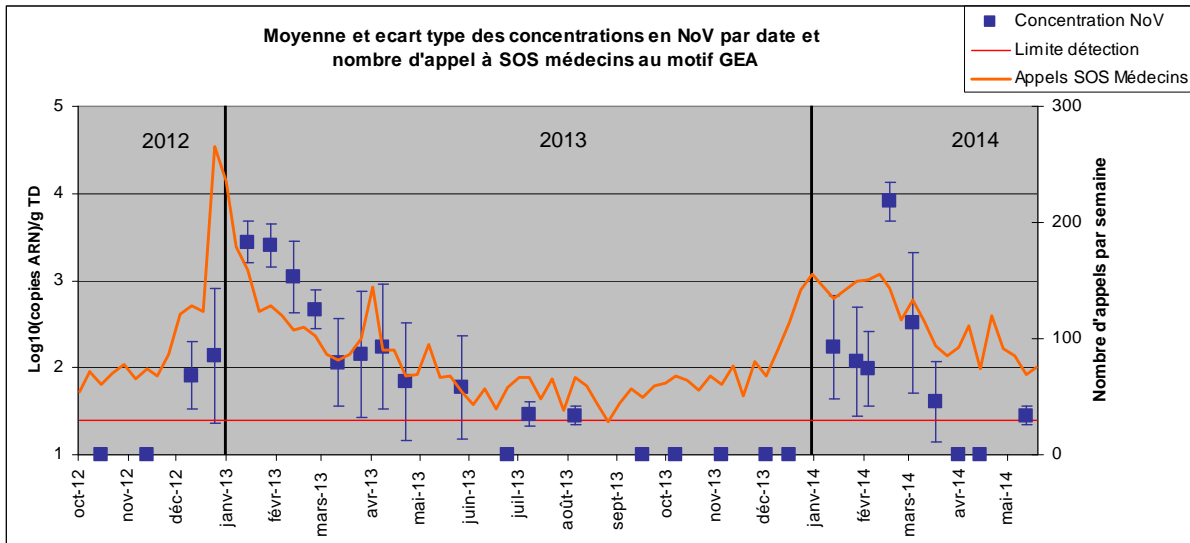


Figure 25 : Concentrations moyennes en NoV dans les coquillages par date de prélèvement et appels à SOS médecins (source base « SURSAUD »)

Au cours de la première saison hivernale (phase I) les concentrations augmentent avec l'apparition des gastroentérites dans la population dès le mois de décembre 2012. Les concentrations moyennes en NoV dans les coquillages sont maximales au cours du mois de janvier 2013 ($2,5 \times 10^3$ cARN/g TD) légèrement en décalage par rapport au maximum de l'épidémie observé fin décembre (265 appels hebdomadaires). Elles décroissent ensuite régulièrement jusqu'à atteindre des moyennes en dessous, ou proches de la limite de détection à partir du mois de juin.

Au cours de la seconde phase, l'augmentation des concentrations moyennes en NoV dans les coquillages est observée à partir de la série de mi-janvier 2014, suite à l'apparition de l'épidémie fin décembre 2013. Les concentrations moyennes observées au cours de cette seconde période épidémique sont pour la plupart moins élevées que celles de la première phase (< 3 U Log), mais les nombres d'appels maximums sont également plus faibles, ne dépassant pas ou très peu les 150 appels hebdomadaires. La décontamination dans les coquillages est nettement plus rapide pour cette seconde phase avec un délai entre la contamination maximale observée et le retour à une moyenne inférieure à la LD de 6 semaines, contre 21 semaines pour la première phase.

Une concentration moyenne en NoV particulièrement élevée est observée le 18 février 2014 (8×10^3 cARN/gTD). Après une prise d'informations auprès de l'exploitant des réseaux d'assainissement, il apparaît que la première quinzaine de février a connu de nombreux incidents sur le réseau (passages en surverse de quelques heures à quelques jours d'une dizaine de postes de relèvement sur le secteur) en raison des fortes pluies observées à cette période.

3.6 MODELISATION

La période retenue pour la modélisation (15/12/2012 au 15/01/2013) se situe au cours de l'épidémie hivernale de GEA de la première phase de l'étude, et à une période de forte pluviométrie, donc de forts débits. En raison du manque de données pour calculer des flux de NoV au cours de la seconde année de suivi, la modélisation n'a pas pu être réalisée pour la phase II.

Il a été décidé d'utiliser, pour le calcul des flux, la concentration maximum observée au cours de la phase I pour chacun des exutoires (même lorsque cette concentration était obtenue en dehors de la période choisie pour la modélisation). L'exutoire du Bono n'a pas été modélisé en raison de l'absence de détection de NoV, et pour le site du rejet, en raison des résultats peu élevés sur le point « Aval rejet » seul le flux en sortie de lagunes a été retenu. La modélisation reproduit ainsi une **situation théorique** particulièrement **défavorable** sur les exutoires considérés.

Les résultats (figure 26) représentent le panache maximum de chacun des quatre rejets étudiés, correspondant à la concentration maximale de NoV (en cARN/l) dans l'eau de mer pour chaque maille du modèle, observée au cours de la période de simulation.

