

Déterminisme environnemental de la contamination par Escherichia coli des eaux et des biofilms d'un hydrosystème karstique.

Manon Michaut

► To cite this version:

Manon Michaut. Déterminisme environnemental de la contamination par Escherichia coli des eaux et des biofilms d'un hydrosystème karstique.. Bactériologie. Normandie Université, 2018. Français. NNT: 2018NORMR134. tel-02084039

HAL Id: tel-02084039 https://theses.hal.science/tel-02084039

Submitted on 29 Mar 2019 $\,$

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers. L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



THÈSE

Pour obtenir le diplôme de doctorat

Spécialité 4200007

Préparée au sein de Université de Rouen Normandie

Déterminisme de la contamination par *Escherichia coli* de l'eau et des biofilms d'un hydrosystème karstique

Présentée et soutenue par Manon MICHAUT

Thèse soutenue publiquement le 06 Décembre 2018 devant le jury composé de			
Mme Valérie PLAGNES	Professeur à Sorbonne Université, UMR CNRS METIS 7619	Rapporteur	
Mme Estelle JUMAS-BILAK	Professeur à l'Université de Montpellier, UMR CNRS HSM 5569	Rapporteur	
Mr Thierry JOUENNE	Directeur de recherche à l'Université de Rouen Normandie, UMR CNRS PBS 6270	Examinateur	
Mme Danièle VALDES-LAO	Maitre de conférence à Sorbonne Université, UMR CNRS METIS 7619	Examinateur	
Mr Nicolas MASSEI	Professeur à l'Université de Rouen Normandie, UMR CNRS M2C 6143	Codirecteur de thèse	
Mme Fabienne PETIT	Professeur à l'Université de Rouen Normandie, UMR CNRS M2C 6143	Directeur de thèse	

Thèse dirigée par Fabienne PETIT et Nicolas MASSEI, UMR CNRS M2C 6143











Ces travaux de thèse se sont déroulés au sein de l'UMR CNRS M2C 6143, sous la direction de F. Petit et N. Massei

4

Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier les membres du jury d'avoir pris le temps d'examiner mes travaux de thèse. Je remercie également ma directrice Fabienne Petit et mon co-directeur Nicolas Massei.

Je remercie aussi toute l'équipe que j'ai côtoyé au quotidien : Thierry qui a toujours été là pour répondre à mes questions, et qui a toujours tous les protocoles en tête ; Florian qui m'a accompagné dans mes débuts au labo avec les bactéries, Valérie Foussard pour toutes les conversations autour de cafés, Jannick pour sa bonne humeur communicative. Je n'oublie pas les anciens doctorants que j'ai pu côtoyer en microbiologie Armelle, Cynthia et Gauthier, mais aussi du côté obscur des sciences de la Terre Marie, Flavie, Pierre, Manu et Léa qui m'a fait découvrir le karst de Norville au tout début de mon aventure. Je souhaite bien du courage pour ceux qui terminent Ruth, Adeline, David, Thomas et ceux qui suivront. Un énorme merci à Michel pour tous les colliers de craie qu'il a pu me faire, toutes les solutions qu'il a pu m'apporter, sa disponibilité et sa gentillesse. Une pensée pour Jean Paul pour les discussions sans fin et les éclairages précieux qu'il a su apporter à mes travaux.

Un mot pour la collection de plus de 800 souches de *E. coli* et autres bactéries que j'ai manipulées, étalées, lysées, observées, comptées tellement de fois que je leur parle maintenant. Je vous remercie pour vos surprises, les parties de cache-cache, votre présence parfois inattendue. J'ai adoré le terrain et les manips de labo et c'est un peu grâce à vous.

Je remercie aussi les femmes et hommes qui assurent les formations doctorales et qui m'ont entre autre emmené.e.s à la finale régionale de ma thèse en 180s, fait faire des ateliers scientifiques dans le noir, discuter bactéries avec des enfants... ces expériences resteront parmi mes plus beaux souvenirs de thèse. Je remercie aussi ceux que j'ai oublié de nommer et dont j'ai croisé la route, chacun ayant participé à sa manière à ce travail.

Je remercie du fond du cœur ma relectrice de l'ombre, Sylvie pour tout le temps qu'elle a passé sur mes travaux et ses conseils précieux qui m'ont grandement aidé à tenir jusqu'au bout et rendre un manuscrit avec des s et des accents sur les e.

Je ne remercierai jamais assez mes colocs de génie Mathilde, Claire, les colocs à mi-temps Laura, Estelle qui ont fait le pari fou de cohabiter avec une doctorante et qui sont désormais incollable sur *Escherichia coli* et le karst, même si elles ont appris tout ça contre leur volonté. Merci pour votre soutien au quotidien, les bons repas partagés, les verres de vin et de m'avoir sorti du labo ! Je suis obligée de remercier tous les poilus Iroquois, Isatis, Popy, Momo, Phylowsky de m'avoir aidé à savoir quoi faire de mon argent, de m'avoir obligé à sortir dans la nuit, le froid et sous la pluie, mais aussi pour les bains de fourrure qui ont parfois séchés mes larmes et les balades qui vident la tête et redonnent le sourire.

Evidemment je remercie ma mère pour son soutien indéfectible et pour avoir toujours cru en moi, pour m'avoir accompagné dans toutes mes galères, fractures, déménagement etc...Mon père pour ses conseils avisés et son fichu caractère qu'il m'a légué !

Un grand merci à Vanessa, ma sœur, je ne peux pas résumer en quelques lignes à quel point tu m'as aidé mais tout ça n'aurait jamais eu lieu sans toi ! Un mot pour mon frère, toujours là sans jamais juger, le meilleur frère que l'on puisse avoir. Je salue également ta folie de t'entourer de docteures et de les supporter (fuis tant qu'il est encore temps).

Le mot de la fin pour Loïc qui a traversé les 2 dernières années à mes côtés sans faillir. Une épaule solide et sensible sur laquelle m'épanouir, mon refuge. Merci n'est pas suffisant.

6

Résumé

Les aquifères karstiques représentent une des plus importantes ressources en eau potable alimentant 25% de la population mondiale, 40% de la population française et 100% de la région Normande. Dans les aquifères karstiques, les pressions anthropiques exercées sur le bassin versant et les conditions hydrologiques sont liées à des évènements de contamination microbiologique par des bactéries fécales. L'OMS a retenu *Escherichia coli*, bactérie appartenant au microbiote intestinal des être humains et des animaux vertébrés, comme espèce bactérienne indicatrice de contamination fécale. La survie de *E. coli* dans l'environnement dépend de facteurs biotiques (protozoaires, bactériophages, formation de biofilm) et de facteurs abiotiques (oligotrophie, température).

Dans le but de caractériser les conditions environnementales, hydrologiques et d'usage des sols, menant à la contamination d'un système karstique cette étude combine hydrogéologie et microbiologie environnementale. Les chroniques de température et d'hydrologie (pluviométrie, turbidité, conductivité) de l'hydrosystème karstique de Norville (SO Karst) des 5 dernières années ont été analysées pour trouver une corrélation entre les conditions hydrologiques menant au ruissellement sur le bassin versant et la contamination par *E. coli* de l'hydrosystème. Quinze campagnes de prélèvement d'eau à l'entrée (la perte) et la sortie (la source) du système ont été réalisées. La relation entre l'abondance et la diversité génétique (distribution des phylogroupes) des populations de *E. coli* circulant dans l'hydrosystème et les conditions hydrologiques et d'usage des sols a été étudiée.

Un indicateur de contamination des eaux par *E. coli* (IndiCE) basé sur l'enregistrement de la température et la pluviométrie et corrélé avec la contamination d'eau de surface et sous terraine par *E. coli* d'un hydrosystème karstique, simple d'utilisation est proposé. Des valeurs d'IndiCE supérieures à 1,5 en période de pâturage du bassin versant sont corrélées avec des concentrations en *E. coli* supérieures à 100 UFC/100 mL à la perte et 50 UFC/100 mL à la source. De plus la diversité génétique des populations de *E. coli* montre qu'une concentration en *E. coli* plus élevée est significativement corrélée avec une proportion plus importante de souches de *E. coli* appartenant au phylogroupe B1 indiquant une contamination par lessivage des fèces bovins déposés sur le bassin versant.

Le rôle de réservoir de pathogène des biofilms karstiques, responsable de contamination secondaire, a été étudié en suivant l'occurrence de *E. coli* dans des biofilms formés à la source de l'hydrosystème karstique de Norville. Il a été montré en chemostat la capacité de *E. coli* à former des biofilms sur la craie en condition oligotrophique. *In situ E. coli* peut s'associer à des biofilms autochtones sous forme cultivable transitoirement. Sa concentration dans les biofilms augmente lors des périodes de pâturage et donc de contamination des eaux mais ne persiste pas après l'arrêt du pâturage. La structure des populations de *E. coli* dans les biofilms est significativement semblable a celle identifiée dans l'eau de la source. L'identification de *Pseudomonas* dans la majorité des biofilms étudiés montre cependant la possibilité que les biofilms soient des réservoirs de bactéries pathogènes opportunistes.

L'ensemble de ces travaux de thèse a permis de mieux comprendre la dynamique de la contamination par *E. coli* des hydrosystèmes karstiques, dans l'eau et les biofilms.

Mots clefs: hydrosystème karstique, risque sanitaire, Escherichia coli, biofilms

8

I. Table des matières

Intro	ntroduction générale		
Synth	nèse bibliographique	15	
1.	Les hydrosystèmes karstiques	17	
2.	Maitrise de la qualité microbiologique des eaux environnementales	23	
З.	L'espèce bactérienne <i>Escherichia coli</i>	29	
4.	E. coli dans les hydrosystèmes karstiques	39	
5.	Les biofilms	43	
Probl	lématique de thèse	53	
Partie	e 1 : Présentation du site d'étude L'hydrosystème karstique de Norville	55	
1.	Présentation générale	57	
2.	Fonctionnement hydrologique du bassin versant du Bébec	59	
3.	Fonctionnement hydrogéologique du système karstique	61	
4.	Vulnérabilité microbiologique du karst de Norville	63	
5.	Caractérisation hydrologique et climatique du site d'étude de 2013 à 2017	65	
6.	Chroniques hydrologiques et climatiques de données acquises pendant la durée de	e l'étude 67	
7.	Campagnes de prélèvements réalisées au cours de cette étude	69	
Partie eaux	e 2 : Proposition d'un indicateur de conditions hydrologiques propices à la contami d'un hydrosystème karstique par <i>Escherichia coli</i>	nation des 73	
Partie eaux 1.	e 2 : Proposition d'un indicateur de conditions hydrologiques propices à la contamin d'un hydrosystème karstique par <i>Escherichia coli</i> Contexte scientifique	nation des 73 75	
Partie eaux 1. 2.	e 2 : Proposition d'un indicateur de conditions hydrologiques propices à la contamin d'un hydrosystème karstique par <i>Escherichia coli</i> Contexte scientifique Démarche méthodologique	nation des 73 75 77	
Partie eaux 1. 2. 3.	e 2 : Proposition d'un indicateur de conditions hydrologiques propices à la contamin d'un hydrosystème karstique par <i>Escherichia coli</i> Contexte scientifique Démarche méthodologique Résultats	nation des 73 75 77 81	
Partie eaux (1. 2. 3. 4.	e 2 : Proposition d'un indicateur de conditions hydrologiques propices à la contamin d'un hydrosystème karstique par <i>Escherichia coli</i> Contexte scientifique Démarche méthodologique Résultats Du calcul d'IndiCE à l'utilisation opérationelle	nation des 73 75 77 81 103	
Partie eaux (1. 2. 3. 4. 5.	e 2 : Proposition d'un indicateur de conditions hydrologiques propices à la contamin d'un hydrosystème karstique par <i>Escherichia coli</i> Contexte scientifique Démarche méthodologique Résultats Du calcul d'IndiCE à l'utilisation opérationelle Conclusions et discussions	nation des 73 75 77 81 103 105	
Partie eaux 1. 2. 3. 4. 5. Partie	e 2 : Proposition d'un indicateur de conditions hydrologiques propices à la contamin d'un hydrosystème karstique par <i>Escherichia coli</i> Contexte scientifique Démarche méthodologique Résultats Du calcul d'IndiCE à l'utilisation opérationelle Conclusions et discussions e 3 : Occurrence de <i>E. coli</i> dans des biofilms intra-karstiques	nation des 73 75 77 81 103 105 115	
Partie eaux (1. 2. 3. 4. 5. Partie 1.	e 2 : Proposition d'un indicateur de conditions hydrologiques propices à la contamin d'un hydrosystème karstique par <i>Escherichia coli</i> Contexte scientifique Démarche méthodologique Résultats Du calcul d'IndiCE à l'utilisation opérationelle Conclusions et discussions e 3 : Occurrence de <i>E. coli</i> dans des biofilms intra-karstiques Contexte scientifique	nation des 73 75 77 81 103 105 115 117	
Partie eaux (1. 2. 3. 4. 5. Partie 1. 2.	e 2 : Proposition d'un indicateur de conditions hydrologiques propices à la contamin d'un hydrosystème karstique par <i>Escherichia coli</i> Contexte scientifique Démarche méthodologique Résultats Du calcul d'IndiCE à l'utilisation opérationelle Conclusions et discussions e 3 : Occurrence de <i>E. coli</i> dans des biofilms intra-karstiques Contexte scientifique Démarche méthodologique	nation des 73 75 77 81 103 105 115 117 119	
Partie eaux (1. 2. 3. 4. 5. Partie 1. 2. 3.	e 2 : Proposition d'un indicateur de conditions hydrologiques propices à la contamin d'un hydrosystème karstique par Escherichia coli Contexte scientifique Démarche méthodologique Résultats Du calcul d'IndiCE à l'utilisation opérationelle Conclusions et discussions e 3 : Occurrence de E. coli dans des biofilms intra-karstiques Contexte scientifique Démarche méthodologique Résultats	nation des 73 75 77 81 103 105 115 117 119 123	
Partie eaux (1. 2. 3. 4. 5. Partie 1. 2. 3. 4.	e 2 : Proposition d'un indicateur de conditions hydrologiques propices à la contamin d'un hydrosystème karstique par Escherichia coli Contexte scientifique Démarche méthodologique Résultats Du calcul d'IndiCE à l'utilisation opérationelle Conclusions et discussions e 3 : Occurrence de E. coli dans des biofilms intra-karstiques Contexte scientifique Démarche méthodologique Résultats	nation des 73 75 77 81 103 105 115 117 119 123 139	
Partie eaux (1. 2. 3. 4. 5. Partie 1. 2. 3. 4. 2. 3. 4.	e 2 : Proposition d'un indicateur de conditions hydrologiques propices à la contamin d'un hydrosystème karstique par Escherichia coli Contexte scientifique Démarche méthodologique Résultats Du calcul d'IndiCE à l'utilisation opérationelle Conclusions et discussions e 3 : Occurrence de E. coli dans des biofilms intra-karstiques Contexte scientifique Démarche méthodologique Résultats Contexte scientifique	nation des 73 75 77 81 103 105 115 117 117 119 123 139 147	
Partie eaux (1. 2. 3. 4. 5. Partie 1. 2. 3. 4. Concl Maté	e 2 : Proposition d'un indicateur de conditions hydrologiques propices à la contamin d'un hydrosystème karstique par <i>Escherichia coli</i> Contexte scientifique Démarche méthodologique Résultats Du calcul d'IndiCE à l'utilisation opérationelle Conclusions et discussions e 3 : Occurrence de <i>E. coli</i> dans des biofilms intra-karstiques Contexte scientifique Démarche méthodologique Résultats Démarche méthodologique Résultats Conclusions et discussions	nation des 73 75 77 81 103 105 115 117 117 119 123 139 147 157	
Partie eaux (1. 2. 3. 4. 5. Partie 1. 2. 3. 4. Concl Maté Référ	e 2 : Proposition d'un indicateur de conditions hydrologiques propices à la contamin d'un hydrosystème karstique par Escherichia coli Contexte scientifique Démarche méthodologique Résultats Du calcul d'IndiCE à l'utilisation opérationelle Conclusions et discussions e 3 : Occurrence de E. coli dans des biofilms intra-karstiques Contexte scientifique Démarche méthodologique Résultats Contexte scientifique Démarche méthodologique Résultats conclusions et discussions	nation des 73 75 77 81 103 105 115 117 119 123 139 147 157 173	

10

Introduction générale -

Introduction générale



Figure 1: Les aquifères karstiques sont présents sur tous les continents, sous toutes les latitudes. Carte réalisée par le WHYMAP (Worldwide Hydrogeological Mapping and Assessment Programme), les zones en bleu représentent les roches carbonatées continues (en bleu foncé) et discontinues (en bleu clair). World Karst Aquifer Map 1 : 40 000 000, publié en 2017 et présenté au 44^{ème} Congrés de l'Association Internationale des Hydrogeologistes (IAH) Dubrovnik/Croatie ; Source: BGR, IAH, KIT & UNESCO.

Les aquifères karstiques alimentent en eau potable près d'un quart de la population mondiale. Leur répartition géographique recouvre toutes les latitudes, sur les 5 continents (figure 1) et la surface qu'ils occupent est estimée à 20.10^6 km². Dans un grand nombre de pays et régions, l'eau souterraine provenant d'aquifères karstiques est la ressource principale pour l'approvisionnement en eau potable et l'irrigation des cultures. De grandes villes comme Vienne, Rome, San Antonio, Damascus et Taiwan sont approvisionnées majoritairement voire totalement par des aquifères karstiques. En France, 25% de l'approvisionnement en eau potable provient d'hydrosystèmes karstiques avec une grande disparité régionale ; en Normandie la totalité de l'approvisionnement en eau potable est karstique. Les plus grandes sources de la planète sont des sources karstiques qui présentent généralement des variations de débit importantes en réponse aux évènements pluvieux ou à la fonte des neiges. Cette importante variabilité hydrologique est un challenge pour l'utilisation et la gestion des aquifères karstiques car les fournisseurs et les consommateurs d'eau ont besoin d'une ressource constante en quantité et fiable en qualité chimique et microbiologique.

Le stress sur les ressources en eaux souterraines provoqué par l'activité humaine a augmenté significativement ces dernières années (Wada et al., 2010) quantitativement dû à l'irrigation des cultures (Aeschbach-Hertig et Gleeson, 2012) et qualitativement à cause de la pollution par les fertilisants et produits phytosanitaires (Foley et al., 2011). La diminution des précipitations dans certaines régions et l'augmentation des températures attendues va mener à une diminution recharge des eaux souterraines. L'augmentation du déséquilibre de la entre l'approvisionnement en eau potable, la consommation d'eau et l'augmentation de la population (De Stefano et Hernández-Mora, 2012 ; Vörösmarty et al., 2000) s'ajoute au stress climatique. L'extension de zones urbanisées sur des terrains karstiques, entrainée par l'augmentation démographique, mène à l'augmentation d'évènements de pollutions impactant la qualité de l'eau de source karstique (De Waele et Follesa, 2003).

La protection de cette ressource en eau menacée nécessite la compréhension des phénomènes menant à sa contamination. Il est primordial d'identifier les conditions environnementales et d'usages des sols menant à la contamination chimique ou microbiologique de cette eau et de mieux comprendre et anticiper la persistance des contaminants dans les hydrosystèmes.

La présente étude porte sur le potentiel de contamination des eaux issues du karst de Norville (Haute-Normandie) par *Escherichia coli*, à partir de mesures et d'échantillonnages *in situ* et d'essais en laboratoire. Ce système karstique donne accés au point d'entrée principal de l'eau dans l'hydrosysytème, *via* une perte, et au point de sortie, la source de Norville, permettant de comparer les deux, c'est pourquoi il a été choisi dans cette étude.

En premier lieu nous rappelons à partir de la bibliographie préexistante les caractéristiques des hydrosystèmes karstiques puis les enjeux sanitaires liés à leurs utilisations en tant que sources d'eau potable. Les principales connaissances relatives à la bactérie *E. coli* en tant qu'agent primordial de pollution biologique des eaux sont ensuite évoquées, avec un focus sur la formation de biofilms. Dans une seconde partie nous présentons la description détaillée du site d'étude et des conditions hydrologiques qui ont prévalu durant la réalisation de cette étude. Dans la troisième partie, nous présentons la mise au point d'un indicateur de conditions hydrologiques propices à la contamination microbiologique, qui permet de façon simple de prévoir la contamination microbienne en *E. coli* des eaux du système étudié. La quatrième partie s'attache à déterminer le rôle de réservoir de *E. coli* et d'éléments génétiques mobiles de biofilms en conditions karstique *in situ* et en réacteur.

Introduction générale -

Synthèse bibliographique -

Synthèse bibliographique



Figure 2: Bloc diagramme présentant l'hydrologie et les formations superficielles caractéristiques des hydrosystèmes karstiques (Bakalowicz, 1999)



Figure 3: Description schématique du processus de karstification qui détermine la structure hydrogéologique du milieu karstique et le comportement hydrodynamique de la source (modifiée d'après Hartmann *et al.*, 2014)

1. Les hydrosystèmes karstiques

À l'origine le terme « karst » désignait une région de la Slovenie entre Ljubljana et Trieste caractérisée par un fonctionnement hydrologique imprévisible. En 1880, Von Mojsisovics est le premier à considérer la région du Karst comme particulière d'un point de vue physiographique avec une hydrologie spécifique majoritairement souterraine.