Les résultats montrent un impact très limité de l'exutoire « Anse de Baden » sur la zone d'étude (concentration < 100 cARN/l). Le panache de l'exutoire du Plessis est plus important, cependant, il se situe essentiellement en amont de la rivière d'Auray. Les concentrations maximum théoriques obtenues dans l'eau de mer sont homogènes au niveau des sites de prélèvement de coquillages (250 à 500 cARN/l), à l'exception du Guilvin où les concentrations sont légèrement inférieures (100 à 250 cARN/l).

Le panache issu des lagunes de la station de Kerran touche essentiellement la rive droite de la rivière d'Auray. Les concentrations maximales théoriques générées par ce rejet peuvent atteindre 10 000 cARN/l au niveau du point de prélèvement de coquillages du Roch dû. Les concentrations diminuent rapidement et ne sont plus que de 2 500 cARN/l au niveau de Toul inis, et 1 000 cARN/l pour les sites de Fort Espagnol, le Parun et Bascatique.

Parmi les exutoires étudiés, celui du Reclus est celui qui impacte le plus la zone d'étude avec des concentrations maximales dans la gamme 2 500 à 10 000 cARN/l pour les sites de prélèvement de coquillages les plus en amont. De même que pour les autres exutoires, les concentrations au niveau du Guilvin restent inférieures, se situant dans la gamme 1 000 à 2 500 cARN/l.

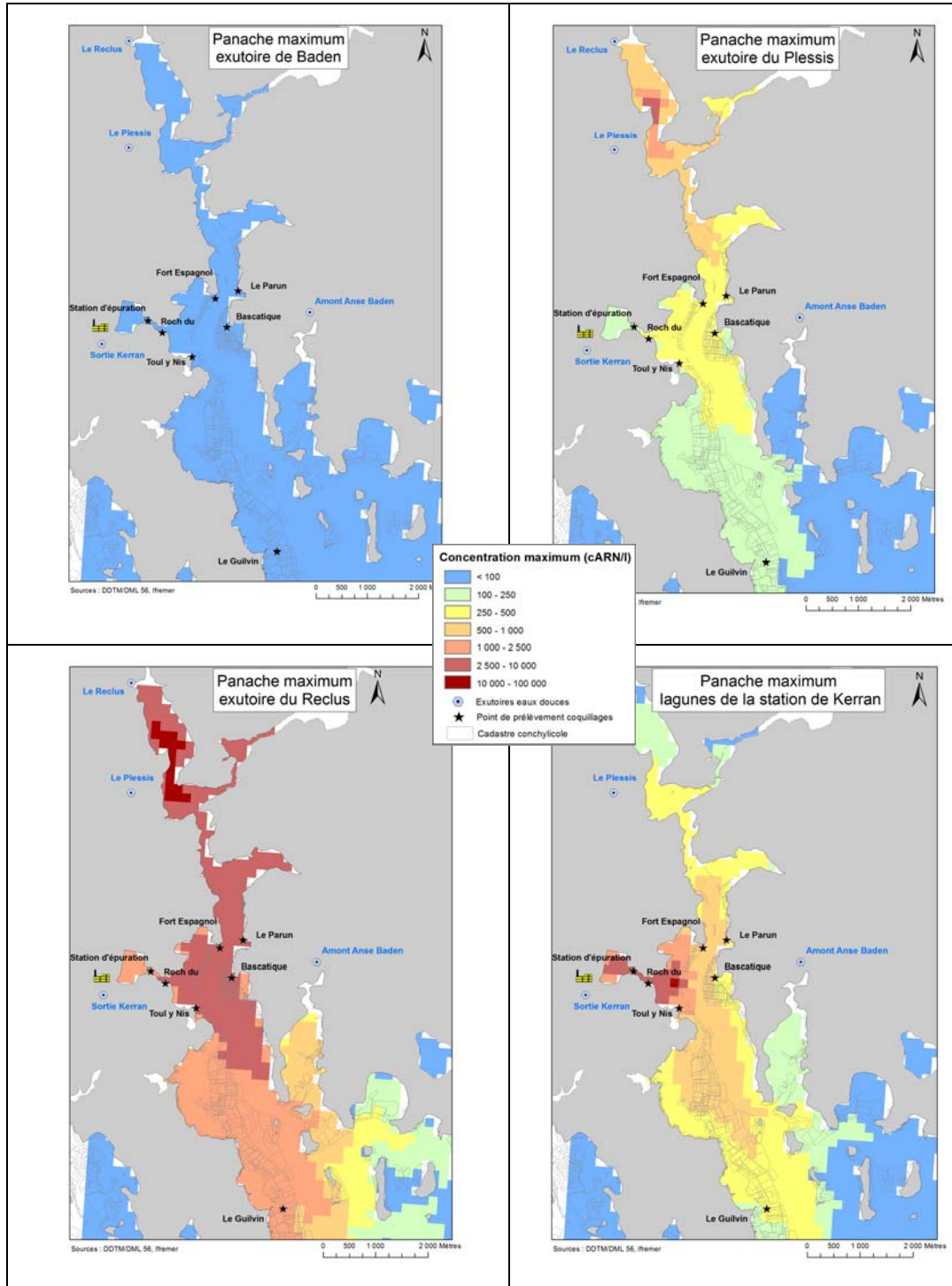


Figure 26 : Panache maximum de chacun des exutoires au cours de la période 15/12/2012-15/01/2013

4 DISCUSSION

De nombreux résultats ont été obtenus au cours de cette étude, tant sur les performances épuratoires de la station de Kerran que sur la présence de NoV dans certains exutoires littoraux ainsi que dans les huîtres en élevage en rivière d'Auray.