Le karst tel que défini par Bakalowicz (1999) est l'ensemble des formes superficielles et souterraines résultant de la dissolution de roches carbonatées ou salines par l'eau. Ce type de système présente une hydrologie et des formations caractéristiques, reconnaissable à la présence de bétoires ou dolines dans lesquelles s'engouffrent des cours d'eau, des dépressions dans le sol et des sources (figure 2). Le bassin versant alimentant une source karstique ne dépend pas strictement de la topographie de surface mais aussi des formations souterraines (Goldscheider, 2005; Stadler *et al.*, 2008).

1.1. Karstification

Le karst résulte de la dissolution des formations carbonatées souterraines par l'eau, nommée « karstification ». Cette érosion hydrochimique et hydraulique des formations carbonatées est provoquée par l'acidité de l'eau lorsqu'elle contient du CO_2 dissous. L'eau qui percole au travers des sols s'enrichit en CO_2 dissous rendant l'eau plus acide et donc plus agressive vis-àvis de la roche carbonatée. En effet, le plus grand stock de dioxyde de carbone se trouve dans les sols où sa concentration atteint fréquemment 2%. La teneur en CO_2 des sols s'explique par la respiration racinaire des plantes ainsi que par la décomposition de la matière organique sous l'action des microorganismes (Liu *et al.*, 2007).

La dissolution des roches est également dépendante des écoulements, de leur vitesse et de leur fréquence. Un système karstique « jeune » dont le flux d'eau circule au travers de fissures est caractérisé par un débit à la source peu variable dans le temps. Le flux d'eau souterrain emporte les produits de dissolution des roches élargissant progressivement le réseau de fissure créant des conduits de large diamètre et des cavités interconnectées. Le flux d'eau karstique devient de plus en plus turbulent avec l'élargissement progressif des vides (Ford & Williams, 2007) qui forment le réseau karstique. Le débit plus rapide dans l'hydrosystème est caractérisé par un débit plus variable à la source dépendant des évènements hydrologiques (précipitations, fonte des neiges). Le flux d'eau souterrain détermine la structure hydrogéologique du milieu karstique, qui en retour a un effet sur le flux (figure 3). Un hydrosystème karstique est une structure dynamique en perpétuelle évolution (Hartmann *et al.*, 2014).

Ainsi le développement d'un karst n'est possible que si les conditions suivantes sont réunies (i) la possibilité de dissolution de roches carbonatées et donc la circulation d'une eau chargée en CO₂, (ii) un flux d'eau souterraine, déterminé par un gradient hydraulique. L'ensemble de ces conditions a été défini comme le potentiel de développement du karst (PKD) (Mangin *et al.*, 1978) qui détermine le flux de solvant circulant au travers du système.



Figure 4: Il existe deux types de karst définis en fonction de la nature de leur impluvium : (a) karst unaire, (b) karst binaire (Marsaud, 1996)



Figure 5: Les différentes zones d'un hydrosystème karstique et les flux d'eau associés Les flèches noires représentent le flux rapide et les flèches grises et rose le flux lent (COST Action 65)



Figure 6: Le sol, premier milieu d'échange entre l'eau et l'aquifère karstique.

Le PKD est sous l'influence des précipitations, éventuellement de la surface du bassin versant drainé, du pCO₂ du sol et du gradient hydraulique consécutif à la différence d'altitude entre le sommet de l'aire de recharge du karst, et le niveau de la source. Le niveau de la source est défini comme le niveau de base, généralement au pied de vallées, ou au niveau de la limite imperméable des formations carbonatées. Les roches karstiques s'étendent généralement sous le niveau de base permettant au karst de continuer à se développer dans les profondeurs. Á une échelle de temps géologique, le processus de karstification est rapide : de 10 000 à 20 000 ans suffisent au développement d'un réseau karstique (Backalowickz, 1975 ; Dreybrodt, 1999).

La découverte des formations karstiques dans les lithologies calcaires a associé le karst aux terrains calcaires. Cependant tous les minéraux et par conséquent, toutes les roches sont solubles dans l'eau. La solubilité dans l'eau dépend de la nature des minéraux, des conditions physiques du milieu et de la composition chimique des eaux (Bakalowicz, 1995). Aujourd'hui, l'existence de processus de karstification d'autres roches sédimentaires, plutoniques, métamorphiques a été démontrée (Willems *et al.*, 1999, 2002).

1.2. Structure d'un karst

Dans un hydrosystème karstique on distingue trois zones : la zone d'alimentation, la zone d'infiltration et la zone saturée (figure 5). Il existe une diversité des systèmes karstiques, en raison de leurs différences de structures et de fonctionnements.

La zone d'alimentation est la surface du bassin versant drainée par le karst, aussi appelée impluvium. Selon la nature (composition, épaisseur) de l'impluvium, on distingue deux grands types de karst : les karsts unaires pour lesquels l'ensemble de l'impluvium est constitué de terrains karstiques (Figure 4a) et les karsts binaires pour lesquels l'impluvium comprend des terrains non karstiques et imperméables qui sont le siège d'un ruissellement qui rentre dans l'aquifère par l'intermédiaire de pertes (figure 4b). L'infiltration de l'eau dans un karst unaire est diffuse sur l'ensemble de la zone d'alimentation et peut être lente ou rapide (Bakalowicz, 1995). Au contraire dans un karst binaire dont l'impluvium non karstique entraîne la concentration des eaux de surface en un seul point, une perte, accélère et augmente le développement du réseau karstique.

La seconde zone caractéristique des formations karstiques qui se situe sous la zone d'alimentation est la zone d'infiltration composée de deux parties (i) le sol, (ii) l'épikarst. L'eau arrivant au sol peut s'accumuler à la surface, ruisseler ou s'infiltrer (figure 6). En fonction des conditions climatiques, une partie de l'eau du sol retourne à l'atmosphère par évaporation et évapotranspiration. Bien que souvent peu épais, ce compartiment joue un rôle crucial dans le transfert des solutés, l'enrichissement en CO₂ dissous et, la composition minérale et surtout organique de l'eau dans le système. Directement sous le sol se situe l'épikarst correspondant à la zone superficielle très perméable du système karstique (3 à 10 m). Cette zone, caractérisant l'interface sol-calcaire, peut constituer une zone de réserves importantes des eaux d'infiltration et joue ainsi le rôle d'un aquifère plus ou moins temporaire : le réservoir épikarstique.

En dessous de l'épikarst se trouve la zone de transition, zone d'infiltration verticale au travers de laquelle l'eau en provenance de l'épikarst rejoint la zone noyée.



Figure 7: Modèle conceptuel de stockage et transport dans un aquifère karstique (modifié d'après Loop et White, 2001) les flèches bleu foncé représentent les flux d'eau rapides et les flèches bleu clair les flux d'eau lents.



Figure 8: Qualité microbiologique des eaux distribuées en Normandie en 2017 où la totalité de la ressource en eau à destination de la consommation humaine est d'origine karstique, Bilan régional sur la qualité de l'eau en Normandie pour l'année 2017, ARS (données SISE-EAUX 2017).

L'écoulement des eaux vers la zone noyée est assuré par (i) les microfissures des blocs (infiltration lente), (ii) des fractures plus ou moins ouvertes (infiltration rapide) et (iii) des conduits verticaux (infiltration rapide). La zone noyée constitue la principale réserve en eau de l'aquifère karstique et assure la fonction de stockage de l'eau.

1.3. Vulnérabilité des hydrosystèmes karstiques à la contamination microbiologique

Dans les karsts binaires présentant une connexion directe entre la surface et l'eau souterraine par de larges conduits, les contaminants présents à la surface du bassin versant ou transportés par l'eau de surface sont transférés rapidement au travers de la zone d'infiltration (figure 7). Une couverture fine ou absente de sol à la surface, associée à des cavités et des conduits larges empêche la décontamination naturelle de l'eau par filtration. Le transfert rapide limite les interactions entre l'eau et la matrice ne permettant pas la filtration, adsorption et la détérioration des contaminants microbiologiques (Iván et Mádl-Szőnyi, 2017).

Dans la littérature, deux types de vulnérabilités ont été définis (i) la vulnérabilité intrinsèque (ii) la vulnérabilité spécifique. La vulnérabilité intrinsèque des eaux souterraines aux contaminants dépend des caractéristiques géologiques, hydrologiques et hydrogéologiques d'une zone (Plagnes *et al.*, 2010) mais est indépendante de la nature du contaminant et du scénario de contamination. L'analyse de la vulnérabilité intrinsèque est basée sur les caractéristiques contrôlants le transport d'un contaminant conservatif ayant le même comportement qu'une molécule d'eau (Zwahlen *et al.*, 2004). Au contraire la vulnérabilité spécifique prend en compte les propriétés d'un contaminant particulier ou d'un groupe de contaminants et leur relation avec les différents aspects de la vulnérabilité intrinsèque. La vulnérabilité spécifique définit ainsi l'impact potentiel d'un usage des sols et d'un contaminant spécifique ; ce concept intègre le risque de contamination d'un aquifère par l'activité humaine.

Les karsts ont la capacité de transférer les contaminants présents dans l'eau et les sédiments mais également de les stocker. Lors d'augmentation du débit, la re-suspension des sédiments intra-karstiques et la remise en circulation d'eau, stockée dans des zones connectées ponctuellement à l'aquifère, peut provoquer la contamination de sources karstiques, des jours ou des semaines après l'entrée des contaminants dans le système. Si le temps de transfert est plus court que le temps de survie des bactéries entrant dans le système karstique, la qualité microbiologique de l'eau du karst peut être altérée. En Normandie où la totalité de la ressource en eau est d'origine karstique, à la suite d'évènements pluvieux majeurs l'alimentation en eau potable de bonne qualité peut être interrompue ponctuellement (figure 8). En 2017 une non-conformité ponctuelle de la qualité de la ressource en eau a touché 14,4% de la population en Seine Maritime (Bilan régional eau potable 2018, ARS).



Figure 9: La population n'ayant pas accès au moins à des services élémentaires d'approvisionnement en eau de boisson, est principalement localisée sur le continent africain. D'après l'OMS, données : 2015 (Rapport JMP 2017, Progrès en matière d'eau, d'assainissement et d'hygiène).



Figure 10 : Dans les pays industrialisés, des épisodes de gastro-entérites d'origine hydrique peuvent survenir ponctuellement causés par la contamination des eaux sous-terraines (\blacksquare) et de surface (\blacksquare) et le dysfonctionnement des systèmes de désinfection (\blacksquare) ou la contamination du réseau de distribution (\blacksquare). Etude menée sur 66 articles publiés entre 2000 et 2014 concernant des épisodes de contamination d'eau potable en Europe, Amérique du Nord et Nouvelle Zélande. Modifié d'après Moreira et Bondelind, 2017.

Maitrise de la qualité microbiologique des eaux environnementales 2.1. Enjeux sanitaires

La maîtrise de la qualité microbiologique des eaux environnementales utilisées comme ressource en eau potable, ou à usage récréatif est un enjeu de santé publique majeur. L'assemblée générale des Nations Unies a déclaré en 2010 qu'une eau de boisson sûre et saine (ne présentant aucun risque pour la santé d'une personne qui la consommerait sur toute la durée de sa vie, compte tenu des variations de sensibilité éventuelles aux différents stades de vie) et l'assainissement sont un droit de l'être humain essentiel à la pleine jouissance de la vie et à l'exercice de tous les droits de l'être humain. Dans le cadre des objectifs du millénaire pour le développement, le programme commun de suivi de l'approvisionnement en eau et de l'assainissement dirigé par l'OMS et l'UNICEF vise à augmenter l'accès des populations à une ressource en eau « améliorée » : dont la nature de sa construction ou un traitement actif la protège de contaminations extérieures, en particulier de contamination fécale. En 2015, 89% de la population mondiale avait accès à un point d'eau amélioré (figure 9). Cependant l'accès à ces ressources en eau protégées n'assure pas une eau exempte de contamination fécale. Près de 2 milliard de personnes, dont plus de 50% sur les continents africain et asiatique consomment une eau contaminée par des matières fécales (OMS, 2015 ; Bain et al., 2014) provoquant plus de 500 000 décès par an.

Dans les pays industrialisés, des épisodes de gastro-entérites d'origines hydriques peuvent survenir ponctuellement causés par la contamination des eaux de surface ou souterraines consécutive à des évènements pluvieux importants provoquant la contamination de l'eau par des matières fécales, mais également dues au dysfonctionnement des systèmes de désinfection ou la contamination du réseau de distribution. Entre 2000 et 2014, le Canada, la Finlande, la France et la Grèce ont subi au moins un évènement de contamination à l'origine de plus de 1000 cas de gastro-entérites. Ces évènements sont généralement causés par la présence de microorganismes pathogènes d'origine fécale : des virus (*Norovirus, Rotavirus, Sapovirus*), des bactéries (*Salmonella, Escherichia coli, Shigella, Campylobacter*), ou des protozoaires (*Cryptosporidium, Giardia*) (Moreira et Bondelind, 2017 ; Craun *et al.*, 2010) (figure 10).

La consommation d'une eau contaminée est le principal risque d'infection par un pathogène d'origine hydrique, cependant des gastro-entérites sont aussi liées aux activités de baignade, principalement causées par des parasites *Cryptosporidium spp*, des Norovirus et l'espèce bactérienne *Escherichia coli*. D'autres pathologies sont plus rarement observées : des dermatites (*Pseudomonas aeruginosa*) et des pneumopathies (*Legionella*).

Tableau 1: Directive européenne 2006/7/CE pour la qualité microbiologique des eaux à usage récréatif

	A	В	C	D	E
	Paramètre	Excellente qualité	Bonne qualité	Qualité suffisante	Méthodes de référence pour l'analyse
1	Entérocoques intestinaux (UFC/100 ml)	200 (*)	400 (*)	330 (**)	ISO 7899-1 ou ISO 7899-2
2	Escherichia coli (UFC/100 ml)	500 (*)	1 000 (*)	900 (**)	ISO 9308-3 ou ISO 9308-1

Tableau 2: Directive européenne 98/83/CE pour la qualité microbiologique des eaux à destination de la consommation humaine (eau du robinet après traitement) imposant une absence d'*E. coli* et d'entérocoques dans 100mL

Paramètre microbiologique	Valeur paramétrique (nombre/100mL)	Méthodes de référence pour l'analyse
Escherichia coli (E. coli)	0	ISO 9308-1
Entérocoques	0	ISO 7899-2

2.2. Contrôle microbiologique de la qualité des eaux

La détection et quantification de tous les pathogènes étant difficilement réalisable techniquement, et la majorité des toxi-infections d'origines hydriques étant associées à une contamination fécale, des espèces bactériennes sont utilisées comme indicateurs microbiologiques de contamination fécale. Ils sont dénombrés pour évaluer la qualité des eaux. Les indicateurs (i) sont non pathogènes et présents dans le tractus intestinal des être humains et des animaux vertébrés, (ii) survivent autant de temps que les pathogènes d'origine fécale et ne se multiplient pas dans l'environnement aquatique, (iii) sont au minimum aussi résistants que les pathogènes à la désinfection et (iiii) sont détectés et quantifiés par des méthodes rapides et sensibles (Tallon *et al.*, 2005).

E. coli a été proposée comme premier indicateur de contamination des eaux par Theobal Smith dans les années 1890 (Prescott et Winslow, 1915). L'espèce *E. coli* est majoritairement non pathogène des humains (Salyer et Whitt, 2002), présente à des concentrations élevées dans les fèces de tous les mammifères, survit moins longtemps que de nombreux pathogènes dans les eaux et est exclusivement associée à une contamination. Sa détection est simple, spécifique et peu onéreuse, elle remplit donc tous les critères pour être un bon indicateur de contamination fécale (Edberg *et al.*, 2000).

L'utilisation de cet indicateur est remise en question depuis qu'il a été montré que certaines souches d'*E. coli* peuvent se multiplier dans l'environnement (Ishii et Sadowsky, 2008 ; Jang *et al.*, 2017). Cependant ces études ont été majoritairement réalisées dans le sol, le sable et les sédiments sous des climats tropicaux et subtropicaux. Une autre limite potentielle de cette espèce bactérienne comme indicateur microbiologique de contamination est la résistance des oocystes de *Cryptosporidium spp* à la désinfection par l'eau de javel, alors que *E. coli* y est sensible (Lopez-Gàlvez *et al.*, 2017). Ces études ne remettent pas en question l'utilisation de *E. coli* comme indicateur de contamination bactériologique de l'eau pour des zones tempérées, les *Cryptosporidium* peuvent être recherchés en paralléle pour évaluer la présence de parasites.

Aujourd'hui seules les bactéries *E. coli* et les entérocoques intestinaux ont été retenus pour évaluer la qualité microbiologique des eaux notamment à usage récréatif par la plupart des pays industrialisés notamment l'Europe (Directive 2006/7/CE), le Canada (HC) et les Etats-Unis (USEPA). En Europe la qualité microbiologique des eaux à usages récréatifs est évaluée par trois valeurs seuils de concentration en *E. coli* et entérocoques intestinaux définissant la qualité de l'eau comme excellente, bonne ou suffisante (tableau 1). La directive européenne 98/83/CE relative à la qualité des eaux destinées à la consommation humaine impose une absence de *E. coli* dans 100 mL d'eau (tableau 2).

Tableau 3: Les différentes étapes de la démarche de l'évaluation du risque en matière de risque sanitaire liés aux agents pathogènes. D'après OMS, directive pour la qualité de l'eau de boisson, 4^{ème} édition.

Étape	Objectif
1. Formulation du problème et identification des dangers	Identifier tous les dangers possibles associés à l'eau de boisson qui peuvent avoir des effets néfastes pour la santé publique, ainsi que leurs voies de transmission de la (des) source(s) au(x) consommateur(s)
2. Évaluation de l'exposition	Déterminer la taille et la nature de la population exposée, ainsi que la voie, l'intensité et la durée de l'exposition
 Évaluation de la dose– réponse 	Caractériser la relation entre l'exposition et l'incidence sur l'état sanitaire
4. Caractérisation du risque	Intégrer les informations sur l'exposition, l'effet dose-réponse et les interventions sanitaires afin d'estimer l'ampleur du problème de santé publique et d'évaluer la variabilité et l'incertitude

2.3. Démarche d'analyse du risque microbiologique dans l'environnement

La maîtrise de la qualité de l'eau repose sur une approche prédictive qui s'appuie sur une démarche quantitative de l'analyse du risque (QMRA : quantitative microbial risk assessment). Cette démarche préconisée par l'OMS est conduite pour une population au statut immunitaire préalablement défini et un agent pathogène donné. La démarche d'analyse du risque s'appuie sur une approche globale comportant 4 étapes (tableau 3). Tous les dangers potentiels, sources ponctuelles (par exemple les rejets d'eaux usées) et diffuses (par exemple le pâturage et l'épandage du fumier) ainsi que les évènements pouvant conduire à la présence de pathogènes de référence, pollution intermittente ou saisonnière, évènements extrêmes et peu fréquents, doivent être identifiés pour chaque composante du réseau d'eau. La deuxième étape consiste en l'évaluation des facteurs d'exposition à ce danger, la détermination des voies de contamination et de l'usage de l'eau (durée, intensité, fréquence). L'exposition dans les environnements aquatiques peut être liée à la consommation d'eau de boisson, et de produits de la mer, à un usage récréatif des eaux ou bien, plus rarement, l'exposition à des aérosols (Legionella). L'évaluation de l'exposition implique l'estimation du nombre d'agents pathogènes auxquels un individu est exposé. L'exposition quotidienne à des bactéries indicatrices de contamination fécale des eaux de boisson contaminées peut être calculée en multipliant leur concentration par le volume d'eau de boisson consommé (c'est-à-dire la dose). La troisième étape est l'évaluation de la dose-réponse permettant de déterminer la probabilité d'un effet sanitaire indésirable (gastro-entérite principalement) après une exposition à un organisme pathogène. Ainsi, la caractérisation du risque nécessite de collecter les données sur l'exposition, la relation doseréponse qui est liée à la virulence du micro-organisme et au statut immunitaire de la personne exposée. La probabilité de contracter une infection est estimée comme le produit de l'exposition à l'eau et de la probabilité que l'exposition puisse provoquer une infection.

Cette démarche permet d'estimer le risque dans une population en tenant compte de la qualité de l'eau brute et de l'impact des mesures de maîtrise des risques. Le risque estimé peut être comparé au risque de référence ou à un risque acceptable déterminé localement. Ces calculs permettent de quantifier le degré de protection d'une source ou de déterminer quel traitement est nécessaire pour atteindre un niveau spécifié de risque acceptable et d'analyser l'impact estimé des modifications des mesures de maîtrise des risques (OMS, directive pour la qualité de l'eau de boisson, 4^{ème} édition).