La nouvelle filière de traitement des eaux usées à réacteur membranaire a permis d'améliorer considérablement la qualité du rejet de la station. D'un abattement de 4 unités Log pour les *E. coli* en traitement lagunaire, performances déjà observées sur d'autres stations régionales du même type (Camus et Bonnetot, 2005), le nouveau traitement à réacteur membranaire permet de dépasser les 6 unités Log d'abattement entre les eaux brutes et traitées. Ces résultats correspondent à ceux obtenus par plusieurs travaux sur l'efficacité du traitement membranaire (Van den Akker *et al.*, 2014 ; Sima *et al.*, 2011 ; Marti *et al.*, 2011 ; Zanetti *et al.*, 2010). L'obtention de tels abattements avec la nouvelle filière permet d'obtenir un flux négligeable en *E. coli* avec le nouvel émissaire directement localisé dans l'étier. Si au cours de la première phase, le flux d'*E. coli* en sortie des lagunes n'est pas majoritaire par rapport aux autres exutoires suivis, l'amélioration de la qualité du rejet lors de la seconde phase, avec des apports quasi nuls, n'apporte aucune amélioration significative sur les concentrations d'*E. coli* des huîtres de la zone de production, y compris des huîtres du Roch dû, les plus proches du nouvel émissaire. Les résultats obtenus sur le paramètre *E. coli*, pour les autres exutoires et les huîtres en élevage, témoignent d'une contamination générale du secteur d'étude. Les flux observés sur les sites du Reclus, du Plessis et de l'Anse de Baden sont similaires à ceux précédemment obtenus (Allenou *et al.*, 2012). Ces deux années d'étude montrent que l'exutoire pluvial du Bono émet la plupart du temps un flux important en *E. coli*, ce qui est particulièrement préoccupant. Il est important de noter également que la qualité bactériologique du ruisseau avant l'apport de la station de traitement lagunaire est déjà fortement dégradée.

Tous les apports littoraux n'ont pu être suivis au cours de cette étude, mais les apports en *E. coli* proviennent de diverses origines humaines (stations d'épuration, réseaux d'assainissement non fiables, rejets d'assainissement non collectif (ANC), erreurs de branchements, dysfonctionnements...) et animales (épandages, abreuvement direct d'animaux dans les cours d'eau, fosses non étanches, ...). La rivière d'Auray est potentiellement impactée par l'ensemble de ces sources en *E. coli*, alors que le rejet de la nouvelle station de Kerran ne représente plus d'impact majeur sur la zone. Les conclusions d'études antérieures, par modélisation visant à identifier toutes les sources de contamination microbologique en zone conchylicole ont démontré que des contaminations locales, non identifiées, sont certainement à l'origine des pics et niveaux de concentration en *E. coli* observés sur les coquillages (Allenou *et al.*, 2012 ; Tréguier & Hitier, 2013).

Concernant les NoV, les performances de la station de Kerran passent de 3 Log/L avec la filière lagunaire, comme décrit auparavant (Da Silva *et al.*, 2007, Collet, 2012), à près de 5 Log/L avec le traitement par réacteur membranaire. Les résultats obtenus par la nouvelle filière confirment ceux déjà obtenus lors d'études précédentes (Francy *et al.*, 2012 ; Simmons *et al.*, 2011 ; Sima *et al.*, 2011). Cependant, comme déjà démontré aux Etats-Unis (Simmons *et al.*, 2011), la variabilité des concentrations en NoV des eaux brutes est importante au fil des mois et années. Il est important de signaler qu'au cours de la saison estivale, c'est à dire hors période d'épidémie GEA identifiée par les médecins sentinelles dans la population, il n'a pas été observé de baisse significative des concentrations de NoV en entrée de station. Lors d'une autre étude, Nordgren *et al.* (2009) avaient constaté la prédominance de NoVGII en période hivernale, et la prédominance de NoVGI en période estivale. La technique analytique utilisée dans notre étude ne permet pas cette discrimination mais constitue une approche plus globale des NoV incluant les NoV GIV.

Lors du traitement par réacteur membranaire, la porosité des membranes est supérieure à la taille des virus, et ceux-ci sont probablement bloqués par la présence de biofilms se formant à la surface des membranes (Da Silva *et al.*, 2007). Cependant le résultat des eaux traitées d'avril 2014, en l'absence de travaux de maintenance sur les membranes et de dysfonctionnement connu du traitement (Saur, Comm. Pers.), montre qu'il est important de considérer que le passage de particules virales est néanmoins possible.

La détection des NoV dans les eaux douces s'est révélée relativement difficile en raison de l'échantillonnage de faible volume et de la présence de nombreux inhibiteurs de PCR. L'optimisation des étapes de concentration mise en œuvre pour cette étude a permis de lever en partie l'inhibition de certains échantillons, mais ceci au détriment de la sensibilité de la méthode. Le choix d'un prélèvement ponctuel réalisé sur ces apports rend la détection des NoV plus difficile en cas de contamination sporadique du milieu, par rapport à un échantillonnage moyen sur 24 heures. Ces réserves méthodologiques doivent être considérées pour l'interprétation des résultats. La présence des NoV dans les eaux superficielles est très irrégulière au cours de la première phase (22 % d'échantillons positifs) et, selon les exutoires, ne semble pas être corrélée systématiquement au pic épidémique GEA dans la population. Victoria *et al.* (2010) avaient obtenu des résultats similaires au cours d'une étude réalisée sur une année entière, tandis qu'Ueki *et al.* (2005) avaient trouvé des fréquences plus importantes, mais sur un nombre limité d'échantillons. Le pourcentage élevé d'échantillons positifs obtenu à l'exutoire du Reclus peut s'expliquer par la présence du rejet de la station de traitement des eaux usées d'Auray (boues activées). Par contre, l'absence de détection systématique des NoV dans les eaux superficielles, y compris en période épidémique GEA a déjà été observée dans d'autres secteurs (Le Saux *et al.*, 2011 ; Collet, 2012). Sur la base de la première phase, au cours de laquelle l'épidémie GEA a été la plus importante, nous constatons que l'ensemble des exutoires est contaminé par des apports humains, excepté le pluvial du Bono. Les résultats négatifs en NoV au niveau de ce dernier, malgré des contaminations importantes en *E. coli* peuvent suggérer une origine non humaine de cette contamination fécale, correspondant aux caractéristiques d'un exutoire de type pluvial. L'utilisation sur ce rejet, de marqueurs de source bactérienne pourrait être envisagée pour confirmer cette hypothèse, selon les méthodes utilisées en rivière de Daoulas (Mauffret *et al.*, 2012). A l'inverse, les concentrations élevées en NoV obtenues sur le ruisseau en amont du rejet des lagunes et au Plessis, démontrent que ces sites sont fortement contaminés par des apports d'origine humaine. Peu d'études rapportent des résultats de quantification de NoV dans des eaux douces. Lodder & de Roda Husman (2005) ont relevé des concentrations de NoV toutes inférieures à 4 unités Log/L dans des eaux de rivière aux Pays Bas avec des prélèvements effectués sur de grands volumes (200 à 600 litres). L'absence de détection de NoV dans les exutoires au cours de la seconde phase de l'étude peut s'expliquer par la plus faible ampleur de l'épidémie hivernale de GEA dans la population, associée à une forte dilution engendrée par les niveaux importants de pluviométrie enregistrés aux mois de janvier et février 2014, et en considérant les problèmes d'échantillonnage et analytiques mentionnés ci-dessus.

Les résultats obtenus dans les eaux douces suivies au cours de cette étude ne permettent pas d'effectuer une comparaison statistique entre les flux de NoV émis par les différents exutoires. Une approche de hiérarchisation des flux de NoV, telle que réalisée pour les *E. coli* à Penerf (Tréguier & Hitier, 2013) ou dans les chenaux du Payré (Thomas *et al.*, 2011-b), n'est pas non plus envisageable. Cependant, les résultats de la modélisation hydrodynamique indiquent que l'exutoire du Reclus, le plus en amont des apports suivis, est celui qui induit potentiellement le panache de concentration en NoV le plus important sur la zone d'étude.

La présence des NoVs dans les coquillages semble mieux refléter l'épidémiologie de GEA observée dans la population que dans les eaux. La saisonnalité marquée de fin d'hiver/début de printemps a également été observée lors de plusieurs études précédentes (Suffredini *et al.*, 2012 ; Lowther *et al.*, 2012 ; Schaeffer *et al.*, 2013). La fréquence d'échantillons positifs (42 % pour l'ensemble de l'étude) est

inférieure à celle trouvée par Suffredini *et al.* (2014) en Italie, mais au cours d'une seule année de suivi (51,4 %). Cette fréquence peut différer d'un site à l'autre, selon l'espèce de coquillages, les conditions environnementales et l'ampleur de l'épidémie hivernale GEA dans la population. Au cours de la seconde phase, nous observons une baisse significative de 27 % d'échantillons positifs en NoV. Cependant au vu de la répartition et des niveaux de concentration des sites contaminés, cette diminution est probablement liée essentiellement à la faible ampleur de l'épidémie GEA dans la population, le second hiver. En considérant les valeurs moyennes de concentration en NoV des six points de coquillages, les contaminations maximales observées au cours de la première phase, sont équivalentes à celles observées en Irlande (Flannery *et al.*, 2012) et en Italie (Suffredini *et al.*, 2014). Cependant la valeur maximale obtenue au cours de l'étude sur le point Guilvin au cours de la seconde phase (environ 10^4 cARN/g TD) reste inférieure aux maximums d'environ 10^5 cARN/g TD relevés par Flannery (2012), ou par le suivi effectué par l'Agence Régionale de Santé dans la Manche (Collet, 2012). A noter qu'au cours du mois de février 2014, de fortes pluviométries ont engendré de nombreux incidents sur les réseaux d'assainissement littoraux pouvant conduire à des débordements d'eaux usées brutes, qui peuvent expliquer ce niveau élevé au Guilvin. Les résultats de cette période confirment ainsi que les rejets de stations d'épuration ne sont pas les seules sources d'apports de NoV vers le milieu, les dysfonctionnements des réseaux d'assainissement sont souvent de forts contributeurs en période GEA (Thomas *et al.*, 2011-a).