Synthèse bibliographique - Maitrise de la qualité microbiologique des eaux environnementales



Figure 11: Publications comportant le terme « *Escherichia* coli » dans le titre ou le résumé (■) et total des publications (■) publiées par année. (Pubmed, 27/08/2018)



Figure 12 : Escherichia coli observée en microscopie électronique à balayage (Capitani et al., 2006).



Figure 13: Représentation schématique de l'arbre phylogénétique des microorganismes résidant dans le colon chez l'Être humain (Cheng *et al.*, 2013).

3. L'espèce bactérienne Escherichia coli

L'espèce bactérienne *Escherichia coli* (*E. coli*) a été isolée pour la première fois en 1885 par Theodor Escherich (Escherich, 1885) lors d'une étude sur le microbiote intestinal des nourrissons. La facilité à isoler et cultiver *E. coli* l'ont rendu incontournable en microbiologie. Cette espèce bactérienne a donc logiquement été choisie comme organisme modèle des microbiologistes au début du 20^{ème} siècle. Plus de 200 000 publications comportant le terme « Escherichia coli » ont été publiées à ce jour (figure 11) (Pubmed, 27/08/2018). *E. coli* reste d'actualité avec l'émergence des souches de *E. coli* productrices de shiga toxine, découvertes en 1985, impliquées dans de nombreux scandales alimentaires et touchant plus de 2 millions de personnes par an (Majowicz *et al.*, 2014).

3.1. Caractéristiques de l'espèce

C'est un bacille à Gram négatif appartenant à la classe des Y-protéobactéries mesurant environ 0.5μ m de diamètre et 1.0 à 3.3 μ m de long, mésophile dont la température optimale de croissance est 37°C (Bergey's, 2014). Cette bactérie est mobile avec une structure flagellaire péritriche et non-sporulée (figure 12). Chimio-organotrophe aéro-anaérobie facultatif fermentant le glucose, il existe au moins 180 sources de carbone utilisables par *E. coli* (Sabarly *et al.*, 2011 ; Orth *et al.*, 2011).

L'habitat primaire d'*E. coli* est le microbiote intestinal de l'Être humain et de nombreux animaux. C'est une bactérie colonisatrice du tube digestif des animaux à sang chaud (carnivores, omnivores, herbivores et oiseaux), mais également des reptiles (Gordon et Cowling 2003 ; Tenaillon *et al.*, 2010). L'abondance de *E. coli* chez l'Être humain est de 7,9 ± 0,5.10¹⁰ UFC/ g de fèces, $6,9 \pm 0,5 \ 10^{10}$ UFC/ g de fèces chez les animaux d'élevage (volailles, porc, mouton, vache) de et de $6,2 \pm 0,8 \ .10^{10}$ UFC/ g de fèces chez les animaux sauvages (sanglier, cerf, lapin) (Smati *et al.*, 2015). *E. coli* est l'espèce aérobie la plus représentée dans le tractus intestinal des mammifères, cependant la majorité du microbiote intestinal est composé de bactéries anaérobies strictes dominées par les phyla *Bacteroidetes* et *Firmicutes* qui représentent à eux seuls 90% des bactéries identifiées (figure 13). C'est pourquoi dans les analyses du microbiote par les techniques de séquençage haut débit, le genre *Escherichia* est à la limite du seuil de détection (Arumugam *et al.* 2011; Claesson *et al.* 2012).

Site d'infection		Pathovar	Symptômes
InPEC	Intestin grêle	EPEC (E. coli entéropathogène)	
(<i>E. coli</i> pathogène		ETEC (E. coli entérotoxinogène)	Diarrhées aqueuses
intra intestinar)		DAEC (<i>E. coli</i> à adhérence diffuse)	Diarrhées aiguës
	Gros intestin	EHEC (<i>E. coli</i> entérohémorragique)	Diarrhées hémorragiques, SHU
		EIEC (E. coli entéroinvasif)	Diarrhées aqueuses, dysenterie
	Intestin grêle et gros intestin	EAggEC (E. coli entéroaggrégatif)	Diarrhées persistantes
		AIEC (<i>E. coli</i> à adhérence invasive)	Inflammation intestinale chronique
ExPEC (E. coli pathogène	Système urinaire	UPEC (E. coli uropathogène)	80% des infections urinaires, pyélonéphrites
extra-intestinal)	Système nerveux central	NMEC (<i>E. coli</i> induisant des méningites néonatales)	Méningites, choc septique
	Cerveau: NMEC		

Tableau 4: Les 8 pathovars de E. coli ciblent différents sites d'infections



Figure 14: Les sites d'infections par *E. coli* chez l'Être humain (Croxen et Finlay, 2010).



Figure 15: La proportion de la population de *E. coli* résistantes aux antibiotiques est en augmentation constante dans les selles des habitants de Paris depuis 1980 ; (AMX), amoxicilline/ acide clavulanique (AMC), streptomycine (S), chloramphénicol (C), co-trimoxazole (SXT), tétracycline (TE) et acide nalidixique (NAL) (Massot *et al.*, 2016a).

3.2. Pouvoir pathogène d'E. coli

Alors qu'E. coli est présente dans le tractus gastro intestinal de tous les mammifères, certaines souches sont pathogènes. Au-delà des infections opportunistes causées par des souches du microbiote survenants lors de changement de terrain et/ou infectant des personnes immunodéprimées, il existe des souches pathogènes strictes classées en 8 pathovars selon leurs facteurs de virulence et stratégies d'infection subdivisées en deux groupes selon leurs sites d'infections (tableau 4, figure 14) (Kaper et al., 2004). Les E. coli responsables de gastroentérites notées InPEC pour E. coli pathogène intestinal, regroupent six pathovars responsables de gastroentérites. Les E. coli entero-pathogènes (EPEC), entero-toxinogènes (ETEC), et à adhésion diffuse (DAEC) infectent l'intestin grêle ; les souches d'E. coli entérohémorragiques (EHEC) et entero-invasives (EIEC) infectent le gros intestin ; et les souches d'E. coli entéro-agrégatives (EAggEC) sont capables de coloniser l'intestin grêle et le gros intestin (Croxen et Finlay, 2010). Les E. coli responsables d'infections extra-intestinales notées ExPEC pour E. coli pathogène extra intestinal, regroupent deux pathovars. Les E. coli uropathogènes (UPEC) qui colonisent le système urinaire provoquant des cystites et des pvélonéphrites, et les E. coli responsables de méningites néonatales (NMEC) qui infectent le système nerveux central. Si la plupart des souches de E. coli appartenant aux ExPEC sont liées à des infections du système urinaire, elles peuvent être responsables d'infections de la peau, de myosites, et d'ostéomyélites. Ces pathovars peuvent être impliqués dans des cas de septicémie lorsqu'ils sont retrouvés dans le système sanguin. Ils présentent des fonctions d'adhésion, d'acquisition des nutriments, de compétition, et d'évitement ou de subversion du système immunitaire, (Johnson et Russo, 2005) les distinguant des InPEC et permettant une colonisation efficace de l'hôte.

3.3. La résistance aux antibiotiques chez E. coli

À la virulence des différents pathovars s'ajoute les propriétés d'antibiorésistances des souches d'*E. coli.* Les antibiotiques jouent un rôle fondamental dans la lutte contre les infections bactériennes toutefois leur usage exponentiel en médecine humaine et vétérinaire a créé une pression de sélection qui s'est accompagnée de l'apparition et la dissémination de résistances aux antibiotiques. Des résistances aux β -lactamases, carbapénèmes et quinolones sont acquises chez *E. coli.* La proportion de la population de *E. coli* résistantes aux antibiotiques est en augmentation constante dans les selles des habitants de Paris depuis 1980 (figure 15). Dans son rapport de 2017, l'OMS a classé les *Enterobacteries* dont les *E. coli* résistantes au carbapénemes et céphalosporines 3^{ème} génération dans la liste des pathogènes pour lesquels il faut rechercher de nouveaux antibiotiques ou des voies alternatives de traitement. La dissémination de l'antibiorésistance au sein des communautés bactériennes est attribuée à des transferts horizontaux de gènes ou de supports génétiques mobiles par conjugaison et/ou transposition. Les intégrons sont des supports génétiques souvent présent sur des plasmides et ont un rôle majeur dans la dissémination de résistance aux antibiotiques souvent présent sur des plasmides et ont un rôle majeur dans la dissémination de résistance aux antibiotiques souvent présent sur des plasmides et ont un rôle majeur dans la dissémination de résistance aux antibiotiques pour les bactéries gram négatives (Gillings *et al.*, 2015).



Figure 16 : Les intégrons sont composés de trois parties : *intI* un gène codant pour une intégrase, *attI* un site de recombinaison, et Pc un promoteur. Les gènes exogènes sont recombinés sur le site *attI* par l'activité de l'intégrase codée par *intI* puis exprimés par le promoteur. D'après Gillings *et al.*, 2015.



Figure 17 : Le génome de *E. coli*, ou pan génome est constitué de 4500 gènes dont (i) un core génome stable et conservé d'un peu moins de 2000 gènes commun à toutes les souches de *E. coli* et (ii) une partie variable constituée d'anciens éléments génétiques mobiles intégrés au génome . Le génome de *E. coli* résulte d'une multitude d'évènements de sélection de son habitat primaire et secondaire. L'acquisition et la perte de gènes sont liés aux « points chauds » (en rouge) et façonnent le génome. D'après Van Elsas *et al.*, 2011.

Les intégrons de résistance sont des systèmes génétiques de capture et d'expression de gènes. Ils sont composés de trois parties (i) un gène codant pour une intégrase (intI), (ii) un site de recombinaison (attI) et un promoteur (Pc) (figure 16). Les gènes exogènes sont recombinés sur le site attI par l'activité de l'intégrase codée par intI puis exprimés par le promoteur. La structure conservée de intI permet de détecter les intégrons cliniques de classe 1 (Cambray et al., 2010). Ces intégrons peuvent être intégrés sur le chromosome ou sur d'autres éléments génétiques mobiles (plasmides et transposons) par transfert horizontal et accumuler des gènes d'antibiorésistance (Mazel, 2006; Toleman et al., 2006; Schlüter et al., 2007). Des études cliniques, vétérinaires et environnementales ont montré une corrélation entre le phénotype de multi antibiorésistance de E. coli et la présence d'intégrons « mobiles » de classe 1 (Kotlarska et al., 2014 ; Tajbakhsh et al., 2015). Cet intégron est présent chez 80% des entérobactéries des humains et animaux de ferme (Tenaillon et al., 2010 ; Marchant et al., 2013 ; Liu et al., 2013) pouvant mener à une contamination xénogénetique de l'environnement (Gaze et al., 2011). Des études environnementales ont montré que l'activité humaine provoque l'augmentation des intégrons de classe 1 dans les eaux (Stadler et al., 2012), les biofilms de rivière (Aubertheau et al., 2017), les sédiments (Wright et al., 2008; Zhang et al., 2009b) et les sols sur lesquels l'épandage est pratiqué (Heuer and Smalla, 2007; Binh et al., 2009; Byrne-Bailey et al., 2011; Gaze et al., 2011). Cet intégron a été proposé comme contaminant xénogénetique marqueur de la pollution anthropique (Gillings et al., 2015). En effet l'intégron de classe 1 est lié aux gènes conférant des résistances aux antibiotiques, désinfectants et métaux lourds ; il est trouvé chez une grande variété de bactéries pathogènes et non pathogènes ; son abondance varie rapidement car ses hôtes, les bactéries, ont des temps de générations rapides et il peut être échangé par les bactéries par transfert horizontal.

3.4. Diversité génétique et phénotypique au sein de l'espèce E. coli

Le génome de *E. coli* est entièrement séquencé et annoté, environ 3690 génomes de *E. coli* sont disponibles dans GenBank (novembre 2015), plus de 18 000 gènes sont répertoriés (Van Elsas *et al.*, 2011). Le génome de *E. coli*, ou pan génome est constitué de 4500 gènes dont (i) un core génome stable et conservé d'un peu moins de 2000 gènes commun à toutes les souches de *E. coli* et (ii) une partie variable constituée d'anciens éléments génétiques mobiles intégrés au génome (Touchon *et al.*, 2009 ; Toussaint et Chandler, 2012) (figure 17).

Les chromosomes bactériens sont très organisés malgré le flux massif de gènes transitant dans le génome. Il existe des « points chauds », zones préférentielles d'acquisition ou de délétion de gènes où sont accumulés 71% des gènes de la partie variable du génome (figure 15) (Touchon *et al.*, 2009). Ces évènements aboutissent à des clusters de gènes à l'origine de la diversité phénotypique de *E. coli* qui explique leur adaptation aux modifications de leur environnement (Medini *et al.*, 2008). Alors que la plasticité du génome de *E. coli* permet une adaptation sur le long terme à de nouvelles conditions environnementales celle-ci peut également faire face rapidement et efficacement à des variations de son environnement en adaptant son métabolisme et donc son phénotype. Cette plasticité phénotypique permet à certaines souches de s'adapter à des variations de la concentration ou de la nature de la source de carbone disponible, cette adaptabilité repose sur le contrôle du taux d'expression d'enzymes (Ishii *et al.*, 2007) et la régulation au stress (thermique, oxydatif, phase stationnaire) (Jozefczuk *et al.*, 2010).



Figure 18: Diagramme schématique du cycle de vie de *E. coli* dans l'environnement (d'après Ishii et Sadowski 2008).



Figure 19 : Arbre phylogénétique des phylogroupes de E. coli, d'après Clermont et al., 2013.

La variabilité phénotypique de *E. coli* peut être due à des mutations aléatoires ou à une pression de sélection l'environnement (Sabarly *et al.*, 2016) et permet à *E. coli* une diversité de mode de vie : commensales, saprophytes ou virulents et parfois une combinaison de plusieurs d'entre eux (Touchon *et al.*, 2009 ; Tenaillon *et al.*, 2010 ; Sabarly *et al.*, 2011). Il a été montré que des souches de *E. coli* peuvent persister et se multiplier dans les sols, les sédiments et l'eau (figure 18) (Ishii et Sadowsy, 2008). Ces résultats suggèrent l'existence de populations de *E. coli* naturalisées dans l'environnement. Ces souches présentent des phénotypes différents de celles du microbiote intestinal.

Méthode d'étude de la diversité intra-espèce

Il existe de nombreuses méthodes d'études de la diversité intra-spécifique de *E. coli* par typage moléculaire : multi locus enzyme electrophoresis (MLEE) permettant la caractérisation des souches par une électrophorèse mettant en évidence un grand nombre d'enzymes intracellulaires, ribotypage caractérisant l'ARNr 16S (RFLP, DGGE), multilocus sequence typing (MLST) consistant à séquencer un ensemble de fragments d'ADN (Escobar-Paramo *et al.*, 2004a), Randomly Amplified Polymorphic (RAPD) permet la caractérisation des souches par amplification aléatoire d'éxamères, et la comparaison de génomes entiers.

Au sein du core génome de *E. coli* il existe un polymorphisme nucléotidique de séquences conservées (1000 à 1500 gènes) qui permet de différencier 7 groupes phylogénétiques majeurs (A, B1, B2, C, D, E, F) définis selon l'identification de critères moléculaires communs (figure 19). Cinq clades cryptiques ont été exclus du genre *coli*, ils sont phénotypiquement indifférenciables de *E. coli* mais leurs séquences nucléotidiques sont très divergentes.

Clermont et son équipe ont développé une méthode d'assignation des souches d'*E. coli* à un phylogroupe permettant d'identifier les phylogroupes A, B1, B2 et D (Clermont *et al.*, 2000), puis améliorée après l'identification des phylogroupes C, E et F (Clermont *et al.*, 2013) (figure 16). La détection moléculaire des gènes *chuA*, *yjaA*, *arpA* et le fragment d'ADN TspE4.C2 par PCR (Réaction de Polymerisation en Chaîne) quadruplex permet d'identifier le phylogroupe d'une souche de *E. coli*. Cette méthode demande parfois des PCR supplémentaires pour rechercher plus finement la présence de certains gènes avec d'autres amorces, certains profils étant similaires (par exemple les profils des phylogroupes A et C).

Diversité des populations de E. coli

La distribution des différents phylogroupes au sein d'une population dépend des caractéristiques de son habitat (Tenaillon *et al.*, 2010). Chez l'humain les phylogroupes B2 et A sont les plus représentés au sein de la population commensale de *E. coli* (Clermont *et al.*, 2008, Tenaillon *et al.*, 2010 ; Smati *et al.*, 2013). Cependant les habitudes alimentaires, la consommation d'antibiotiques, les mesure d'hygiènes, l'âge et le sexe influent sur la structure des population d'*E. coli* de son tractus digestif (Escobar-Pàramo *et al.*, 2004, Massot *et al.*, 2016b). En fonction de leurs site infectieux les *E. coli* pathogènes appartiennent à des phylogroupes différents : les InPEC appartiennent majoritairement au phylogroupe B2 (Wang *et al.*, 2013) et les ExPEC sont majoritairement des B2 et D (Escobar-Paramo *et al.*, 2004).
Tableau 5 : Structure des populations de *E. coli* d'animaux d'élevage, domestiques et sauvages. Pourcentage de souches de *E. coli* identifiées comme appartenant à chaque phylogroupe (identification par la méthode Clermont (2013)) suivi du nombre de souche *n* correspondant entre parenthèses. NA signifie que les Clades n'ont pas été recherchés.

animal		phylogroupe									localisation
		A	B1	В2	С	D	E	F	Clades	publication	des prélevements
animaux d'élevage/ domestiques	vache	58,3% (7)	41,7% (5)							Badouei, 2015	Iran
		19% (5)	81% (21)							Johnson et al, 2017	Etats Unis
		5% (8)	74% (127)	0,6 (1)	2% (4)		16% (28)	2% (3)	NA	Morcatti Coura et al, 2015	Brésil
	cochon	32% (8)	40% (10)		8%(2)	12% (3)	8% (2)			Johnson et al, 2017	Etats Unis
	chèvre	7% (2)	41% (11)	44% (12)	4% (1)	4% (1)				Johnson et al, 2017	Etats Unis
	mouton	8% (2)	73% (19)	8% (2)			12% (3)			Johnson et al, 2017	Etats Unis
	poule	46% (12)	42% (11)	4% (1)		8% (2)				Johnson et al, 2017	Etats Unis
	dinde	12% (3)	27% (7)	8% (2)		31% (8)	23% (6)			Johnson et al, 2017	Etats Unis
	oie	16% (4)	64% (16)	4% (1)	4% (1)			12% (3)		Johnson et al, 2017	Etats Unis
	canard	16% (4)	48% (12)	12% (3)	12% (3)	4% (1)			8% (2)	Johnson et al, 2017	Etats Unis
	volaille	43% (64)	34% (51)	2% (3)	7% (10)	4% (6)	4% (6)	6% (9)	NA	Morcatti Coura et al, 2015	Brésil
	cheval	16% (4)	56% (14)	4% (1)		4% (1)	16% (4)		4% (1)	Johnson et al, 2017	Etats Unis
	chat	19% (5)	41% (11)	41% (11)	4% (1)					Johnson et al, 2017	Etats Unis
	chien	19% (5)	33% (9)	30% (8)		11% (3)		7% (2)		Johnson et al, 2017	Etats Unis
animaux sauvages	loup ibérique	28,7% (56)	46,7% (91)	6,7% (13)		18% (35)				Gonçalves et al, 2013	Portugal
	oiseaux	17,5% (104)	40% (237)	18% (106)	0,7% (4)	7% (41)	4,2% (25)	3,7% (22)	9% (54)	Blyton et al, 2015	Australie
	lapin		80% (34)	20% (8)						Alonso et al, 2016	Espagne
	petit rongeur		42,8% (22)	57,2% (30)						Alonso et al, 2017	Espagne
	cervidé	28,6% (35)	53,2% (65)	6,5% (8)			11,7% (14)			Alonso et al, 2018	Espagne
		4% (1)	67% (18)	26% (7)					4% (1)	Johnson et al, 2017	Etats Unis
	castor			100% (3)						Johnson et al, 2017	Etats Unis

Dans le tube digestif des animaux qu'ils soient d'élevage ou sauvages les phylogroupes B1 et A sont les plus souvent retrouvés. Les études portant sur la structure des populations de E. coli du microbiote d'animaux d'Europe du nord ont majoritairement été réalisées en utilisant la méthode Clermont de 2000 ne permettant d'identifier que 4 phylogroupes, pour des questions de comparabilité elles ne sont pas présentées dans le tableau 5 qui regroupe des études réalisées avec la méthode Clermont de 2013. Comme chez l'humain, la structure des populations de E. coli du microbiote animal varie en fonction de son habitat, par exemple la structure de population des E. coli commensales de la vache est significativement différente en Iran (Badouei et al., 2015) et aux Etats-unis (Johnson et al., 2017) tout comme elle est différente chez des cervidés espagnols (Alonso et al., 2018) et américains (Johnson et al., 2017). La proximité de l'animal avec l'être humain influence la structure des populations de E. coli, comme le tableau 5 le met en évidence entre les chiens et les loups, mais également leur profil d'antibiorésistance comme Blyton l'a montré en comparant les E. coli commensales d'oiseaux de basse-cour et d'oiseaux sauvages en Australie (Blyton et al., 2015). Ainsi la structure des populations d'E. coli dans l'environnement reflète son réservoir d'origine et permet de discriminer les sources de contamination.