La sélection et la persistance des NoV dans les tissus de coquillage est partiellement expliquée par la présence de ligand spécifique (Le Guyader *et al.*, 2013). Les huîtres ne sont pas simplement des filtres passifs, mais elles peuvent sélectionner certaines souches de NoV grâce à ces ligands spécifiques situés au niveau des tissus digestifs. Les variations importantes de contamination observées dans les huîtres, suggèrent éventuellement un possible biais d'échantillonnage et de prise d'essai de la méthode, et montre une nouvelle fois la difficulté de l'approche quantitative de la technique analytique.

5 CONCLUSION

Les abattements obtenus sur les paramètres *E. coli* et NoV par la filière d'épuration membranaire permettent une amélioration considérable de la qualité du rejet de la nouvelle station de Kerran. Ces bonnes performances sont un atout considérable pour la qualité de la zone d'élevage de la rivière d'Auray.

Cependant, les apports en *E. coli* des autres exutoires suivis (y compris en amont du rejet des lagunes) contribuent également aux contaminations observées sur la zone de production conchylicole au cours des deux phases d'étude. Les résultats obtenus sur les NoV confirment cette observation, et démontrent que la plupart des apports sont contaminés entre autres par des rejets d'origine humaine, excepté à priori celui du Bono.

La quasi suppression d'apports en *E. coli* et en NoV de la station de traitement de Kerran ne peut à elle seule permettre une amélioration visible de la contamination des coquillages. La poursuite du suivi des NoV dans les coquillages permettrait de vérifier l'impact de l'amélioration du rejet, dans d'autres conditions environnementales et épidémiques.

Les gains de réduction en *E. coli* et NoV obtenus avec la filière membranaire de traitement des eaux usées ne doit pas dispenser de l'amélioration, du point de vue microbiologique, de l'ensemble des émissaires littoraux de cette zone conchylicole, afin de préserver à plus long terme sa qualité sanitaire. Dans ce but, un travail de connaissance et de réduction des autres sources de contamination microbiologique est en cours par le Syndicat Mixte du Loc'h et du Sal (SMLS).

BIBLIOGRAPHIE

- Allenou J.P., Hitier B., Stanisiere J.Y.**, 2012. Modélisation de l'impact bactériologique des bassins versants de la rivière d'Auray. Rapport de contrat, 62 p.
- Atmar R.L.**, 2010. Noroviruses - State of the Art. *Food Environ Virol* 2 : 117-126
- Campos C.J., Lees D.N.**, 2014. Environmental transmission of human noroviruses in shellfish waters. *Appl. Environ. Microbiol.*, 80, 3552-3561.
- Camus P. et S. Bonnetot**, 2005. Quantification et impacts sur le Golfe du Morbihan des rejets des stations d'épuration du S.I.A.E.P. de la région de Vannes-Ouest. Rapport de contrat, 31 p.
- Collet N.**, 2012. Virus entériques et transmission hydrique : méthodes analytiques, efficacités des filières d'épuration et contamination sur les sites littoraux avec coquillages. Mémoire de master 2 Microbiologie Environnementale et Sanitaire, 30 p.
- Costafreda M.I., Bosch A., Pinto R.M.**, 2006. Development, evaluation, and standardization of a real-time TaqMan reverse transcription-PCR assay for quantification of hepatitis A virus in clinical and shellfish samples. *Appl. Environ. Microbiol.*, 72, 3846-3855.
- Da Silva AK, Le Saux JC, Parnaudeau S, Pommepuy M, Elimelech M, Le Guyader FS**, 2007. Evaluation of removal of noroviruses during wastewater treatment, using real-time reverse transcription-PCR: different behaviors of genogroups I and II. *Appl Environ Microbiol.* 73 :7891-7897.
- Da Silva AK, Le Guyader FS, Le Saux JC, Pommepuy M, Montgomery MA, Elimelech M.** 2008. Norovirus removal and particle association in a waste stabilization pond. *Environ Sci Technol.* 42(24): 9151-7.
- EFSA**, 2011. Scientific opinion on an update on the present knowledge on the occurrence and control of foodborne viruses. *EFSA J* 2011 ; 9 : 2190. doi: 10.2903/j.efsa.2011.2190
- Flannery J, Keaveney S, Rajko-Nenow P, O'Flaherty V, Doré W.**, 2012. Concentration of norovirus during wastewater treatment and its impact on oyster contamination. *Appl Environ Microbiol.* 78 : 3400-6
- Francy D.S., Erin A Stelzer, Rebecca N. Bushon, Amie M.G. Brady, Ashley G. Williston, Kimberly R. Riddell, Mark A. Borchardt, Susan K. Spencer, Terry M. Gellner**, 2012. Comparative effectiveness of membrane bioreactors, conventional secondary treatment, and chlorine and UV disinfection to remove microorganisms from municipal wastewaters, *Water Research*, Volume 46, Issue 13, 1. Pages 4164-4178, ISSN 0043-1354
- Kroneman A., Verhoef L., Harris J., Vennema H., Duizer E., Van Duynhoven Y., Gray J., Iturriza M., Bottiger B., Falkenhorst G., et al.** 2008. Analysis of integrated virological and epidemiological reports of norovirus outbreaks collected within the Foodborne Viruses in Europe network from 1 July 2001 to 30 June 2006. *J Clin Microbiol*, 46, pp. 2959-2965
- 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, pp. 618-624
- Le Guyader S, Maalouf Haifa, Le Pendu J.**, 2013. Huîtres et norovirus : une affinité particulière? *Virologie*, 17(4), 253-263.