Dans l'environnement (eau, effluents et sols), les phylogroupes B1 et A semblent être les plus fréquemment retrouvés (Holden *et al.*, 2014 ; Perini *et al.*, 2015 ; Walk *et al.*, 2007). Au laboratoire, des études (sur un site peu anthropisé) basées sur l'identification des phylogroupes, le profil d'antibiorésistance et la présence ou l'absence du gène *hly* ont permis d'identifier l'origine de la contamination microbiologique d'origine fécale d'un hydrosystème. Il a été montré une prédominance du phylogroupe B1 (AtbR ; *hly*+) pour une contamination d'origine bovine et A (multi AtbR ; *hly*-) pour une contamination d'origine humaine (Laroche *et al.*, 2010 ; Ratajczak *et al.*, 2010). Le rapport du nombre de souches appartenant au phylogroupe A sur B1 est directement impacté par l'usage des sols (absence ou présence de bovins en pâturage sur le bassin versant) sur ce site d'étude. Le ratio A/B1 permet de determiner directement l'origine principale de la contamination microbiologique d'otude dont les sources de contamination microbiologiques d'origine s'applique uniquement sur un site d'étude dont les sources de contamination microbiologiques d'origine fécale sont majoritairement bovines et humaines et n'a été testée que sur le site de Norville, faiblement anthropisé.

3.5. E. coli dans l'environnement aquatique

La concentration de l'espèce bactérienne *E. coli* dans l'environnement, dans l'eau, le sol ou les sédiments, est liée à l'activité anthropique et peut provenir de sources ponctuelles de contamination (ex : fosse septique défectueuse) ou de sources diffuses (ex : pâturage) (Brooks *et al.*, 2016 ; Mallin *et al.*, 2000). Dans l'environnement, la survie de *E. coli* dépend de sa capacité à surmonter les stress biotiques : prédation, lyse et compétition avec la flore autochtone, et abiotique : lumière, température, oligotrophie et salinité (Van Elsas *et al.*, 2010 ; Jang *et al.*, 2017). L'environnement exerce une pression de sélection sur les populations de *E. coli* issues du microbiote humain ou animal (habitat primaire), qui induit une disparition rapide d'une partie de la population d'*E. coli* cultivable qui peut persister dans un état viable non cultivable (VNC) (Petit *et al.*, 2017), et ne peut plus être détecté par les méthodes classiques de dénombrement.



Figure 20: Les bactéries peuvent transiter dans les aquifères karstiques sous forme planctonique (A) ou adhérées à des particules (B) mais elles peuvent également y persister dans les sédiments (C), en biofilm (D) ou enchâssées dans la matrice (E) (modifié d'après Goldscheider et al., 2006).

Berthe (Berthe *et al.*, 2013) a montré l'existence de trois profils de survie de *E. coli* dans l'environnement aquatique, les souches survivant deux jours ou moins, majoritaires après un évènement de contamination, celles survivant entre 7 et 14 jours et celles survivant plus de 14 jours qui sont adaptées à l'environnement. La population de *E. coli* persistant dans l'environnement est différente de la population ayant initiallement contaminé l'environnement : phénotypiquement, en terme de résistance aux antibiotiques et de facteurs de virulences.

4. *E. coli* dans les hydrosystèmes karstiques

Les aquifères interagissent avec d'autres écosystèmes et échangent de l'eau, de l'énergie, des substances et des organismes avec la surface. Les eaux de surface peuvent transporter des particules organo-minérale, des contaminants chimiques et microbiologiques dans les hydrosystèmes karstiques (Dussart-Baptista *et al.*, 2003b ; Mahler et Massei, 2007), parfois jusqu'à la source alimentée par le karst. La qualité des eaux de source d'origine karstique dépend de la qualité des eaux de surface entrant dans l'hydrosystème.

Dans les eaux de rivière, après une période pluvieuse sur les bassins versants agricoles caractérisés par des activités de pâturage et d'épandage sur des sols, le ruissellement et le lessivage des sols ménent à la remise en suspension de bactéries fécales, dont des microorganismes pathogènes, présents en surface du sol. Les contaminants sont transportés par les flux d'eau puis concentrés dans les points d'engouffrement (exutoires) des hydrosystèmes. Les quantités de précipitation (Bucci *et al.*, 2015), de ruissellement (Weaver *et al.*, 2016) et d'infiltration (Dwivedi *et al.*, 2016) ont une influence sur la concentration de bactéries d'origines fécales entrant dans l'aquifère (Hamelin *et al.* 2007; Lyautey *et al.* 2010; Ratajczak *et al.* 2010; Petit *et al.* 2017).

4.1. Transport des E. coli dans un hydrosystème karstique

Les principaux facteurs influençant le devenir de *E. coli* au cours de son transfert sont l'attachement, le piégeage dans les pores et son temps de survie (Foppen *et al.*, 2006 ; Foppen et Schijven *et al.*, 2008). Le temps de transfert des bactéries dans l'hydrosystème doit être compatible avec le temps de survie de *E. coli* pour une contamination de la source. Le transport de *E. coli* est influencé par les interactions physico chimiques de la bactérie et de la matrice de l'aquifère (Goldscheideret al., 2006) (figure 20). L'attachement des bactéries à des particules vient jouer un rôle essentiel dans le transport et le devenir d'*E. coli*. En effet, il a été démontré par Garzio-Hadzick *et al.* (2010) que le temps de survie de la bactérie en solution est moindre que lorsqu'elle est attachée à des particules sédimentaires. Peu importe la source de contamination, le transport d'*E. coli* est alors relié à celui des sédiments. Les processus d'érosion, de déposition et de remise en suspension de sédiments doivent ainsi être compris dans l'étude du transport et du devenir d'*E. coli*.

La présence de conduits larges et de vides dans la zone d'infiltration entraine un transfert rapide de l'eau permettant le passage de *E. coli* et rend l'aquifère vulnérable à une contamination bactérienne d'origine fécale (Taylor *et al.*, 2004 ; Engström *et al.*, 2015). Au contraire, si le flux d'eau traverse lentement la matrice poreuse ou de petites failles, la zone d'infiltration peut agir comme un filtre permettant la recharge de l'aquifère par une eau de bonne qualité microbiologique (Sinreich *et al.*, 2014 ; Bucci *et al* 2015).

Tableau 6: Concentration en E. coli dans les eaux karstiques

Source/forage	Usage du bassin versant	Concentration e (UFC/	n E. coli moyenne 100mL)	région d'étude	référence	
		hors évènement pluvieux	après événement pluvieux majeur			
source	rural	0	2.10 ³	Europe, Autriche	Meusburger et al 2007	
		6	1,5.10 ³ Amérique du Nord		T. Johnson et al., 2011	
		4,4.10 ¹	7,5.10 ¹	Europe, Suisse	Pronk et al., 2008	
		5,5.10 ¹	2,5.10 ³	Europe, France	Laroche et al., 2010 ; Ratajczak et al., 2010	
	urbanisé	1,44.10 ²	>2,5.103	Amérique du Nord	T. Johnson et al., 2011	
		2.10 ¹	3,6.10 ²			
		2,6.10 ¹	6,5.10² à plus deAmérique du Nord,2.10³Arkansas		Knierim et al., 2015	
	Mixte (urbanisé et cultivé ou pâturé)	2.10 ¹ à 1,1.10 ³	1,1.10 ⁵ Asie, Vietnam		Nguiyetetal., 2016	
		3,2.10 ¹		Amérique du Nord, Tenessee	Murphy et al., 2010	
		4				
forage	rural	0 à 1.10²	6.10 ²	Europe, Hongrie	Dura et al., 2010	
		<1	<1	Amérique du Nord	T. Johnson et al., 2011	
	urbanisé	1,9.102	>2,5.10 ³			

A bas débit, les bactéries allochtones provenant de la surface associée à des sédiments, dont *E. coli*, peuvent être stockées dans les conduits. Ainsi lors d'évènements orageux, la concentration en *E. coli* augmente avec le premier pic de turbidité associé à la remise en suspension de sédiments intra karstiques (Davis *et al.*, 2005 ; Peterson et Wicz, 2003 ; Ratajczak *et al.*, 2010 ; Knierim *et al.*, 2015 ; Dussart-Baptista *et al.*, 2003). A la contamination venant de la surface, s'ajoute une source secondaire de contamination liée à la suspension de sédiments contaminés (Massei *et al.*, 2003 ; Fournier *et al.*, 2007).

4.2. Contamination des hydrosystèmes karstiques par E. coli

Au regard du nombre de publications sur *E. coli* le nombre d'études portant sur la contamination des hydrosystèmes karstiques par cette espèce bactérienne est très faible. Le tableau 5 présente la vulnérabilité de quelques aquifères karstiques utilisés comme ressource en eau destinée à la consommation humaine (ECDH) à la contamination par *E. coli* (tableau 5). Dans ces études on distingue les sources, résurgences naturelles, des forages artificiels donnant accès à des eaux karstiques. La concentration en *E. coli* des eaux de source varie entre 0 et 1,1.10³ UFC/100mL hors évènements pluvieux et augmente jusqu'à 4 ordres de magnitudes en cas d'évènements pluvieux majeurs. Aux forages, la concentration en *E. coli* varie d'un ordre de magnitude au plus, c'est pourquoi ils sont préférentiellement utilisés aux sources comme ressource en eau potable. Les épisodes de contamination sont à l'origine d'augmentation de cas de gastroentérites chez les consommateurs de ces eaux. (Meusburger *et al.*, 2007 ; Dura *et al.*, 2010). La quantité de précipitations provoquant une contamination des hydrosystèmes dépend généralement du site étudié et n'est pas homogène dans les publications.

L'existence de souches de *E. coli* naturalisées dans les eaux, les sols et les sédiments et la concentration faible mais constante de *E. coli* dans les eaux de source karstique montrée au laboratoire suggère que *E. coli* peut persister à l'intérieur d'un hydrosystème karstique (Petit *et al.*, 2018). Les bactéries adhérées à des particules organo-minérales suivent la dynamique particulaire lors de leur transfert dans l'hydrosysytème. Elles peuvent être stockées dans les sédiments présents dans les conduits, ou adhérer aux surfaces minérales à bas débit et être remises en suspension lors d'augmentatios du débit (figure 20) (Goldscheider *et al.*, 2006). Dans les environnements aquatiques, y compris souterrains, les bactéries sont majoritairement sous forme de biofilms (Golscheider et al. 2006 ; Wilhartitz *et al.*, 2009).

Synthèse bibliographique - E. coli dans les hydrosystèmes karstiques



Figure 21: Les biofilms se forment sur tous types de supports par exemple (A) à la surface de la roche dans une grotte (August Cave, Crédit "Buford Pruitt Jr.") (B) et à l'interface eau/air.

5. Les biofilms

Les bactéries sont rarement sous forme planctonique dans le milieu aquatique, elles sont préférentiellement en communautés complexes adhérant à des surfaces, les biofilms (Branda *et al.*, 2004). Il a d'ailleurs été montré que des biofilms se développent sur toutes les surfaces en contact avec de l'eau non stérile (Flemming et Wingender, 2011). Les biofilms peuvent être composés d'une seule espèce bactérienne (ex : *Vibrio cholerae*, Teschler *et al.*, 2015) mais dans l'environnement, ils sont le plus souvent hétérogènes, composés de plusieurs espèces bactériennes, archés, mycetes, algues et protozoaires. Localisés à une interface (eau/air, solide/air) (Costerton *et al.*,1999 ; Hall-Stoodley et Stoodley, 2009; Jacques *et al.*, 2010), les biofilms sont ubiquitaires, ils se développent sur tout type de support biologique ou abiotique (figure 21). Les bactéries en biofilm présentent une augmentation de leur taux de survie et de résistance aux stress chimiques et environnementaux (Flemming *et al.*, 2016).

Ces agrégats de microorganismes sont enchâssés dans une matrice d'exopolymères (EPS) hydratée sécrétée par les microorganismes représentant les 2/3 du biofilm, le 1/3 restant étant composé de microorganismes. La matrice est constituée d'EPS, des bio polymères composés de protéines, glycoprotéines et glycolipides, et d'ADN extracellulaire mais aussi de composés insolubles comme l'amyloïde, la cellulose, les fimbriae, pili et flagelles. La composition de la matrice est dépendante de l'environnement et des bactéries composant le biofilm. La matrice très hydratée (97% d'eau) maintient les cellules du biofilm liées entre elles. La résistance de la structure du biofilm est cruciale pour la stabilité du biofilm et les interactions basées sur la proximité des différents organismes du biofilm. Cette matrice interagit avec l'environnement : elle permet au biofilm d'adhérer aux surfaces, et séquestre des substances dissoutes ou des particules de l'environnement, sources de nutriments des micro-organismes du biofilm. La présence de pores et de tunnels entre les micro-colonies du biofilm formant des vides dans la matrice permet de faciliter le transport du liquide et des nutriments. La diffusion des molécules au travers de la matrice n'est pas homogène, créant des gradients chimiques au sein du biofilm menant à la formation de micro-niches écologiques. Dans les biofilms naturels la production d'EPS est variable et coordonnée par le quorum sensing (système de communication intercellulaire) (Flemming et Wingender, 2010).

L'expression des gènes impliqués dans la synthèse de la matrice est régulée par un système de communication cellulaire, le quorum sensing. Ce système de communication interspécifique repose sur la synthèse, la sécrétion et la reconnaissance d'une molécule signal appelée autoinducteur permettant une communication bactérienne. Chaque bactérie du biofilm sécrète des auto-inducteurs, de l'homosérine lactone acylé (HLA) pour les bactéries Gram négatifs; la multiplication de la population provoque une augmentation de la concentration extracellulaire en auto inducteur. Lorsqu'une valeur seuil de la concentration locale en auto inducteur est atteinte, son récepteur est activé permettant l'expression d'un ou plusieurs gènes (figure 20). Ce mécanisme permet une régulation collective de l'expression de gènes, en fonction de la densité cellulaire, pour la sécrétion de l'EPS, la production de facteurs de virulences ou de surfactants de la population en biofilm. La communication intercellulaire au sein du biofilm constitue la base des interactions sociales entre cellules permettant la coordination de son activité métabolique mais aussi de sa formation.



Figure 22: (A) Représentation schématique des 4 étapes de la formation du biofilm: l'adhésion réversible, l'adhésion irréversible, la formation de micro-colonies et la maturation du biofilm. (B) Une fois le biofilm mature, des cellules peuvent retourner à l'état planctonique par reprogrammation génétique ou par arrachage mécanique (modifié d'après Bjarnsholt *et al.*, 2013).

5.1. Formation des biofilms

La première étape de la formation d'un biofilm est l'adhésion réversible de bactéries planctoniques à une surface qui dépend de l'équilibre des forces attractives et répulsives entre la bactérie et la surface (Satpathy et al., 2016). L'adhésion dépend des conditions environnementales telles que la température, le pH, la force ionique, la vélocité et la turbulence du milieu liquide environnant et la rugosité de la surface auxquelles s'ajoutent des propriétés bactériennes telles que leur hydrophobicité et leur motilité (Danese et al., 2000). Les premières bactéries adhérées, les « bactéries pionnières » adsorbent des macromolécules et forment un « film de conditionnement ». Lors de la seconde étape des bactéries adhérent à la surface conditionnée autant de façon aléatoire que par chiomiotactisme formant des micro-colonies. Les molécules organiques constituant le film de conditionnement peuvent aussi servir de source de nutriments pour les bactéries en cours d'attachement. L'attachement des bactéries à la surface conditionnée entraîne une cascade de modifications physiologiques qui correspondent à un nouveau programme d'expression de gènes. Les bactéries adhérées perdent leur appendice, le flagelle. La troisième étape est la maturation du biofilm au cours de laquelle les bactéries se multiplient et sécrètent (i) des composants de la matrice d'exopolymères qui constituent le « ciment » qui va tenir entre elles les bactéries et maintenir ancrés à la surface les éléments de ce biofilm et (ii) des auto-inducteurs impliqués dans la communication intercellulaire. Le biofilm devient une structure tridimensionnelle grâce aux interactions intercellulaires au travers de protéines de surface et de la matrice extracellulaire (figure 22A). La dernière étape de la formation d'un biofilm est la libération de cellules ou d'agrégats de cellules du biofilm dans le milieu, la desquamation. Cette étape peut être directement provoquée par des contraintes physiques, telles qu'un débit important (biofilm à l'interface eau/solide), ou chimiques telles que la disponibilité de nutriments. Ce processus est coordonné pour libérer des cellules spécifiques à l'étape finale du cycle de vie du biofilm. Certaines cellules sont lysées pour servir de source de nutriment aux bactéries qui vont se détacher. Celles-ci inhibent l'expression des gènes codant pour la production d'exopolysacharides (composant principal de la matrice du biofilm) et de fimbriae (permettant la cohésion inter-cellulaire) et activent les gènes codant pour des protéines impliquées dans le chimiotactisme (permettant aux bactéries de s'orienter en fonction des gradients chimiques du milieu) et la formation de flagelles (permettant la motricité) nécessaires pour retourner à l'état planctonique (Rollet, 2009) (figure 22B).



Figure 23: Représentation schématique des interactions et des échanges entre les bactéries et avec le milieu des bactéries en biofilm. Modifié d'après Flemming *et al.*, 2016.

5.2. Un habitat protégé

Le mode de vie en biofilm permet la protection des bactéries des variations physico chimiques externes par la matrice qui forme un microenvironnement stable entouré d'une barrière hydrophobe (figure 23). Les EPS et les pores de la matrice peuvent piéger des nutriments et d'autre molécules par sorption. Les biofilms sont des systèmes adsorbant complexes grâce à différents mécanismes d'adsorption et des sites d'accrochage (dans le cytoplasme des cellules du biofilm, les membranes cellulaires et la matrice d'EPS). Une grande variété de substances peut être piégée et accumulée dans le biofilm, même des composés présents à de très faibles concentrations dans le milieu, permettant aux biofilms de croître dans des milieux oligotrophiques. La matrice a également un rôle de système de digestion extracellulaire, les enzymes extracellulaires sécrétées par les cellules du biofilm sont séquestrées par la matrice, elles interagissent avec certains composés des EPS comme les polysaccharides générant une matrice activée (Tielen et al., 2013). La diffusion des molécules au travers de la matrice est hétérogène formant des gradients chimiques au sein du biofilm. Cette hétérogénéité mène à la formation de micro-niches écologiques au sein du biofilm offrant des environnements adaptés à un grand nombre d'espèces bactériennes (Gregory et al., 2014 ; Stewart et Franklin, 2008). Il existe une hétérogénéité dans la localisation des especes bactériennes mais aussi des activités métaboliques au sein du biofilm, même dans des biofilms mono espèces. Certaines activités métaboliques sont localisées et contribuent à la formation de gradients dans le biofilm. La diversité phénotypique des bactéries au sein du biofilm permet la coordination du biofilm dans son ensemble (Flemming et al., 2016) (figure 22). De plus la matrice offre un environnement physiquement stable favorable pour les contacts cellule-cellule nécessaire pour les transferts de gènes (Madsen et al., 2012; Maeda et al., 2004) favorisant les échanges génétiques par transfert horizontal au sein des biofilms (Schwartz et al., 2003 ; Fux et al., 2005). Les taux de transfert de gènes horizontaux sont significativement plus important dans les communautés bactériennes en biofilms que dans celles à l'état planctonique (Madsen et al., 2012). De plus, la matrice conserve tous les composants des cellules lysées, y compris leur ADN disponible pour un transfert horizontal (Flemming et Wingender, 2010).

Il existe également une coopération métabolique au sein des biofilms, certains nutriments sont métabolisés par une espèce et leur produit est utilisé par une autre (Koch *et al.*, 2015, Christensen *et al.*, 2002). Les micro-organismes bénéficient ainsi de l'activité métabolique de l'intégralité de la communauté, les interactions mutualistes sont d'ailleurs fréquentes dans les biofilms (Ren *et al.*, 2015; Seo *et al.*, 2012; Elias et Banin, 2012).



Figure 24: La structure de certains biofilms montre la co-agrégation d'un colonisateur primaire avec une espèce bactérienne dite « organisme pont » (ici *F. nucleatum*) ayant un fort pouvoir de co-agrégation avec d'autres espèces dites « colonisateurs tardifs ». Co-agrégation bactérienne dans un biofilm parodontal. Modifié d'après Karched *et al.*, 2015.

Les interactions entre différentes espèces bactériennes pour la facilitation de la formation de biofilm ont été prouvées, notamment pour les biofilms parodontaux (Hojo *et al.*, 2009 ; Kolenbrander, 2011) (figure 24). La structure de certains biofilms dentaires montre la co-agrégation d'un colonisateur primaire avec une espèce bactérienne dite « organisme pont » (*F. nucleatum* par exemple) ayant un fort pouvoir de co-agrégation avec d'autres espèces dits « colonisateurs tardifs ». Dans ces biofilms très structurés la disposition des bactéries dépend de leur rôle dans la communauté. Les colonisateurs tardifs protègent les couches inférieures du biofilm (Karched *et al.*, 2015) (figure 24).

Alors que les mécanismes de coordination par communication intercellulaire et d'échange de métabolites suggèrent une coopération entre les microorganismes d'un même biofilm il a été montré dans une étude sur des biofilms aquatiques une majorité d'interactions de compétitions (Foster et Bell, 2012). Ces interactions négatives dominantes pourraient permettre la stabilité dans le temps de communautés exposées à des colonisations allochtones comme montré dans le microbiote humain (Coyte *et al.*, 2015).

5.3. Occurrence de bactéries pathogènes allochtones en biofilm dans les environnements aquatiques

Des bactéries pathogènes opportunistes sont naturellement présentes dans l'environnement aquatique et ont la capacité de persister sur de longues périodes et de se multiplier dans des biofilms. Les principaux genres identifiés sont *Aeromonas spp., Legionella spp., Mycobacterium spp.*, mais également l'éspèce *Pseudomonas aeruginosa* et certaines enterobacteries (*Citrobacter spp., Enterobacter spp., Klebsiella pneumoniae*). Les espèces bactériennes pathogènes *Salmonella enterica* (e.g., *serovar Typhi, Paratyphi et Typhimurium*), *Shigella spp., Vibrio cholerae*, certaines *E. coli* (e.g., *E. coli enterotoxigenique, E. coli 0157:H7 enterohaemorrhagique*), Yersinia enterocolitica, Campylobacter spp. et Helicobacter *pylori* impliquées dans des maladies d'origine hydrique ont également la capacité de former des biofilms ou de s'intégrer à des biofilms dans l'environnement aquatique et d'y persister (Wingender et Flemming, 2011). La présence de *E. coli*, dont des *E. coli* productrices de Shigatoxine (STEC), dans des biofilms aquatiques a été détectée dans des rivières (Cooper *et al.,* 2007; Maal-Bared *et al.,* 2007) et dans des eaux souterraines (Banning *et al.,* 2003).

5.4. Le rôle des biofilms comme réservoirs de résistance aux antibiotiques

Les environnements aquatiques (rivières, lacs et réservoirs) sont exposés de façon chronique à une concentration faible mais constante de polluants chimiques. Cette exposition à des contaminants tels que les antibiotiques, analgésiques, anti-inflammatoires, β -bloquants, métaux et pesticides, qui peuvent être piégés dans la matrice du biofilm (Aubertheau *et al.*, 2017), a un impact sur la composition, l'activité et la résilience des biofilms des rivières et lacs (Balcàzar *et al.*, 2015).

Synthèse bibliographique - Les biofilms

Le mode de vie en biofilm permet aux bactéries une résistance accrue aux antibiotiques. La croissance lente et l'état de dormance sont considérés comme des méthodes de survie pour les bactéries en biofilm exposées à des substances antimicrobiennes. Les biofilms contiennent des cellules en phase stationnaire présentant une susceptibilité réduite à beaucoup d'antimicrobiens ciblant le métabolisme des bactéries. Les faibles taux de croissance peuvent mener à un état viable non cultivable (VNC) ou d'autres formes de dormance. Certaines cellules dormantes sont des « persisters », des populations multi-résistantes phénotypiquement différentes des autres (Flemming *et al.*, 2016). La proportion importante de cellules en phase stationnaire suggère la présence de persisters dans les communautés en biofilm (Lewis, 2005 ; Waters *et al.*, 2016)

Pour déterminer l'impact de l'exposition des biofilms aux antibiotiques, des études sur la présence de gènes de résistance et d'éléments génétiques mobiles (dont les integrons cliniques de classe 1) dans des biofilms et dans l'environnement aquatique dans lequel ils s'étaient développés ont été réalisées. L'exposition chronique à ces substances exerce une pression de sélection sur les communautés bactériennes des biofilms et peut favoriser l'émergence et la dissémination de résistance aux antibiotiques (Chow et al., 2015; Balcàzar et al., 2015; Aubertheau et al., 2017). Des gènes de résistances à la vancomycine et à la tétracycline ont été détectés dans des biofilms en absence de bactéries allochtones résistantes aux antibiotiques suggérant la persistance de gènes de résistances aux antibiotiques dans des biofilms environnementaux. Le pourcentage d'isolats portant l'intégron clinique de classe 1 est plus important dans les biofilms que dans les eaux et sédiments, en l'absence d'exposition à des antibiotiques (Farkas et al., 2013; Gillings et al., 2008; Aubertheau et al., 2017). Ces résultats montrent la persistance de gènes conférant des résistances à des antibiotiques plus longues dans les biofilms que dans les bactéries à l'état planctonique ou associées aux sédiments dans les environnements aquatiques. Les biofilms jouent le rôle de réservoirs de gènes de résistance aux antibiotiques et peuvent être considérés comme des indicateurs biologiques de contamination aux antibiotiques d'un environnement (Sabater et al., 2007). Le rôle de réservoir de gènes de résistance des biofilms associé à la fréquence de transfert de gènes élevée pourrait faire de ces structures des « hots spots » d'échange génétique entre les communautés environnementales et pathogènes. Le décrochage de ces bactéries antibiorésistantes des biofilms peut mener à la contamination de l'eau à destination de la consommation humaine (ECDH) comme montré dans un réseau de distribution d'eau potable (Zhang et al., 2018).

Lorsque ces bactéries pathogènes opportunistes ou non sont au sein des biofilms elles ne sont pas détectables par les méthodes classiques de dénombrement des bactéries cultivables dans l'eau, ne permettant de dénombrer que les bactéries planctoniques. Le détachement de bactéries pathogènes induisant une forte concentration bactérienne localisée, dans la colonne d'eau présente un risque de contamination microbiologique inattendu. Synthèse bibliographique - Les biofilms

Problématique de thèse

Ces travaux de thèse ont pour but d'étudier quels facteurs abiotiques (hydrologie) et biotiques (usage du bassin versant) sont responsables d'une contamination par *E. coli* de l'eau et des biofilms de l'hydrosystème de Norville, un système karstique binaire et faiblement anthropisé.

Dans un premier temps l'objectif de ces travaux de thèse était de déterminer les conditions d'hydrologie et d'usage du bassin versant, à l'origine d'évènements de contamination microbiologique pour calculer un indicateur facile à mesurer et à utiliser pour caractériser et anticiper les épisodes de contamination des eaux de surface et de source karstique. L'indicateur, noté IndiCE, a été élaboré à partir de l'analyse des données hydrologiques et climatiques (conductivité électrique, turbidité, pluviométrie et température) enregistrées sur 4 ans. Il a été calibré par comparaison avec les concentrations en *E. coli* mesurées dans l'eau de la perte et validé par comparaison avec les concentrations en *E. coli* mesurées dans l'eau de la source. Un total de 15 campagnes de prélevement ont été réalisées au cours de ces travaux, permettant de constituer une collection de 742 souches de *E. coli* dont la structure des populations à été étudiée par la méthode Clermont (Clermont *et al.*, 2013) pour déterminer la source de contamination et l'influence des conditions hydrologiques sur les structures de population de *E. coli* circulant dans l'aquifère.

Dans un second temps, pour analyser plus finement le devenir de *E. coli* dans les hydrosystème karstique, le rôle de réservoir de *E. coli* et des intégrons de classe 1 des biofilms intra-karstique a été étudié. La formation de biofilms sur de la craie par *E. coli* et la flore autochtone de la craie en conditions oligotrophique a été testée en chemostat. La présence de *E. coli* et des intégrons de classe 1 au sein de biofilms formés à la source de l'hydrosystème karstique a été suivie en utilisant plusieurs méthodes : la quantification des *E. coli* cultivables et la détection par PCR de *intI1* au sein de cette collection de souches, la quantification d'un gène spécifique de *E. coli* et de l'intégron de classe 1 par qPCR, et le marquage par une sonde FISH spécifique de *E. coli* pour la détection en microscopie confocale. Dans cette partie qui repose sur une approche *in situ*, un support à biofilm a été crée pour être exposé dans l'eau de la source du karst étudié.

- Les biofilms

Partie 1 : -

Partie 1 :

Présentation du site d'étude L'hydrosystème karstique de Norville

Présentation du site d'étude L'hydrosystème karstique de Norville -





Figure 25 : Coupe schématique de l'anticlinal de Villequier (Pleuvret el al, 1997).

Figure 26 : Localisation du secteur d'étude (Massei, 2001).

1. Présentation générale

Le système karstique de Norville est l'un des sites atelier du système national d'observation du karst labellisé INSU CNRS. Il est étudié par le laboratoire M2C depuis plusieurs décennies permettant une bonne connaissance de sa structure et son fonctionnement.

D'un point de vue structural global, le Pays de Caux est caractérisé par des formations de craie subhorizontales, présentant un pendage faible vers l'Est. De grands accidents découpent le substrat crayeux en plusieurs compartiments. Au niveau de l'extrémité de la Basse-Seine, des mesures par sondage de la profondeur du toit des argiles du Gault (base de la craie) ont montré deux structures anticlinales (anticlinal de Villequier au Sud, au niveau de Villequier et Triquerville, et anticlinal d'Yvetot-Yerville au Nord) encadrant une structure synclinale (Hauchard *et al.*, 2002). L'anticlinal de Villequier est limité au Sud par une faille normale conforme (faille de Triquerville) subverticale d'orientation N70E dont le rejet vertical atteint 200 m (figure 25).

Du point de vue lithologique, le compartiment sud est constitué par de la craie blanche à silex du Coniacien. On distingue dans la partie inférieure 40 à 50 m de craie blanche ou jaunâtre à zones limonitiques et argileuses localisées sur des fissures. Les bancs ont des tailles métriques et sont séparés par des bancs de silex noirs de taille centimétrique. La partie supérieure du compartiment sud est une craie très blanche à grains de glauconie. Les bancs d'épaisseur métrique contiennent des silex libres ou en bancs plus épais que ceux de la partie inférieure. Le compartiment nord a une lithologie plus variée : le Kimméridgien (Jurassique supérieur) affleure dans la région de Villequier sous la forme d'argiles gris-noir et de calcaires marneux. Le Crétacé inférieur transgressif sur le Kimméridgien débute par des sables argileux et se poursuit par des grès ferrugineux et des sables verts aquifères. L'Albien est représenté par des argiles noires de faciès Gault, très glauconieuses, constituant le mur imperméable de la nappe du Vraconien (Cénomanien inférieur). Le Vraconien est caractérisé par des silts gris micacés, siliceux et pyriteux. Le Cénomanien est constitué par de la craie à silex, ces derniers étant moins abondants dans la partie supérieure que dans la partie inférieure. Le Turonien correspond à de la craie blanche tendre ou jaunâtre indurée souvent pauvre en silex.

Le système karstique du Hannetot est situé sur la rive droite de la Seine, à une quarantaine de kilomètres de l'estuaire sur la rive nord (figure 26). C'est un système karstique binaire, comme tous les karsts de la région, avec une partie crayeuse sous une partie de couverture superficielle. Il est composé d'une perte sur le plateau, qui permet l'engouffrement du cours d'eau pérenne nommé le Bébec, et d'une source en pied de plateau, qui permet la résurgence des eaux de la nappe de la craie (Figure 27). Cette source alimentait en eau potable les 5 000 habitants des 4 communes avoisinantes (Triquerville, Norville, Saint-Maurice-d'Etelan et Petitville) jusqu'en 1992. Mais la pollution turbide des eaux de la source devenait trop fréquente pour assurer l'exploitation et la distribution des eaux. Un forage, tubé dans les alluvions et crépiné dans la craie, a donc été mis en place afin d'exploiter les eaux de bonne qualité de la nappe de la craie. Ce forage se situe dans la plaine alluviale de Norville à 130 m de la source et à 300 m de la Seine.



Figure 27 : Profil topographique du karst de Norville (●) perte du Bébec, (●) source du Hannetot et (− -) faille de Triquerville.



Figure 28: Usage des sols sur le bassin versant du Bébec (source: géoportail) (■)maïs ensilage,(■) prairie permanente,(■) prairie temporaire ,(■) lin fibres, (■) pois de printemps, (■) avoine, (■) blé tendre, (■) pommes de terre, (■) verger, (■) habitations, (━) le Bébec, (−-) contours du bassin versant du Bébec, (●) source du Bébec, (●) perte du Bébec.

Présentation du site d'étude L'hydrosystème karstique de Norville - Fonctionnement hydrologique du bassin versant du Bébec

2. Fonctionnement hydrologique du bassin versant du Bébec

Le bassin versant du Bébec d'une superficie de 8,6 km² est situé entre la vallée de Lillebonne à l'ouest et celle de Maulévrier à l'est (Figure 27). La limite sud est une limite naturelle constituée par le front de falaise du plateau. Ce bassin versant que l'on peut considérer comme élémentaire (Slimani *et al.*, 2009) est caractéristique du Pays de Caux avec d'importantes surfaces cultivées (50%) ou vouées à l'élevage, 25% des terres sont pâturés et 1200 bovins sont enregistrés sur les 3 communes du bassin versant (données fournies par SRISE- DRAAF Normandie). Il est parsemé de hameaux et de petits bourgs, 639 habitants répartis dans 213 logements ont été enregistrés (figure 28).

Le Bébec est un cours d'eau pérenne issu de la source diffuse de la nappe du Cénomanien qui forme une mare à 2,2 km (lieu-dit : les Mouillants) en amont de la perte à 117 m d'altitude. Il s'écoule ensuite sur l'assise imperméable du Gault dans un fossé, puis dans un lit, pour disparaître dans la perte du Bébec. Le Bébec est le seul cours d'eau permanent sur le bassin, mais lors des fortes pluies la plupart des drains temporaires qui l'alimentent sont actifs. Ce bassin versant du Bébec montre donc des caractéristiques géomorphologiques (forte pente, densité de drainage élevée) annonçant un comportement hydrologique très sensible aux fortes précipitations. Ces caractéristiques confèrent à ce bassin versant une forte réactivité aux pluies et à son cours d'eau un régime de type torrentiel par rapport aux autres bassins versants régionaux (Slimani, 2009). Ceci explique la forte variabilité au débit du Bébec : de 3 L/s en étiage à 1 m³/s lors des crues hivernales exceptionnelles. Dans des conditions d'étiage ou lors de faibles crues, l'intégralité des eaux du Bébec est engouffrée à la perte, alimentant alors l'aquifère crayeux karstique. Lors de très fortes crues ou de longues périodes de pluie, la perte sature : lorsque le débit maximal admissible, évalué à 50 L/s, est atteint, la perte déborde (Massei, 2001), alimentant ainsi une ravine ; ruisseau temporaire qui suit son cours jusqu'à la Seine. Mais pour les crues les plus fortes, la ravine ne suffit plus à évacuer le trop-plein de la perte et déborde à son tour, occasionnant l'inondation du fond de vallée et des habitations s'y trouvant. Afin d'éviter les débordements de la perte et les inondations que cela provoque, des bassins de rétention ont été mis en place sur le bassin versant en 2001.

Présentation du site d'étude L'hydrosystème karstique de Norville - Fonctionnement hydrologique du bassin versant du Bébec



Figure 29: Schéma d'écoulement et de transport du karst de Norville, (Massei, 2001).

Présentation du site d'étude L'hydrosystème karstique de Norville - Fonctionnement hydrogéologique du système karstique

3. Fonctionnement hydrogéologique du système karstique

Le système introductif est constitué par la perte du Bébec située sur la faille de Triquerville qui met en relation le bassin versant superficiel avec la nappe de la craie. Une série d'anciennes pertes, correspondant aux anciennes positions du lit du Bébec, sont également disposées le long de cet accident. La source du Hannetot est une source de débordement en pied de plateau, située juste au bord de la plaine alluviale de la Seine. Elle constitue une surface libre de la nappe de la craie. Cette dernière, libre au niveau du plateau, devient captive sous les alluvions de la Seine à l'endroit du forage. Plusieurs essais de traçage ont été effectués entre la perte, la source et le forage afin de mettre en évidence les connexions entre ces trois points (Massei, 2001). Dans tous les cas, elles ont été vérifiées puisque le traceur a toujours été retrouvé. L'analyse de la distribution des temps de séjours des traçages à la source permet une estimation des paramètres hydrauliques et hydrodispersifs. Les temps de transfert entre la perte et la source varient, en fonction des conditions hydrodynamiques, entre 8 et 24 heures. Les vitesses de transferts apparentes varient entre 52 et 180 m/h. Les taux de restitution forts et l'absence d'évolution des distributions microgranulométriques des particules laissent supposer un transport conservatif dans un réseau assez peu complexe, avec un conduit principal prenant en charge la majeure partie de l'écoulement provenant de la perte (Massei, 2001). Lors des forts épisodes pluvieux, la source est systématiquement atteinte par la turbidité, de même que le forage bien que le signal y soit très faible. Massei (2001) a mis en évidence des phénomènes de stockages-relargages de particules à la source et au forage. Ceux-ci sont caractérisés par (i) une composante autochtone ou endogène due au processus de karstification (altération chimique et dépôt des insolubles de la craie dans l'endokarst), (ii) une composante allochtone ou exogène (introduction des produits de l'érosion de surface). Massei (2001) a proposé à l'issue de sa thèse un schéma conceptuel du fonctionnement du système karstique du Hannetot (Figure 29).

Présentation du site d'étude L'hydrosystème karstique de Norville - Fonctionnement hydrogéologique du système karstique



Figure 30: Contamination microbiologique des eaux de l'hydrosystème karstique par *E. coli* (Petit *et al.*, 2018).



Figure 31: Suivi de la concentration (\blacktriangle) et de la structure des populations de *E. coli* lors d'un épisode de crue, suivi par la turbidité (\bullet -) à la perte (modifié d'aprés Ratajczak *et al.*, 2010)

Présentation du site d'étude L'hydrosystème karstique de Norville - Vulnérabilité microbiologique du karst de Norville

4. Vulnérabilité microbiologique du karst de Norville

Les travaux menés au laboratoire entre 2007 et 2010 ont montré une contamination par *E. coli* cultivable des eaux de l'hydrosystème dépendante des conditions hydrologiques, avec une concentration 10 fois inférieure à la source par rapport à la perte. L'usage du bassin versant et les conditions hydrologiques ont un impact sur la concentration et la structure des populations de *E. coli* des eaux de surface (le Bébec et la perte) et de la source karstique. Durant une période humide ou après un évènement orageux, des bactéries fécales d'origine humaines, issues de fosses septiques défectueuses, et bovines contaminent l'eau par ruissellement et lessivage des sols. Une méthodologie d'identification de la source de contamination a été développée sur ce site d'étude sur la base du calcul du rapport de *E. coli* appartenant au phylogroupe A (origine humaine) sur B1 (origine bovine) (Ratajczak *et al.*, 2010 ; Laroche *et al.*, 2010) (Synthèse bibliographique section 3.4., Diversité des populations de *E. coli*).

Lors d'une crue la concentration maximale en *E. coli* (4.10^4 UFC/100 mL à la perte) est atteinte au pic de crue, avec des *E. coli* appartenant majoritairement au groupe phylogénètique A (56%), caractérisant une contamination d'origine humaine, dont 63% sont résistantes au moins à un antibiotique et dont certaines ont jusqu'à 8 résistances associées. 19h après l'évènement, la concentration en *E. coli* diminue et la structure de la population de *E. coli* correspond à une contamination par des bovins (74% B1, hly+, AtbR) (Ratajczak *et al.*, 2010). Durant une période sèche en présence de bovins et en absence d'évènement de ruissellement ou de lessivage, les eaux présentent un faible niveau de contamination en *E. coli* (6,2.10² UFC/100mL) appartenant majoritairement au groupe phylogénétique B1 (hly-,AtbS) (Figure 30 et Figure 31). Ces résultats suggèrent qu'à la suite d'un événement de contamination, certaines souches d'*E. coli* provenant d'une contamination bovine sont sélectionnées par la pression environnementale et peuvent persister dans l'eau.

La proportion d'*E. coli* résistantes au sein de la population totale constitue environ 50% des *E. coli* isolées des eaux de surface et au minimum 30% de celles isolées des eaux de source. Les souches d'*E. coli* résistantes dans cet hydrosystème sont rarement multirésistantes. Elles sont majoritairement résistantes à la tétracycline et/ou au chloramphénicol. Cette dernière résistance représente environ 60% des résistances observées chez les *E. coli* isolées des bouses permettant d'identifier cette contamination comme étant d'origine bovine. Les évènements de crue sont un facteur déterminant de la circulation d'*E. coli* résistantes aux antibiotiques suggérant que ces souches ne persistent pas l'environnement karstique (Laroche *et al.*, 2010).

La recherche de l'intégron de classe 1 sur 224 *E. coli* isolées en période de crue, condition dans laquelle la population de *E. coli* présente le plus de multi-résistances aux antibiotiques, n'a pas permis de le détecter (Laroche *et al.*, 2010) ce qui peut être expliqué par le peu d'anthropisation du site étudié.

Présentation du site d'étude L'hydrosystème karstique de Norville - Vulnérabilité microbiologique du karst de Norville



Figure 32: Équipements du site de Norville (A) source de Norville équipée de sondes multiparamétriques, (B) préleveur ISCO, (C) pluviomètre installé dans la plaine alluviale de la Seine.