- Le Saux J.C., Mouillard G., Ollivier J., Lora M., Parnaudeau S., Bougeard M., Pommepuy M. & Le Guyader S.**, 2011. Contamination des coquillages par le virus de l'hépatite A en baie de Paimpol : identification des voies de transfert. Rapport de contrat, 61 p.
- Lodder WJ, Husman AMD.**, 2005. Presence of noroviruses and other enteric viruses in sewage and surface waters in The Netherlands. *Appl Environ Microbiol.* 2005;71(3):1453–1461. doi: 10.1128/AEM.71.3.1453-1461.
- Lowther JA, Gustar NE, Hartnell RE, Lees DN.** 2012. Comparison of norovirus RNA levels in outbreak-related oysters with background environmental levels. *J. Food Prot.* 75:389–393
- Marti E., Monclús H., Jofre J, Rodriguez-Roda I., Comas J., Balcázar J.L.**, 2011. Removal of microbial indicators from municipal wastewater by a membrane bioreactor (MBR), *Bioresource Technology*, Volume 102, Issue 8. Pages 5004-5009, ISSN 0960-8524
- Mauffret A, Caparis MP, Gourmelon M.**, 2012. Relevance of Bacteroidales and F-specific RNA bacteriophages for efficient fecal contamination tracking at the level of a catchment in France. *Appl. Environ. Microbiol.* 78:5143–5152
- Miura T, Parnaudeau S, Grodzki M, Satoshi O, Atmar RL, Le Guyader FS.** 2013. Environmental Detection of Genogroup I, II, and IV Noroviruses by Using a Generic Real-Time Reverse Transcription-PCR Assay. *Appl Environ Microbiol.* 79 : 6585-6592.
- Nordgren J., Matussek A., Mattsson A., Svensson L., Lindgren P.E.**, 2009. Prevalence of norovirus and factors influencing virus concentrations during one year in a full-scale wastewater treatment plant, *Water Research*, Volume 43, Issue 4. Pages 1117-1125, ISSN 0043-1354
- Saulquin B., Gohin F., Garrello R.**, 2011. Regional Objective Analysis for Merging High-Resolution MERIS, MODIS/Aqua, and SeaWiFS Chlorophyll-a Data From 1998 to 2008 on the European Atlantic Shelf. *IEEE TRANSACTIONS ON GEOSCIENCE AND REMOTE SENSING*, 49(1), 143-154.
- Schaeffer J., Le Saux J.C., Lora M., Atmar R., Le Guyader S.**, 2013. Norovirus contamination on French marketed oysters. *International Journal of Food Microbiology*, 166(2), 244-248. Publisher's official version
- Sima LC, Schaeffer J, Le Saux JC, Parnaudeau S, Elimelech M, Le Guyader FS.**, 2011. Calicivirus removal in a membrane bioreactor wastewater treatment plant.. *Appl Environ Microbiol.* 77: 5170–5177
- Simmons F.J, Kuo D.H., Xagorarakis I.**, 2011. Removal of human enteric viruses by a full-scale membrane bioreactor during municipal wastewater processing, *Water Research*, Volume 45, Issue 9. Pages 2739-2750, ISSN 0043-1354
- Suffredini E., Magnabosco C., Civettini M., Rossetti E., Arcangeli G., Croci L.**, 2012. Norovirus contamination in different shellfish species harvested in the same production areas. *J. Appl. Microbiol.*, 113, pp. 686–692
- Suffredini E., Lanni L., Arcangeli G., Pepe T., Mazzette R., Ciccaglioni G., Croci L.**, 2014. Qualitative and quantitative assessment of viral contamination in bivalve molluscs harvested in Italy, *International Journal of Food Microbiology*, Volume 184, 1. Pages 21-26, ISSN 0168-1605