Présentation du site d'étude L'hydrosystème karstique de Norville - Caractérisation hydrologique et climatique du site d'étude de 2013 à 2017

L'espèce bactérienne *Pseudomonas oryzihabitans* a été isolée du karst de Norville, à la perte, la source et dans le réseau d'eau potable alimenté par le karst de la craie grâce à la résistance au traitement par chloration des souches circulant dans cet hydrosystème. Cette espèce bactérienne est majoritairement adhérée à des particules en suspension, cependant elle a été détectée également en absence d'évènements turbides (Dussart *et al.*, 2003; Dussart-Baptista *et al.*, 2007) suggérant une colonisation de l'hydrosystème par cette bactérie.

5. Caractérisation hydrologique et climatique du site d'étude de 2013 à 2017

Depuis la thèse de Massei (2001), les travaux en hydrologie karstique menés au laboratoire (Massei *et al.*, 2002, 2003, 2006 ; Fournier *et al.*, 2007 ; Dussart-Baptista, 2007 ; Valdes *et al.*, 2006 ; Duran, 2015) suivent tous la même méthodologie d'étude basée sur l'acquisition :

- de séries continues de pluviométrie, conductivité, turbidité, pour une étude couplée de ces variables respectivement traceuses des éléments dissous, particulaires et de l'hydrodynamisme des aquifères
- ii) de données ponctuelles sur la microbiologie des eaux.

La source de Norville est équipée d'une station de mesure comprenant une sonde multiparamètres TROLL 9500 disposant d'un capteur de turbidité, un capteur de conductivité/température et un capteur de pression (Figure 32A). Les sondes sont étalonnées et calibrées à l'aide du logiciel de contrôle WIn situ 4. Les valeurs de turbidité, conductivité et températures sont enregistrées selon un pas de temps de 15 minutes. Les données sont exportées et converties au format *.csv, facilement utilisable avec un tableur, qui est utilisé pour le traitement et la mise en forme. Les données de pluviométrie de 2010 à 2015 sont fournies par la CODAH, elles proviennent d'un pluviomètre situé à Saint Nicolas de la Taille (soit 14 km de la source de Norville) (Figure 32C). Depuis 2015 les données sont enregistrées par un pluviomètre (ISCO 671 Rain Gauge) mis en place par le laboratoire M2C à proximité de la source de Norville sur la plaine alluviale de la Seine, qui envoie un signal pour chaque millimètre de pluie détecté Les données de température de l'air ont été fournies par météo France. Les prélèvements d'eau pour les analyses microbiologiques ont été effectués par un préleveur automatique ISCO à raison d'un litre par heure pendant 24 heures (Figure 32B).

Les données disponibles sur le système karstique du Hannetot sont donc de deux natures : (i) des séries chronologiques de pluviométrie, conductivité, et turbidité mesurées à haute fréquence (15 min) à la perte et à la source. Les données de ces chroniques ont été moyennées par jour pour obtenir des données au pas de temps journalier. L'enregistrement de ces données est discontinu de 2015 à 2018 (période de l'étude) suite à des problèmes d'alimentation électrique des sondes, du vandalisme sur le matériel et des dysfonctionnements des sondes c'est pourquoi la période étudiée a été étendue de 2013 à 2017. La chronique de conductivité électrique est disponible de février 2013 à janvier 2017 avec 56% des données valides (non aberrantes) et la chronique de turbidité est disponible de février 2013 à mai 2014 avec 66% des données valides (ii) des données microbiologiques ponctuelles sur les eaux de la perte et de la source, des séries chronologiques annexes sont également disponibles comme la hauteur de nappe enregistrée par le piézomètre de Fourmetot.



Présentation du site d'étude L'hydrosystème karstique de Norville - Caractérisation hydrologique et climatique du site d'étude de 2013 à 2017

Figure 33: Chroniques de données de (A) température moyennées par mois (\blacksquare) (°C), température moyenne mensuelle (-) (°C), pluviométrie cumulée par mois (\blacksquare)(mm) et pluviométrie cumulée moyenne mensuelle (-) (mm) les moyennes proviennent de la fiche climatique de Norville éditée par Météo France; (B) conductivité électrique moyennée par jour (\bullet) (μ S.cm) et turbidité moyennée par jour (\bullet) (NTU) enregistrées à la source du karst de Norville ; (C) hauteur de la nappe de la craie (-) (mNGF), basses eaux (-), niveau moyen (-) et hautes eaux (-), enregistrées par le piézomètre de Fourmetot, données en ligne sur http://www.ades.eaufrance.fr.

Présentation du site d'étude L'hydrosystème karstique de Norville - Chroniques hydrologiques et climatiques de données acquises pendant la durée de l'étude

6. Chroniques hydrologiques et climatiques de données acquises pendant la durée de l'étude

Le climat de Norville est océanique, donc chaud et tempéré (10,5°C en moyenne). La moyenne des précipitations annuelles atteint 684 mm. Les précipitations varient de 30 mm entre le plus sec et le plus humide des mois. Une variation de 13.8 °C est enregistrée sur l'année. Au mois de juillet, la température moyenne est de 17.6 °C. Juillet est de ce fait le mois le plus chaud de l'année. La température moyenne de 3.8 °C fait du mois de janvier le plus froid de l'année. (Climate-data.org) (Figure 33).

Le cumul pluviométrique enregistré entre février et août 2013 (début de l'année hydrologique) est inférieur aux normales. Un déficit total de 132 mm est cumulé sur ces sept mois. Les températures du printemps sont sous les normales de saison et celles de l'été correspondent aux normales. Les mesures de conductivité électrique et la turbidité enregistrées à la source sont constantes, 547 μ S/cm et 30 NTU en moyenne, excepté pour le mois de mai, légèrement excédentaire en terme de pluviométrie (+17% par rapport aux normales) marqué par une chute de conductivité électrique avec un minima à 521 μ S/cm et une moyenne de turbidité de 42 NTU sur le mois. Le niveau de la nappe est en très légère augmentation passant de 46,7 mNGF (nivellement général de la France) à 46,9 mNGF entre février et août ce qui reste en dessous du niveau moyen.

Au cours de l'année hydrologique (septembre 2013 - août 2014) la pluviométrie cumulée est supérieure aux normales mensuelles excepté pour les mois de mars et juin 2014. Les mois de novembre 2013 et août 2014 ont été largement excédentaires de respectivement +129 et +141%. La température en hiver est au-dessus des normales de saison, surtout de décembre à février avec 2°C de plus en moyenne que les normales. La pluviométrie importante du mois de septembre au mois de février a provoqué de nombreuses chutes de conductivité et pics de turbidité, dont les moyennes sont respectivement de 500μ S/cm et 66 NTU, différente des moyennes des mois précédents. Le niveau de la nappe de la craie a augmenté constamment entre février 2013 et juillet 2014 avec une côte piézométrique passant de 46,6 à un plateau de 47,4 mNGF, le niveau moyen de la nappe. L'augmentation a été stoppée net en juillet 2014 avec une chute de 0,2 mNGF durant l'été et un retour au plateau en septembre 2014.

Sur l'année hydrologique allant de septembre 2014 à septembre 2015, le cumul de précipitations reste largement déficitaire. Huit mois sur douze sont déficitaires. Après un automne sec, la reprise des évènements pluvieux en décembre et janvier provoque une chute de conductivité. Il s'agit de la huitième année la plus sèche enregistrée à Rouen depuis 1968. Les températures suivent les normales tout au long de l'année. Le niveau de la nappe est resté dans la moyenne sur un plateau de 47,4 mNGF.

Sur l'année hydrologique allant de septembre 2015 à août 2016, la pluviométrie cumulée enregistrée est très proche des normales sur la quasi-totalité de la Normandie. Cette année hydrologique a été marquée par un automne et début d'hiver relativement secs.

Présentation du site d'étude L'hydrosystème karstique de Norville - Chroniques hydrologiques et climatiques de données acquises pendant la durée de l'étude



Figure 34: Les campagnes de prélevement d'eau à la perte (*) et à la source (*) et de biofilms (\diamond), prélevés sur 3 supports différents, ont été réalisées pour des conditions de pluviométrie (–) variées en toute saison de 2015 à 2017.



Figure 35: En cas de variations de la turbidité (\bullet) et la conductivité électrique (\bullet) au cours du prélevement (A), les échantillons choisis (\bigcirc) correspondent au pic de trubidité et à la chute de conductivité à la perte et à la source afin de réaliser un suivi de masse d'eau; en cas de stabilité des paramètres hydrologiques suivis au cours de la période de prélevement (B), 3 échantillons sont moyennés

Présentation du site d'étude L'hydrosystème karstique de Norville - Campagnes de prélèvements réalisées au cours de cette étude

En effet, les pluies hivernales n'ont commencé que lors de la deuxième quinzaine de janvier provoquant une importante chute de conductivité passant de 539μ S/cm en début d'hiver à 453μ S/cm en moyenne en janvier et février. Les températures hivernales ont été nettement audessus des normales de saison, avec +6,7°C en janvier 2016. Toutefois, les précipitations relativement abondantes jusqu'en juin ont permis un retour à des valeurs proches des moyennes et d'éviter un étiage qui s'annonçait relativement sévère. La température du printemps et de l'été est dans la moyenne. Le niveau s'est maintenu au plateau de 47,4 mNGF jusqu'en mai 2016, moment à partir duquel le niveau a baissé de façon constante et est passé sous les normales.

La pluviométrie cumulée depuis le début de l'année hydrologique allant de septembre 2016 à aout 2017, est dans les normes. L'automne et le printemps ont été très pluvieux, avec notamment un excèdent de pluie de +118% par rapport aux normales en novembre 2016, contrebalancés par un début d'hiver et un été secs. La conductivité électrique a chuté suite aux fortes précipitations de novembre atteignant les 513 μ S/cm puis est passée au dessus des normales, 560 μ S/cm en janvier suite au déficit de pluie. L'hiver a été plus froid que les dernières années même si les températures sont toujours légèrement au-dessus des normales de saison. Depuis 1959, cette année hydrologique 2016-2017 se situe au 4^e rang des années les plus sèches sur la Normandie, d'après Météo-France. Le niveau de la nappe a continué de diminuer passant de 47,2 à 46,8 mNGF sur l'année.

De septembre 2017 à décembre 2017, la pluviométrie a été relativement abondante sur la région. Le mois de décembre est $2,7^{\circ}$ C plus chaud que les normales ce qui reste dans la tendance des hivers précédents. En terme de rapports aux normales, le bilan pluviométrique est positif avec une moyenne de +22%. Le niveau de la nappe est toujours en légère diminution passant de 46,8 à 46,7 mNGF sur ces quatre mois.

7. Campagnes de prélèvements réalisées au cours de cette étude

Un total de 18 campagnes de prélèvement d'eau de surface (à la perte), d'eau de la source karstique et de biofilms formés à la source ont été réalisées entre mars 2015 et décembre 2017 (Figure 34). Les prélèvements d'eau ont été réalisés avec des échantillonneurs automatiques (YSI 6820 ISCO), lancés à 24 h d'intervalle à la perte et à la source, programmés pour prélever 1L d'eau par heure sur 24h sur chaque site de prélèvement. Les échantillonneurs ont réalisé les prélèvements avec un décalage de 24 h entre la perte et la source. Les paramètres hydrologiques de turbidité, conductivité et pluviométrie étaient suivis en continu pendant toute la durée du prélèvement. Lorsque la turbidité et la conductivité n'ont pas évolué pendant la durée du prélèvement, les échantillons ont été moyennés sur 3h. Au contraire, si ces paramètres ont évolué au cours du prélèvement, les échantillons d'eau analysés sont ceux prélevés aux heures correspondant aux pics de turbidité et chutes de conductivité à la perte et à la source, afin de réaliser un suivi de masse d'eau (Figure 35). Entre 1 et 3 L d'eau étaient analysées par point d'intérêt.

Présentation du site d'étude L'hydrosystème karstique de Norville -



Figure 36 : Prototype de support à biofilms composé de cylindres de craie (rayon : 0,5 cm ; hauteur : 2 cm ; aire : 7,85 cm² ; volume : 1,57 cm³) taillés dans (A) un bloc de craie de Norville, fixés sur (B) le support à biofilm maintenant les cylindres de craie immergés à la source du karst de Norville : (C) les cylindres de craie après une exposition d'1 an en haut et 6 mois en bas.

Afin de pouvoir prélever des biofilms *in situ* un support à biofilm a été mis au point pour y être immergé (Figure 36). Il est composé d'une armature en inox sur laquelle sont fixés jusqu'à 50 cylindres de craie à l'aide de fils de nylon. Les cylindres (rayon 0,5 cm ; hauteur 2 cm ; aire 7,85 cm² ; volume 1,57 cm3) ont été obtenus en perforant, avec un emporte-pièce, le centre d'un bloc de craie prélevé sur un affleurement de craie surplombant la source du karst de Norville. Le support est immergé dans l'eau de la source du karst de Norville, au-dessus de la résurgence dans un bâtiment fermé. Des fils de nylon maintiennent fixés au support 50 cylindres de craie accrochés par 3. Entre le 17/02/2015 et le 12/12/2017, 3 supports à biofilm ont été immergés dans l'eau de la source, 85 cylindres ont été prélevés sur 16 campagnes.

Afin d'étudier la formation de biofilms dans le karst, des conditions karstiques ont été partiellement reproduites dans un réacteur de laboratoire, un chemostat. Ce chemostat est alimenté d'un milieu composé d'eau prélevée à la source du karst de Norville en période d'étiage puis stérilisée et enrichie en nutriments. Des pastilles de craie (0,942 cm2; 0,23 cm3) taillées dans des blocs de craie prélevés à proximité de Norville ont été immergées dans le réacteur.
Présentation du site d'étude L'hydrosystème karstique de Norville -

Partie 2 : Proposition d'un indicateur de conditions hydrologiques propices à la contamination des eaux d'un hydrosystème karstique par *Escherichia coli*



Figure 37: Lors d'évènements pluvieux une partie de la hauteur d'eau de pluie retourne dans l'atmosphère par le phénomène d'évapotranspiration dépendant du couvert végétal et de la température. La différence entre la hauteur d'eau de pluie et l'évapotranspiration est disponible pour saturer progressivement le sol par infiltration lente, jusqu'à un seuil dépendant de ses propriétés hydrauliques, au-delà duquel une partie de la hauteur d'eau de pluie ruisselle à la surface. Modifié d'après Smart et Friederich, 1986.



Figure 38: Les concentrations maximales en *E. coli* de l'hydrosystème karstique de Norville ont été enregistrées lors d'évènements pluvieux suivant une période sèche. Lors des évènements pluvieux au cours de périodes humide, les pics de turbidité peuvent être décolérés de la concentration en *E. coli* (Laroche *et al.*, 2010). Concentrations en *E. coli* des eaux (\blacksquare) du Bébec, (\blacksquare) de la perte, (\square) de la source, (\square) du forage en UFC/100mL et (Δ) la turbidité en NTU (modifié d'après Laroche *et al.*, 2010).

1. Contexte scientifique

Dans les systèmes karstiques binaires, comme le site de Norville, tout ou partie de l'impluvium est constitué de terrains non karstifiables permettant l'engouffrement de l'eau de surface en un point, perte ou bétoire (Figure 37). Ce site est caractérisé par le transfert rapide de l'eau au travers d'un conduit principal entre la perte et la source. La rapidité du transfert intra-karstique facilite le transport de particules au travers de l'hydrosystème (Goeppert et Goldscheider, 2011) et diminue l'efficacité des processus d'atténuations (Bakalowicz, 2005; Ford et Williams, 2013) menant à une hétérogénéité temporelle élevée de la qualité des eaux de sources, en particulier après des évènements pluvieux.

La qualité microbiologique de l'eau peut être suivie par mesure directe de la concentration en E. coli, indicateur de qualité des eaux recommandé par l'OMS. Cependant la concentration en E. coli de l'eau ne peut, aujourd'hui, être suivie en continu et les résultats sont obtenus entre 24 et 48 h après le prélèvement, ne permettant pas d'ajustements opérationnels avant la distribution de l'eau. La qualité de l'eau peut varier rapidement à la suite d'évènements pluvieux, il est donc nécessaire d'utiliser des indicateurs mesurables en continu. La turbidité, mesurant la concentration en particules en suspension dans l'eau peut être suivi en continu, c'est l'indicateur indirect de contamination microbiologique le plus utilisé par les gestionnaires de ressource en eau. Une augmentation de la turbidité dans des sources d'origine karstique suggère un évènement de ruissellement en surface ayant transporté des particules dans l'hydrosystème, vecteurs potentiels de contamination. Beaudeau (Beaudeau et al., 1999, 2014) a montré une augmentation de la consommation de médicaments anti-diarrhéiques et d'hospitalisations pour cause de gastro entérites lors de pics de turbidité des ressources karstiques, utilisées comme ressource en eau potable. Cependant la relation entre turbidité et concentration en E. coli des eaux n'est pas toujours linéaire (Schiperski, 2017) comme montré sur l'hydrosystème karstique de Norville (Laroche et al., 2010; Ratajczak et al., 2010) (Figure 38). La pertinence de l'utilisation de la turbidité comme indicateur pertinent de contamination des eaux de source karstique varie d'une source à l'autre (Schiperski, 2018). En effet la turbidité de l'eau de source karstique peut avoir deux origines, difficilement différenciables en continu in situ : soit une origine autochtone, soit une origine allochtone, due à l'introduction des produits de l'érosion de surface, à laquelle est associée la contamination par E. coli (Pronk et al., 2007; Massei et al., 2003 ; Fournier et al., 2007 ; Dussart-Baptista et al., 2003). Un pic de turbidité d'origine autochtone n'est généralement pas lié à l'entrée de contaminant dans l'hydrosystème. De plus les E. coli relarguées des matières fécales par une lame d'eau sont majoritairement libres ou adhérées à de petites particules (92%) (Muirhead et al., 2005 et 2006) suggérant une possible contamination de l'eau par E. coli sans augmentation significative de la turbidité. Les évènements de contamination des eaux de sources karstiques peuvent être anticipés par la modélisation des flux de contaminants notamment de E. coli. La modélisation hydrologique des flux d'eau prend en compte l'emplacement et de débit des cours d'eau et le phénomène de ruissellement. Cette approche demande des analyses complexes des sites étudiés et de grandes bases de données de paramètres hydrologiques et climatiques nécessitant l'équipement des sites de stations de mesures sur plusieurs années ce qui n'est pas toujours réalisable techniquement.

L'objectif de cette partie est de proposer un indicateur simple et facile d'utilisation, mesurable en continu demandant comme paramètres d'entrée la pluviométrie et la température pour déterminer les périodes de vulnérabilité à la contamination en *E. coli* des eaux de surface et de source karstique.



Figure 39: Organigramme de construction et de validation de l'indicateur de contamination de l'eau par *E. coli* de l'hydrosystème karstique de Norville.

2. Démarche méthodologique

La construction de cet indicateur a été réalisée en 3 étapes, (i) une étape de construction et de validation des bases de données hydrologiques, microbiologiques et d'usage du bassin versant sur le site d'étude de Norville, (ii) une étape d'élaboration de l'indicateur, et (iii) une étape de validation par comparaison avec les données microbiologiques et hydrologiques (Figure 39).

2.1. Construction et validation des bases de données

2.1.1. Base de données hydrologiques

Une base de données contenant les données validées et nettoyées (pour supprimer les données liées à des dysfonctionnement des sondes) de conductivité électrique, turbidité, pluviométrie et de température pour les années 20013 à 2017 a été construite au pas de temps journalier à partir des données hautes fréquences enregistrées par les sondes du laboratoire sur le site d'étude de Norville avec un pas de temps d'1/4 d'heure (figure 32 ; Matériel et méthode section 1) ou à partir de bases de données existantes (Météo France, météociel).

Les données de conductivité électrique et de turbidité ont été enregistrées à la source avec un pas de temps d'1/4 d'heure puis moyennées par jour. Les chroniques de données recouvrant la période étudiée (2015-2017) n'ont pas pu être enregistrées dans leur totalité sur le site d'étude suite à des dysfonctionnements des appareils de mesures causés en partie par des problèmes d'alimentation éléctrique et des actes de vandalisme. Pour étudier un échantillon représentatif de données, les chroniques de turbidité et conductivité électrique enregistrées de maniére discontinue à la source du karst de Norville entre février 2013 et février 2017 ont été utilisées. Les chroniques de conductivité électrique et turbidité recouvrent respectivement la période de février 2013 à février 2017 avec un total de 804 données validées (soit 56%) ; et de février 2013 à août 2014 avec un total de 352 données validées (soit 66%) (figure 32B).

Les données de pluviométrie ont été enregistrées par le pluviomètre installé par le laboratoire à 2 kilomètres de la source de Norville sous la forme d'un enregistrement tous les 0,5 mm de hauteur de pluie, puis cumulées par jour, entre juin 2016 et décembre 2017 avec un total de 425 données valides (soit 100% des données enregistrées). Les données de température moyenne journalière ont été acquises d'après la base de donnée en ligne météociel à la station de Le Havre-Octeville.

2.1.2. Base de données microbiologiques

Les prélèvements d'eau ont été réalisés à la perte et la source de l'hydrosystème karstique de Norville selon la méthodologie détaillée dans la partie précédente (partie 1, section 7.) (*Figure 34*). Le dénombrement de *E. coli* dans l'eau de la perte et de la source du karst de Norville a été réalisé selon la norme ISO AFNOR, ISO-9308-1 sur milieu chromogène sélectif Rapid'*E. coli* (Matériel et méthode section 4.2.) pour 15 campagnes de prélèvement réalisées dans le cadre de la présente étude et 5 campagnes réalisées dans le cadre des travaux de thèse de M. Ratajczak et E. Laroche. La concentration en *E. coli* par filtre devait être comprise entre 1 et 50 UFC pour pouvoir dénombrer et isoler les colonies. Pour les campagnes de prélèvement du 28/04/2017 et 19/07/2017 les seuils de détection ont été dépassés, ne permettant pas le dénombrement. Les volumes d'eau filtrés ont été choisis pour obtenir plus de 50 isolats d'*E. coli* par point de prélèvement pour chaque campagne d'échantillonnage tout en restant sur un nombre de souche dénombrable par boite (compris entre 15 et 150 UFC).

Tableau 7: Les campagnes de prélevement réalisées de février 2007 à décembre 2017 ont permis de constituer une collection de 1079 souches de *E. coli*. Les campagnes de prélevement surlignées en bleu ont été réalisées antérieurement à ces travaux par M. Ratajczak et E. Laroche

date de la	Point de prélévement			
campagne	perte	source		
21/02/2007	43	0		
03/05/2007	41	43		
11/07/2007	37	0		
01/03/2008	85	0		
16-17/02/2012	211	74		
25/03/2015	0	0		
21/04/2015	0	0		
28/04/2015	0	6		
20/05/2015	0	0		
07/07/2015	0	5		
07/01/2016	0	42		
17/02/2016	0	0		
06/09/2016	0	0		
15/09/2016	58	7		
11/01/2017	49	17		
17/01/2017	19	37		
28/04/2017	33	159		
17-19/07/2017	0	0		
04/12/2017	32	39		
12/12/2017	34	8		

Un total de 642 souches isolées de l'eau de la perte et 437 isolées de l'eau de la source, dont 534 souches isolées dans le cadre de travaux antérieurs à 2012 (Laroche et Ratajczak) soit un total de 1079 souches (Tableau 7). Pour analyser la diversité des populations de *E. coli* prélevées dans l'eau du karst, la structure des populations a été déterminée par identification du phylogroupe de chaque isolat de *E. coli* par la méthode Clermont (Clermont *et al.*, 2013). Cette méthode permet la classification de *E. coli* en 7 phylogroupes (A, B1, B2, C, D, E, F), auxquels s'ajoutent le groupe cryptique *E. Clades* et *E. albertii*, identifiés sur la base de la détection simultanée de 4 gènes.

2.1.3. Données sur l'usage du bassin versant

L'usage du bassin versant, notamment le nombre de bovins en pâturage a été determiné pour la période de prélèvement (données DRAAF Normandie/SRISE). Les périodes de pâturage du bassin versant étant intermittentes, elles ont été déterminées par observation du bassin versant. En complément, l'analyse de la diversité des populations de *E. coli* permet de déterminer les sources de contaminations en *E. coli* présentes sur le bassin versant selon la méthodologie developpée au laboratoire (Synthèse bibliographique section 3.4., Diversité des populations de *E. coli*).

2.2. Elaboration de l'indicateur de conditions hydrologiques propices à la contamination de l'eau par *E. coli* (IndiCE)

L'élaboration de l'IndiCE est réalisée en 3 étapes (i) le calcul d'un indicateur de forçage pluviométrique, (ii) le calcul d'un indicateur de pluies antérieures et (iii) le calcul de IndiCE qui est le produit des deux indicateurs précédents, le tout au pas de temps journalier.

2.3. Validation de IndiCE

Les différents paramètres d'entrée permettant le calcul de l'indicateur ont été calibrés pour le site d'étude de Norville par comparaison avec les concentrations de *E. coli* mesurées dans l'eau de la perte. L'étape de validation repose sur l'étude de la relation entre l'indicateur et (i) la turbidité et la conductivité électrique à la source de l'hydrosystème et (ii) la concentration et la structure des populations des *E. coli* cultivable des eaux de l'hydrosystème karstique acquises *in situ* pour des conditions semblables d'usage du bassin versant.

Une analyse statistique des résultats avec les tests de Wilcoxon pour les comparaisons de concentration en *E. coli*, et les tests du χ^2 d'homogénéité, de Fisher et de comparaisons de proportions pour les analyses de structures de population, ont été réalisées avec le logiciel R.



Figure 40: Comparaison des structures des populations de *E. coli* dans l'eau de la perte du karst de Norville pour les campagnes de prélèvements antérieures et postérieures à l'application des arrêtés du 7 mars 2012 et 27 avril 2012 relatifs à la mise aux normes des fosses septiques. (\blacksquare) pour le phylogroupe A,(\blacksquare) pour le phylogroupe B1,(\blacksquare) pour le phylogroupe B2,(\blacksquare) pour le phylogroupe C,(\blacksquare) pour le phylogroupe C,(\blacksquare) pour le phylogroupe E, (\blacksquare) pour le phylogroupe F,(\blacksquare) pour les *Escherichia* Clades et (\blacksquare) pour les *E. albertii*.

3. Résultats

3.1. Validation de la base de données microbiologique

La contamination de l'hydrosystème karstique dépendant de l'usage du bassin versant, les résultats microbiologiques des campagnes de prélèvements ne peuvent être comparées que pour un usage semblable du bassin versant. Il a été montré par l'étude de la diversité des populations de E. coli et de leur profil d'antibiorésistance que les sources de contamination d'origine fécale majoritaires du Bébec sont le pâturage de bovins et la présence de fosses septiques défectueuses sur le bassin versant (Ratajczak et al., 2010 ; Laroche et al., 2010). L'étude de la diversité des population d'E. coli nous a permis de vérifier l'impact des arrêtés du 7 mars 2012 et du 27 avril 2012 imposant la réhabilitation des installations d'assainissements non collectifs présentant un risque avéré de pollution pour l'environnement. La structure des populations de E. coli a été comparée par la méthode Clermont (Clermont et al., 2013) à la perte pour (i) 417 souches de E. coli prélevées entre le 21/02/2007 et le 17/02/2012, antérieurement à la mise en application des arrêtés et (ii) 157 souches de E. coli prélevées entre le 25/03/2015 et le 12/12/2017, postérieurement à la mise en application des arrêtés ; soit un total de 574 souches de E. coli sans discrimination du forçage climatique lors des prélevement. La Figure 40 montre qu'il existe une différence significative (valeur p = $5,7.10^{-16}$) de la structure des populations de *E*. coli contaminant les eaux de l'hydrosystème de Norville avant et après la mise en application des arrêtés du 7 mars 2012 et du 27 avril 2012, en juillet 2012, pour les phylogroupes A (valeur $p < 2,2.10^{-16}$), B1 (valeur $p = 2.10^{-4}$), B2 (valeur $p = 2.10^{-4}$), et F (valeur $p = 6.10^{-3}$) (figure 40).

Le rapport du nombre de souche appartenant au phylogroupe A sur le nombre de souche appartenant au phylogroupe B1 (A/B1) permet de determiner la principale source de contamination de l'hydrosystème de Norville (Synthèse bibliographique section 3.4., Diversité des populations de *E. coli*). Pour A/B1 proche de 1, la contamination microbiologique d'origine fécale de l'eau est majoritairement d'origine humaine. Au contraire pour A/B1 inférieur à 1, la contamination est majoritairement d'origine bovine. Pour les prélèvements précédant la mise en application des arrêtés relatifs à la mise au norme des fosses septiques, A/B1 est de 1,2 montrant une contamination majoritairement d'origine humaine. Pour les prélèvements d'après 2012, A/B1 est de 0,05 signature d'une contamination majoritairement d'origine bovine. De plus le phylogroupe A ne représente plus que 2,6% de la population totale de *E. coli* après 2012 soit une diminution de 38% montrant une réduction significative de l'apport en bactéries fécales d'origine humaine. La contamination fécale d'origine humaine du site de Norville provenant de fosses septiques defectueuses a été significativement réduite depuis 2012.

Ces résultats montrent que les arrêtés du 7 mars 2012 et du 27 avril 2012 relatifs à la mise aux normes des fosses septiques ont été appliqués en juillet 2012 sur le bassin versant du karst de Norville diminuant la proportion des bactéries fécales d'origines humaines dans l'hydrosystème. Ainsi, les résultats microbiologiques des campagnes de prélèvement antérieur et postérieurs à juillet 2012 ne sont pas comparables. Dans la suite de ce travail, seuls les résultats des campagnes de prélèvements postérieurs à juillet 2012 ont été étudiés, les résultats des campagnes antérieures à 2010 représentant un échantillon trop petit pour une analyse statistique.



Figure 41: Diagramme de construction de IndiCE.

3.2. Élaboration de IndiCE

L'indicateur de conditions hydrologiques propices à la contamination de l'eau par *E. coli* (IndiCE) a été élaboré en se basant sur l'hypothèse que la contamination entrant dans un hydrosystème karstique résulte du relargage de bactéries en surface du sol, provoqué par la formation d'une lame d'eau dépendant de la pluviométrie du jour et des pluies antérieures. La démarche de construction de l'indicateur a été réalisée en 3 étapes (i) le calcul de l'indicateur de forçage pluviométrique Ifp correspondant à la quantité de pluie du jour interagissant avec le sol, (ii) le calcul de l'indicateur de pluviométrie antérieures API correspondant aux pluies des jours précédents ayant interagit avec le sol et (iii) le calcul du produit Ifp et API donnant IndiCE, l'indicateur de contamination des eaux par *E. coli* (Figure 41).

IndiCE permet de définir les conditions hydrologiques menant au relargage des bactéries présentes en surface du sol. Associé à une étude des sources de contaminations sur le bassin versant il permet de caractériser le risque d'entrée de *E. coli* dans l'hydrosystème karstique. La morphologie du karst détermine le transfert de la contamination dans l'hydrosystème et sa concentration à la source du karst. Dans un hydrosystème karstique binaire comme celui de Norville, la contamination de l'eau de la source karstique dépend directement de la contamination entrant dans l'hydrosystème.

3.2.1. Indicateur de forçage pluviométrique

Pour déterminer les conditions hydrologiques menant à la formation d'une lame d'eau il est nécessaire, dans un premier temps, de déterminer un indicateur de forçage pluviométrique (Ifp). Ifp correspond à la quantité de pluie interagissant avec le sol par jour, definie simplement par la différence entre la hauteur de pluie et la quantité d'eau retournant à l'atmosphère (l'évapotranspiration) selon la formule suivante :

 $If p_D = H p_D - ET_D \qquad (Équation 1)$

où D: date pour laquelle est calculée Ifp_D, Ifp_D : indicateur de forçage pluviométrique (mm)

 Hp_D : Hauteur de pluie cumulée du jour D (mm) et ET_D : Evapotranspiration du jour D (mm).

Les valeurs d'Ifp négatives ont été ramenées à 0.

Pour calculer cet indicateur il est nécessaire d'avoir les données d'évapotranspiration journalière qui permettent de prendre en compte les variabilités saisonnières spécifiques d'un site d'étude ; en effet l'évapotranspiration dépend de la température et des radiations solaire du jour. Il existe plusieurs modèles pour calculer l'évapotranspiration sur un bassin versant.

Choix du modèle pour le calcul de l'évapotranspiration

L'évapotranspiration réelle (ETR) représente l'eau réellement perdue par celle-ci sous forme de vapeur, l'évapotranspiration potentielle (ETP), l'eau susceptible d'être perdue dans les mêmes conditions quand elle n'est plus facteur limitant. Quand l'eau n'est pas facteur limitant, ETR devient par définition égal à ETP. En modélisation pluie-débit, l'ETP est souvent utilisée car, contrairement à l'ETR, son estimation ne nécessite que la connaissance de paramètres liés à l'atmosphère. Ces paramètres sont plus homogènes à l'échelle du bassin et plus facilement mesurables que des paramètres tels que la nature du sol et l'état hydrique du sol, dont la connaissance est nécessaire pour estimer l'ETR (Oudin, 2004).



Figure 42: Les modèles d'Oudin (2014) et Penman Monteith (1965) donnent des résultats semblables pour le calcul de l'évapotranspiration potentielle (ETP) sur une année, cumul mensuel. (
) ETP calculée d'après le modèle d'Oudin ; (
) ETP calculée d'après le modèle de Penman Monteith.



Figure 43: L'évapotranspiration potentielle (PE) calculée d'après le modèle d'Oudin suit les variations de températures liées aux saisons. Chronique de température et de PE Oudin de 2013 à 2017, pas de temps journalier. (
) PE Oudin (mm), et (
) température (°C).

Pour choisir le modèle de calcul de l'ETP le plus adapté à cette étude, deux modéles ont été comparés (i) le modèle de Penman Monteith (Monteith, 1965) utilisé par Météo France et (ii) le modèle d'Oudin (Oudin, 2004). Les travaux de Penman (1948) ont permis d'établir une formule de l'ETP combinant les principes physiques du bilan d'énergie et des ajustements empiriques issus de formules aérodynamiques. Le modèle de calcul de l'évapotranspiration potentielle de Penman Monteith se base sur la taille et la distribution des stomates, la vitesse du vent et les propriétés aérodynamiques de la surface de la plante (Monteith, 1965). Il requiert des données de température, humidité relative, vitesse du vent et radiations solaires. Un suivi météorologique précis et complet du site d'étude est nécessaire pour obtenir ces paramètres.

L'utilisation de valeurs estimées pour remplacer les données manquantes peut être à l'origine d'une erreur de l'estimation supérieure à 30% (Cordova *et al.*, 2015). La paramétrisation du modèle par le choix des formules d'aérodynamiques, de résistance de surface et du couvert végétal du site étudié peut avoir un impact significatif sur l'exactitude de l'estimation de l'évapotranspiration (Ershadi *et al.*, 2015). Le modèle d'Oudin utilise comme données d'entrées la température, le jour étudié et la latitude. Ces données permettent le calcul du rayonnement solaire par la méthode de Morton (1983). Ce modèle permet d'obtenir de meilleurs estimations que 27 autres formulations d'évapotranspiration potentielle (dont le modèle de Penman Monteith) pour l'étude de ruissellement sur un bassin versant pour des applications de modélisation pluie-débit (Oudin *et al.*, 2005).

Pour valider le choix du modèle de calcul de l'ETP sur le site de Norville, les données de potentiel d'évapotranspiration calculées d'après le modèle d'Oudin ont été comparées aux données fournies par météo France calculées selon le modèle de Penman Monteith (Monteith, 1965) (Figure 42). L'ETP d'Oudin a été calculée selon la méthodologie developpée dans sa thèse à l'aide du tableur excel disponible à cette adresse <u>https://webgr.irstea.fr/modeles/modele-devapotranspiration/</u>. Il y a une différence de 1,3 mm par jour en moyenne entre les valeurs calculées avec les 2 modèles pour le site d'étude de Norville entre juin 2016 et juin 2017. Le modèle d'Oudin ne demande l'entrée que de 2 paramètres facilement accessibles, la température journalière et la latitude, contrairement au modèle de Penman-Monteith qui demande l'entrée de 4 paramètres demandant l'équipement du site d'étude d'une station de mesure ; de plus la différence entre l'ETP calculée selon ces 2 modèles est négligeable, le modèle d'Oudin est validé pour l'utilisation sur ce site d'étude.

La Figure 43 montre que sur le site de Norville l'ETP calculée selon le modèle d'Oudin suit les variations saisonnières. Les valeurs minimales, en moyenne $(3,9\pm0,8).10^{-1}$ mm, sont atteintes pour les mois les plus froids, décembre et janvier, suivies d'une augmentation jusqu'aux mois les plus chauds juin et juillet, en moyenne $(3,5\pm0,4).10^{0}$ mm.



Figure 44 : L'évapotranspiration potentielle (mm) calculée selon la méthode d'Oudin est proportionelle à la température (°C)



Figure 45 : Ifp (|) (différence entre la pluviométrie et l'ETP) montre une meilleure corrélation qu'Ifp* (|) (différence entre la pluviométrie et la température) avec la pluviomètrie pour les deux classes de températures étudiées, respectivement (A) entre 5 et 10° et entre 15°C et 20°C



Figure 46: Variations de l'évapotranspiration potentielle (ETP), la pluviométrie et l'indicateur de forçage pluviométrique (Ifp) sur l'année 2017. (-) ETP en mm, (-) pluviométrie en mm et (-) Ifp au pas de temps journalier.

Pour vérifier s'il est possible de simplifier le calcul d'Ifp en évitant l'utilisation de l'évapotranspiration potentielle, potentiellement source d'incertitude, un Ifp* a été calculé selon la formule suivante

If $p *_D = Hp_D - T_D$ (Équation 2)

où D: date pour laquelle est calculée Ifp_D, $If p_D$: indicateur de forçage pluviométrique (mm)

 Hp_D : Hauteur de pluie cumulée du jour D (mm) et T_D : Tempérautre du jour D (°C).

Pour comparer Ifp et Ifp* en fonction de l'ETP et de la pluviométrie pour des gammes de températures représentatives, deux classes de température pour lesquelles l'ETP est significativement différente ont été determinées. La Figure 44 montre une différence significative de l'ETP pour des températures comprises entre 5 et 10°C ($0,9\pm0,6$ mm) et pour des températures comprises entre 5 et 10°C ($0,9\pm0,6$ mm) et pour des températures comprises entre 5 et 10°C ($0,9\pm0,6$ mm) et pour des températures comprises entre 15 et 20 °C ($3,2\pm0,7$ mm). Les deux Ifp ont été tracés en fonction de la hauteur de pluie (Hp_D) pour chacune des gammes de température definit précedemment (Figure 45). Les coefficients de determination (\mathbb{R}^2) de chaque série a été calculé, ceux correspondant à Ifp étant plus proche de 1 que ceux d'Ifp* pour les deux gammes de températures entre 5 et 10°C et 15 et 20°C qui sont les plus représentées en sur le site étudié.

La simplification du calcul d'Ifp par le remplacement de la température à la place de l'ETP ne donne pas de résultats concluant.

Calcul de l'indicateur de forçage pluviométrique

L'ETP calculée selon le modèle d'Oudin permet le calcul d'Ifp selon la formule de l'équation 1. La figure 40 montre les variations de l'ETP calculée d'après le modèle d'Oudin et la différence entre la hauteur de pluie et l'indicateur de forçage pluviométrique (Ifp). Alors que la hauteur de pluie cumulée par jour moyenne est de 2,5 (\pm 0.3) mm, Ifp moyen par jour est de 1,6 (\pm 0.3) mm car il prend en compte l'ETP (Figure 46). Pour les périodes ou l'ETP est maximale, les mois les plus chauds (juillet at août), la différence entre Ifp et la hauteur de pluie est maximale.



Figure 47: Chronique de pluviométrie turbidité et conductivité électrique à la source du karst de Norville (•)conductivité électrique moyennée par jour en μ S/cm, (•) turbidité moyennée par jour (NTU) enregistrées à la source du karst de Norville, (•) pluviométrie cumulée par jour en mm et (•) évènements pluvieux de 10 mm.

Tableau 8: Réponse hydrologique à la source après un évènement pluvieux de 10 mm.

	29/07/2013	08/11/2013	19/12/2013
Pluviométrie (mm)	10	10	9
Différentiel de conductivité à la source (µS/cm)	38	182	20
Différentiel de turbidité (NTU)	-45	-227	-10

Tableau 9 : Parmis les 9 IndiCE testés dont les paramètres k et X_{D-i} différent, les IndiCE A et D présentent les meilleurs coefficients de corrélation avec la concentration en *E. coli* de l'eau de la perte

	IndiCE A	IndiCE B	IndiCE C	IndiCE D	IndiCE E	IndiCE F	IndiCE G	IndiCE H	IndiCE I
k	5	5	5	15	15	15	30	30	30
X _{D-i}	fonction exponentielle décroissante	fonction linéaire décroissante	1	fonction exponentielle décroissante	fonction linéaire décroissante	1	fonction exponentielle décroissante	fonction linéaire décroissante	1
R² (courbe de tendance linéaire)	0,9236	0,8178	0,4663	0,9236	0,036	0,026	0,0063	0,0014	0,115
R ² (courbe de tendance exponentielle)	0,9486	0,9142	0,5653	0,9486	0,0496	0,087	0,0071	0,0009	0,1418



Figure 48 : Le test de sensibilité des 9 IndiCE présentés dans le tableau 8 montrent une corrélation exponentielle entre les IndiCE A et D et la concentration en *E. coli* de l'eau de la perte. (A) IndiCE en fonction de la concentration en *E. coli* de l'eau de la perte avec (–) IndiCE A, (–) IndiCE B, (–) IndiCE C, (–) IndiCE D, (–) IndiCE E, (–) IndiCE F, (–) IndiCE G, (–) IndiCE H, (–) IndiCE I et (B) les courbes de tendance exponentielles des 9 IndiCE.