- Teunis, P. F., Moe, C. L., Liu, P., Miller, S.E., Lindesmith, L., Baric, R. S., Le Pendu, J. and Calderon, R. L.** 2008. Norwalk virus : How infectious is it?. *J. Med. Virol.*, 80: 1468–1476. doi: 10.1002/jmv.21237
- Teunis P. F., Sukhrie F.H., Venneme H., Bogerman J., Beersma M. F., Koopmoans, M. P.,** 2014. Shedding of norovirus in symptomatic and asymptomatic infections, *Epidemiol. Infect.*, 22 : 1-8.
- Thomas A., Le Saux J.C., Ollivier J., Maalouf H., Pommepuy M., Le Guyader F.S.** 2011. Norovirus et huîtres : de la terre à la mer ! *Virologie* 15(6) : 353-60 (a).
- Thomas G., Stanisière J.Y., Fillon A., Paticat F., Chabirand J.M., Derrien A. et Grizon J.,** 2011. Diagnostic des contaminations microbiologiques des chenaux du Payré. Rapport de contrat, 75 p (b).
- Tréguier C., Hitier B.,** 2013. Recherche de l'origine de la contamination microbiologique en rivière de Penf. Hiérarchisation des flux et modélisation de la contamination. Rapport de contrat, 53 p.
- Ueki Y, Sano D, Watanabe T, Akiyama K, Omura T.** 2005. Norovirus pathway in water environment estimated by genetic analysis of strains from patients of gastroenteritis, sewage, treated wastewater, river water and oysters. *Water Res.* 4271
- Uhrbrand K., Myrmel M., Maunula L., Vainio K., Trebbien R., Norrung B., Schultz A.C.,** 2010. Evaluation of a rapid method for recovery of norovirus and hepatitis A virus from oysters and blue mussels. *Journal of Virological Methods*, 169, pp. 70–78
- 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 Epidemiologique Hebdomadaire*, HS, 34-3
- Van den Akker B, Trinh T, Coleman HM, Stuetz RM, Le-Clech P, Khan SJ.** 2014. *Bioresource Technology* ;155 : 432-7.
- Van Duynhoven Y.T., de Jager C.M., Kortbeek L.M., Vennema H., Koopmans M.P., van Leusden F., van der Poel W.H., van den Broek M.J.,** 2005. A one-year intensified study of outbreaks of gastroenteritis in The Netherlands *Epidemiol Infect.* 133 (1). pp. 9–21
- Victoria M., Rigotto C., Moresco V., De Abreu Corrêa A., Kolesnikovas C., Leite, J.P., Miagostovich, M.P. and Barardi, C.R.** 2010. Assessment of norovirus contamination in environmental samples from Florianópolis City, Southern Brazil. *Journal of Applied Microbiology*, 109: 231–238. doi: 10.1111/j.1365-2672.2009.04646.x
- Yang N., Qi H., Wong M.M., Wu R.S., Kong R.Y.** 2012. Prevalence and diversity of norovirus genogroups I and II in Hong Kong marine waters and detection by real-time PCR. *Mar Pollut Bull.* 64 : 164-168.
- Zanetti F., De Luca G., Sacchetti R.,** 2010. Performance of a full-scale membrane bioreactor system in treating municipal wastewater for reuse purposes, *Bioresource Technology*, Volume 101, Issue 10. Pages 3768-3771, ISSN 0960-8524
- Zheng, D.P, Ando, T, Fankhauser, R.L, Beard, R.S, Glass, R, Monroe, S.S.,** 2006. Norovirus classification and proposed strain nomenclature. *Virology* ; 346 : 312-23.

ANNEXES

ANNEXE I : VALIDATION DU MODELE HYDRODYNAMIQUE

Le modèle « MARS3D MORBRAS 165m » employé dans cette étude a fait l'objet d'une validation en marée, température, courants et salinité. Elle témoigne d'une représentation satisfaisante du transport et de l'échauffement de la masse d'eau selon les régimes de vents, les échanges de chaleur air/mer et la marée (figure 1).

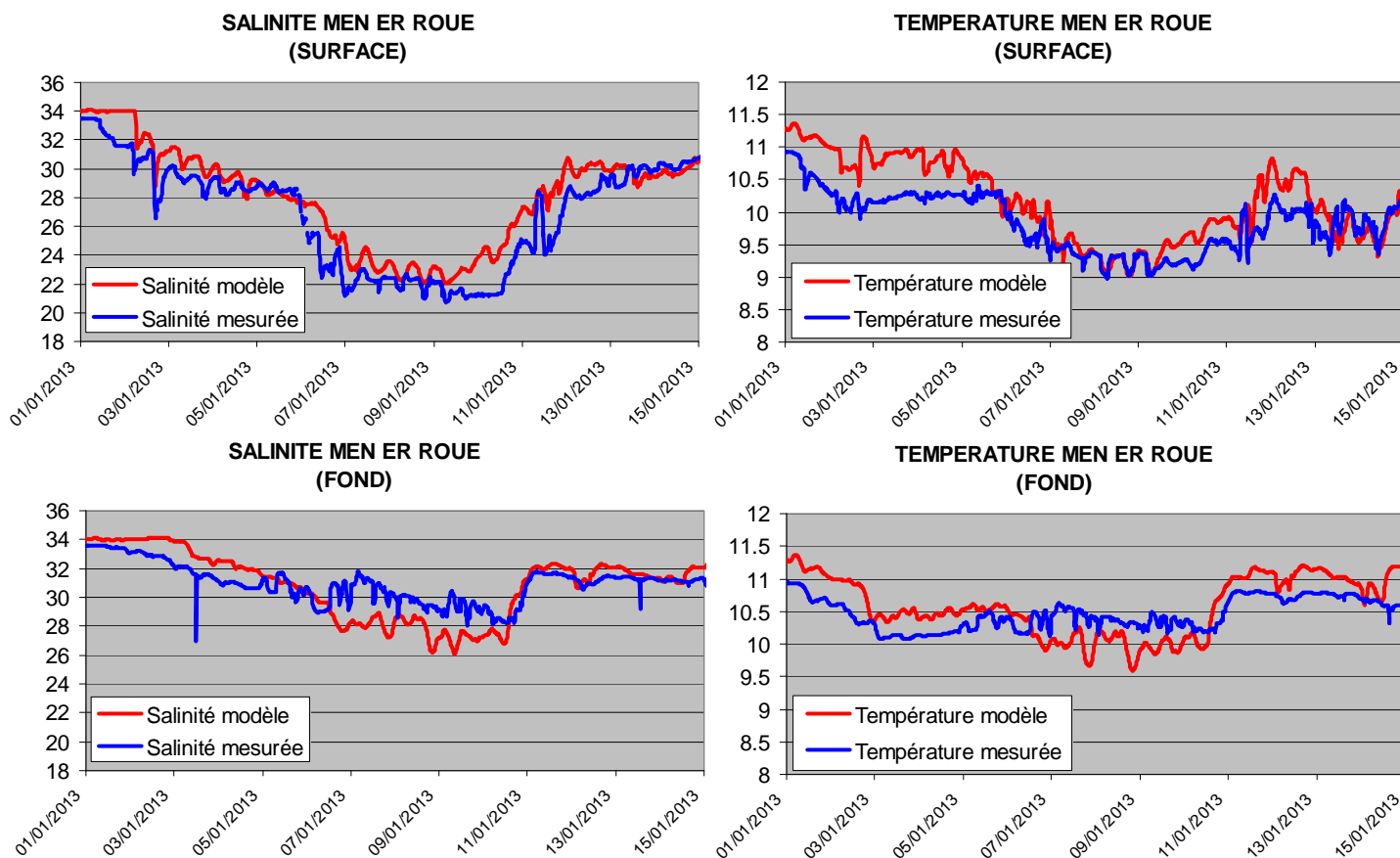


Figure 1 : Validation 2013 fond/surface en salinité et en température du modèle Mars3D MORBRAS 165m au point Men er Roué dans la baie de Quiberon du 01/01/2013 au 15/01/2013 (en rouge : le modèle, en bleu : la mesure).

ANNEXE II : CALIBRATION DES DEBITS

Pour calculer les flux en *E. coli* et en NoV, il est essentiel de connaître les débits des différents exutoires étudiés.

Afin de s'affranchir de la mesure des débits lors de chaque sortie, une reconstitution des débits par modélisation a été effectuée durant la première année de suivi. Pour cela, un modèle explicatif du débit mesuré ponctuellement a été recherché en fonction de la pluie, et du débit mesuré sur la station hydrographique la plus proche (le Loc'h à Brec'h). Les résultats de ce modèle explicatif sont comparés aux mesures réelles effectuées.

Les équations des modèles ainsi que le R^2 ajusté (représentant le pourcentage de la variance expliqué par le modèle de régression) sont présentés dans le tableau 1.

Tableau 1 : Equations des modèles linéaires d'estimation des débits.

Point	Modèle	R^2 ajusté
Amont rejet	$\text{Amont_rejet (m3/s)} = -0,0381752 + 0,00440524 * \text{Pluie1-j} + 0,0192425 * \text{Debit_loch}$	98,4 %
Le Plessis	$\text{Plessis (m3/s)} = -0,00161542 + 0,00260058 * \text{Debit1-j} + 0,00657312 * \text{Pluie1-j}$	86,6 %
Baden	$\text{Baden (m3/s)} = -0,00171993 + 0,00730707 * \text{Debit1-j} + 0,00124585 * \text{Pluie_auray}$	84,9 %
Le Bono	$\text{Bono (m3/s)} = 0,0199185 + 0,000416179 * \text{Debit_loch} * \text{Pluie1-j}$	90,3 %
Le Reclus	$\text{Reclus (m3/s)} = 0,105631 + 0,00317736 * \text{Pluie1-j} * \text{Debit_loch}$	87,8 %

Les résultats montrent une bonne estimation des débits pour l'ensemble des points avec des R^2 ajustés supérieurs ou égaux à 85%. Ces résultats sont satisfaisants pour l'objectif de l'étude de calcul des flux d'*E. coli* et de NoV.