3.2.2. Indicateur de pluviométrie antérieure

La Figure 47 montre la réponse hydrologique du système karstique aux évènements pluvieux, enregistrée par la turbidité et la conductivité électrique à la source. Pour 3 évènements pluvieux de 10mm cumulé en 24h, les variations de la turbidité et conductivité électrique par rapport à leur niveau de base – appelées ici différentiels – sont très différentes (Tableau 9).

En effet, la formation d'une lame d'eau est le résultat de l'interaction entre les précipitations et un sol saturé dans lequel l'eau ne peut plus s'infiltrer. L'état de saturation du sol d'un bassin versant peut-être évaluée par un indice de précipitations antérieures (Kohler, 1951) noté API calculé, pour chaque date D considérée, selon la formule suivante :

$$API_D = \sum_{i=1}^{k} (Hp_D - ETP) \times X_{D-i}$$
 (Équation 3)

Où D: date pour laquelle est calculé *API* (jour), Hp_D : hauteur de pluie cumulée sur 24 h pour la date D - i, X_{D-i} : facteur de pondération pour la date D - i, k: nombre de jours d'antériorité considérés.

Le facteur de pondération X_{D-i} permet de prendre en compte la « vidange » du sol, c'est-à-dire la diminution de sa saturation, au cours du temps, c'est généralement une fonction décroissante qui est utilisée.

3.2.3. Calcul de l'indicateur de conditions hydrologiques propices à la contamination de l'eau par *E. coli* (IndiCE)

Le calcul de IndiCE correspond au produit de l'indicateur de pluie antérieur API et de l'indicateur de forçage pluviométrique Ifp:

*IndiCE*_D = $API_D \times IFp_D$ (Équation 4)

3.3. Calibration de IndiCE pour le site de Norville

Pour calibrer l'IndiCE sur le bassin versant de Norville étudié ici, deux facteurs peuvent être adaptés : le nombre de jours à prendre en compte (k) et X_{D-i} le facteur de pondération de API_D , tous deux necessaires pour le calcul de API_D .

Le choix du nombre de jours pris en compte pour calculer API_D a été testé pour différentes valeurs choisies empiriquement. Pour déterminer X_{D-i} , 3 fonctions ont été testées : une fonction linéaire décroissante déterminer pour varier de 1 à 0 en k jours, une fonction exponentielle décroissante déterminée selon le même modéle et f(x) = 1.

Neufs versions de IndiCE sont présentées ici, avec k = 5, 15 et 30 pour chacune des fonction de X_{D-i} détaillées dans le Tableau 9. Les neufs IndiCE ont été comparés en fonction des concentrations de *E*.*coli* dans l'eau de la perte du site étudié pour adapter l'indicateur au site et à la problématique étudiée (Figure 48). Les IndiCE A (jaune) et D (bleu clair) présentent les meilleurs coefficients de determination (R²) de leurs courbes de tendances montrant qu'ils sont les mieux adaptés comme indicateurs de contamination par *E. coli*. Les R² des courbes de tendances linéaires (0,9236) montrant qu'IndiCE augmente de façon exponentielle par rapport à la concentration en *E. coli* de l'eau de la perte. Ces deux versions de l'indicateur sont caractérisés par X_{D-i} correspondant à une fonction exponentielle décroissante et respectivement k=5 et k=15 (Tableau 9).



Figure 49: Chronique de pluviométrie, IndiCE, Ifp et API (Indicateur de Pluies Antérieures) pour les mois de janvier et juin 2017, pas de temps journalier. (---) pluviométrie cumulée par jour en mm (---) IndiCE, (---) Ifp, et (----) API).



Figure 50 : La chronique d'IndiCE (---) et de pluviométrie (---) de 2013 à 2017 montre un comportement d'IndiCE variable en fonction des saisons et de la pluviométrie



Figure 51 : IndiCE est majoritairement distribué entre 0 et 1

Tableau 10 : Les gammes d'IndiCE de 2013 à 2017 sont semblables avec une moyenne de 3,03 excepté pour l'année 2015 exceptionnellement sèche

	2013	2014	2015	2016	2017	2013-2017
moyenne	3,17	3,08	2,29	3,42	3,21	3,03
mediane	0,48	0,92	0,57	0,66	0,38	0,59
min	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
max	33,82	37,24	31,45	44,50	39,34	44,50

Sur ce site d'étude il semblerait que la prise en compte de 5 ou 15 jours de pluie antérieures ne change pas significativement l'IndiCE, les R² sont d'ailleurs strictement identiques pour les IndiCE A et D. Pour plus de prudence il est choisi de prendre en compte 15 jours de pluie antérieure, en effet plus le nombre de jour pris en compte est important plus l' « effet mémoire » de l'indicateur sera important.

 API_D sur 15 jours peut alors être défini, en combinant les équations 1 et 3, selon la formule suivante :

$$API_{D} = \sum_{i=1}^{15} (HP_{D-i} - ETP_{D-i}) \times e^{-(D-i)}$$
 (Équation 5)

Soit,

IndiCE $_D = \left[\sum_{i=1}^{15} (HP_{D-i} - ETP_{D-i}) \times e^{-(D-i)}\right] \times (Hp_D - ETP_D)$ (Équation 6) 3.4. Chroniques d'IndiCE sur le site de Norville de 2013 à 2017

La Figure 49 montre les différences de comportement des élements API et Ifp et d'IndiCE en regard de la pluviométrie. API augmente avec un retard d'un jour suite à un évenement pluvieux et revient à 0 entre 2 et 4 jours sans évènements pluvieux. Ifp augmente en simultané des évènements pluvieux et revient immédiatement à 0 en l'absence de pluie. La combinaison d'API et Ifp permet à IndiCE d'augmenter le jour même d'un évenement pluvieux proportionnellement à la quantitié de pluie interagissant avec le sol, et de prendre en compte l'intensité dans la durée et l'ancienneté d'un évènement pluvieux. Le temps de latence avant le retour à 0 simule simplement l' « effet mémoire » du sol, c'est-à-dire sa saturation en eau. IndiCE est majoritairement distribué entre 0 et 1 (Figure 51), présente une moyenne de 3,03, et une médiane de 0,59. Sur 1789 jour, 4,8% des valeurs de IndiCE sont égale à 0; 51% comprises entre 0 et 1 ; 24% entre 1 et 5 ; 20% entre 5 et 44,5. L'année 2015 exceptionnellement sèche (Partie 1, section 6. Chroniques hydrologiques et climatiques de données acquises pendant la durée de l'étude) est caractérisé par la moyenne d'IndiCE annuelle la plus basse (2,29). Les 4 autres années étudiées présentent des moyennes d'IndiCE significativement semblables avec une moyenne de 3,22±0,14. Le minimum est logiquement de 0 et le maximum est de 44,50, atteint le 07/11/2016 suite à un évènement pluvieux de 44 mm en une journée, avec une ETP de 0,5 mm.



Figure 52: La représentation graphique de IndiCE et de la hauteur de pluie journalière sur un mois d'hiver et un mois d'été A. (–)Pluviométrie cumulée journalière et (–) IndiCE, année 2017. B. Mise en évidence du mois de janvier C. et de juin, pas de temps journalier.

La Figure 52A montre la correspondance entre la hauteur de pluie et IndiCE pour l'année 2017. Le mois de janvier 2017 (Figure 52B), correspondant à la période hivernale, est caractérisé par un début de mois humide suivi d'une période sèche de 10 jours. IndiCE est de 14,5 après l'évènement pluvieux de 14,4 mm du 12 janvier. A la fin de la période pluvieuse, le 15/01/17 IndiCE est de 11,6 ; il redescend à 0 après 5 jours secs. Pour l'évènement pluvieux intense du 29 janvier de 20 mm en 24 h, IndiCE passe de 0 à 19 en une journée.

Le mois de juin 2017 (Figure 52C), correspondant à la période estivale, est caractérisée par 2 évènements pluvieux important. Un premier évènement pluvieux entre le 5 et le 7 juin présente un cumul de pluie de 12 mm et une valeur maximale de IndiCE de 8,3 le 07/06/2017 suivi d'un retour de l'indicateur à 0 en 5 jour en l'absence de pluie. Le second évènement pluvieux les 27-28/06/2017 présente un cumul de pluie de 26,2 mm et une valeur maximale de IndiCE de 13 suivi d'une période avec une faible pluviométrie, en moyenne 1 mm de hauteur de pluie par jour négligeable car inférieure à l'évapotranspiration potentielle. IndiCE revient à 0 le 02/07 soit 4 jours après la fin de l'évènement pluvieux.

3.3. Validation de IndiCE : corrélation avec les paramètres hydrologiques

L'objectif est de valider l'indicateur IndiCE pour identifier les évènements pluvieux à l'origine de ruissellement sur le bassin impactant la qualité des eaux de l'hydrosystème. Ces évènements sont signalés par une augmentation de la turbidité provoquée par le transport de particules et une diminution de la conductivité provoquée par l'arrivée d'eaux de pluie moins minéralisées que les eaux de l'aquifère de la craie. La décorrélation entre la turbidité et la concentration en E. coli dans l'eau montrée en introduction peut être due à des évènements de contaminations provoqués par un lessivage du sol avec peu ou pas d'érosion qui ne sont donc pas signalés par une augmentation de la turbidité. Tous les évènements de contamination ne sont pas signalés par une augmentation de la turbidité, cependant un évènement pluvieux provoquant augmentation de la turbidité et diminution de la conductivité électrique, sur un sol contaminé mènera à la contamination de l'eau entrant dans l'hydrosysytème. C'est pourquoi, bien que la turbidité et la conductivité électrique ne soient pas des indicateurs indirects de contamination fiables à eux seuls, ils sont ici utilisés pour valider IndiCE même si on ne s'attend pas à une corrélation linéaire entre IndiCE et ces paramètres. Les paramètres hydrologiques sont mesurés à la source de l'hydrosystème pour cibler les évènements de surface influant sur la qualité des eaux de source.

Des tentatives de calcul de l'IndiCE prenant en compte ces paramètres ont été testées notamment le calcul du rapport de la conductivité électrique sur la turbidité, le calcul des différentiels de turbidité et conductivité électrique sans permettre, dans le cadre de ces travaux, de les utiliser directement pour le calcul d'un indicateur pertinent.



Figure 53: Chronique de (–) différentiel de turbidité et (–) différentiel de conductivité électrique mesurées à la source du karst de Norville au pas de temps journalier, année 2013.



Figure 54: Distribution d'IndiCE (•) en fonction du différentiel de turbidité.



Figure 55 : Distribution d' IndiCE (•) en fonction du différentiel de conductivité électrique .

La validation de l'indicateur est réalisée en analysant sa relation avec les différentiels de turbidité et conductivité calculés d'après les enregistrements à la source de l'année 2013 (Figure 53). Ces différentiels sont obtenus en calculant la différence entre la valeur moyenne en période sèche, soit 20 NTU pour la turbidité et 560 μ S/cm pour la conductivité électrique, et sa valeur moyenne le jour j. Soit :

$$dT_D = 20 - T_D \quad et \ dCE_D = 560 - CE_D$$

Où dT_D : différentiel de turbidité du jour D et T_D : la turbidité moyenne du jour D et dCE_D : différentiel de conductivité électrique du jour D et CE_D : la conductivité électrique moyenne du jour D.

3.3.1. Corrélation entre IndiCE et différentiel de turbidité

Afin de vérifier la corrélation entre les pics de turbidité à la source et IndiCE, la distribution des valeurs d'IndiCE lors de pics de turbidités est analysée. Les pics de turbidité correspondent à un différentiel de turbidité inférieur à -50. La Figure 54 montre qu'IndiCE est significativement supérieur (valeur p= $4,5.10^{-6}$) pour les valeurs correspondant aux pics de turbidité (<-50 NTU), avec une moyenne de 4, par comparaison avec IndiCE pour des valeurs de turbidité de -50 NTU et plus présentant une moyenne de 2. IndiCE est supérieur à 2 pour les pics de turbidité.

3.3.2. Corrélation entre IndiCE et différentiel de conductivité électrique

Afin de vérifier la corrélation entre la diminution de la conductivité électrique à la source et IndiCE, la distribution d'IndiCE pour des chutes de conductivité (différentiels de conductivité électrique > 50 μ S/cm) est étudiée. La Figure 55 montre que IndiCE est significativement supérieur pour des différentiels de conductivités supérieurs à 50 μ S/cm, avec une moyenne de 5, par comparaison avec les valeurs d'IndiCE pour un différentiel de conductivité <50 μ S/cm, présentant une moyenne de 2,7. IndiCE est supérieur à 3 pour les chutes de conductivité.

Pour conclure lorsque l'IndiCE calculé est supérieur à 3, des pics de turbidité et des chutes de conductivités sont enregistrés à la source montrant une arrivée d'eau de surface potentiellement contaminée par des bactéries.

3.3.3. Comparaison entre IndiCE et indicateur de l'AREAS

Les travaux de l'AREAS (Association Régionale pour l'Etude et l'Amélioration des Sols) (Ouvry *et al.*, 2006 ; Richet et Helloco, 2009) et de Delahaye (Delahaye, 2003), ont affiné les conditions de déclenchement des épisodes de ruissellement responsables d'évènements turbides. Celles-ci sont la combinaison d'une pluie de 70 mm durant la décade précédent l'évènement et d'une pluie génératrice de l'évènement ruisselant d'au moins 15 mm. Cet indicateur permet de déterminer l'intensité des évènements pluvieux provoquant une érosion « massive » des sols. Au cours de la période février 2013 à décembre 2017, cet indicateur est toujours égal à 0, cependant des épisodes de contamination par *E. coli* des eaux de l'hydrosystème ont été enregistrés montrant l'inadéquation de l'indicateur de l'AREAS avec la problématique posé ici bien que la méthodologie de calclul soit similaire.

Ce résultat tend à indiquer que le processus sous-jacent d'exportation d'*E. coli* à l'exutoire du bassin versant étudié n'est pas lié à l'érosion des sols sur les versants suggérant qu'IndiCE caractérise d'avantage le lessivage superficiel des sols que l'érosion.



Figure 56: Chronique de (-) IndiCE années 2015 à 2017 pas de temps journaliers et concentration en *E. coli* de l'eau (\diamond)de la perte et (\bullet) de la source.



Figure 57: () concentration en *E. coli* dans les eaux de la perte (A et B) de l'hydrosystème karstique de Norville en fonction de IndiCE pour un même usage du bassin versant.

3.3. Validation d'IndiCE comme indicateur prédictif de contamination en *E. coli* de l'eau de Norville

Pour vérifier la calibration de l'IndiCE, comme indicateur de conditions hydrologiques propice à la contamination par *E. coli* des eaux sur le site de Norville, la concentration de *E. coli* dans l'eau de la perte (surface) en fonction d'IndiCE est étudiée. Pour valider IndiCE comme un indicateur de contamination des eaux d'un hydrosystème karstique par *E. coli*, les valeurs calculées de IndiCE sont comparées à la concentration de *E. coli* dans l'eau de la source karstique de Norville. Pour aller plus loin l'origine de la contamination microbiologique en fonction d'IndiCE a été determinée par analyse de la diversité de *E. coli* dans l'eau de surface et de source de l'hydrosystème.

Les campagnes de prélèvement étudiées dans la suite de ces travaux ont été réalisées à la perte et/ou à la source pour des conditions d'usage du bassin versant semblables, après l'application des arrêtés de 2012 et en présence de pâturage sur le bassin versant.

3.3.1. Relation entre IndiCE et la concentration en E. coli de l'eau

Afin de valider l'utilisation de IndiCE comme indicateur quantitatif de la contamination d'un karst par *E. coli*, ses valeurs calculées sont comparées aux valeurs de concentration en *E. coli* mesurées pour 13 campagnes de prélèvements d'eau à la perte et/ou à la source du karst de Norville. La Figure 56 montre que les campagnes de prélèvement d'eau de la perte et de la source ont été réalisées pour des conditions hydrologiques variées. La moyenne de IndiCE pour les campagnes de prélèvement est 4,8.

Pour valider la calibration de IndiCE comme indicateur de contamination par *E. coli* de l'eau de surface, 7 campagnes de prélèvement de l'eau de la perte avec une concentration en *E. coli* allant de 20 à 620 UFC/100mL ont été étudiées. La Figure 57A montre que la concentration en *E. coli* est inférieure à 100 UFC/100mL pour les campagnes de prélèvement avec IndiCE inférieur ou égal à 1,5. La Figure 57B confirme que les campagnes de prélèvement caractérisées par un IndiCE supérieur à 1,5 présentent une concentration en *E. coli* significativement supérieure (885±30 UFC/100mL) à celles caractérisées par un IndiCE <1,5 (83,3 ± 50 UFC/100mL) (pvalue=0.049). La concentration en *E. coli* n'est pas significativement différente pour IndiCE allant de 3,8 à 15,7, ce qui suggère que l'intégralité des *E. coli* remobilisables dans les sols sont lessivées pour un IndiCE compris entre 1,5 et 3,8. Ces résultats montrent une valeur seuil de IndiCE prédictive du niveau de contamination de l'eau de surface par *E. coli*. Pour un IndiCE inférieur à 1,5 la concentration en *E. coli* est inférieure à 100 UFC/100 mL et peut être due à l'acces du Bébec aux animaux sauvages ou à la remise en suspension de sediments contaminés. Pour une valeur de IndiCE supérieure du lessivage des bactéries présentent sur le sol du bassin versant.

Pour valider IndiCE comme indicateur de contamination par *E. coli* de l'eau de source, 10 campagnes de prélèvement de l'eau de la source avec une concentration en *E. coli* allant de 1,5 à 630 UFC/100mL ont été étudiées (Figure 58). Afin de prendre en compte le temps de transfert des eaux de surface dans l'hydrosystème, l'IndiCE utilisé pour déterminer la contamination de l'eau de la source est celui calculé 12 h avant le prélèvement.



Figure 58: (**••**) concentration en *E. coli* dans les eaux de la source de l'hydrosystème karstique de Norville en fonction de IndiCE pour un même usage du bassin versant



Figure 59 : Structure des populations de *E. coli* dans l'eau de la perte en présence de pâturage en fonction de IndiCE () phylogroupe A,() phylogroupe B1,() phylogroupe B2,() phylogroupe C,() phylogroupe D,() phylogroupe E, () phylogroupe F,() *Escherichia clades* et () *E. albertii.*

En effet l'indicateur étant calculé au pas de temps journalier cette méthode permet de prendre en compte le temps de transfert dans l'hydrosystème karstique de Norville qui varie de 11 à 38 h. Comme observé à la perte, la Figure 58 montre à la source une valeur seuil de IndiCE de 1,5 au-delà de laquelle la concentration en E. coli est significativement supérieure ($(2,13\pm2,8).10^2$ caractérisées IndiCE inférieur UFC/100mL) à celles par un à 1.5 mm ((1,6±0,8).10¹UFC/100mL) (pvalue=0.01). La Figure 58 présente un évènement dont l'IndiCE est 27,5, ce qui correspond à un évènement extrême avec 40 mm de hauteur de pluie en 2 jours menant à une entrée d'eau de surface importante dans la perte. La conductivité à la source a atteint une valeur de 204 µS/cm (contre 600µS/cm en moyenne) signalant une arrivée importante d'eau peu minéralisée à la source ce qui explique la concentration maximale en E. *coli* de (6,33±2).10² UFC/100mL.

La structure des populations n'est pas significativement différente entre la perte et la source. Des différences peuvent être observées et sont certainement dues à un échantillon statistiquement faible à la source, surtout pour IndiCE <1,5 qui est expliqué par la très faible $(1,6.10^1 \text{ UFC}/100 \text{ mL})$ à la source) contamination de l'eau pour ces périodes.

Pour conclure il existe une valeur seuil de IndiCE comprise entre 1,5 et 3,3 au-delà de laquelle la concentration en *E. coli* de l'eau de la perte est supérieure à 100 UFC/100mL et celle de l'eau de la source à 50 UFC/100mL. Les concentrations en *E. coli* de l'eau de la perte et de la source pour des valeurs de IndiCE comprises entre 1,5 et 3,8 sont à étudier pour affiner la limite de la valeur seuil de IndiCE. IndiCE pourra alors être utilisé comme indicateur quantitatif de contamination de l'eau d'un hydrosystème par *E. coli* pour le site de Norville.

3.3.2. Relation entre structure des populations de E. coli et IndiCE

Une analyse de la structure des populations de *E. coli* a été réalisée par l'analyse de la distribution des phylogroupes (Clermont *et al.*, 2013) à partir des collections prélevées dans l'eau de la perte et de la source du karst de Norville et comparée à IndiCE. Pour déterminer la source principale de contamination microbiologique selon la méthodologie mise au point sur ce site d'étude (Synthèse bibliographique section 3.4., Diversité des populations de *E. coli*) le rapport du nombre de souche appartenant au phylogroupe A sur B1 a été calculé.

La Figure 59 montre qu'à la perte la distribution des phylogroupes B1 (valeur p= 4,5.10-6), B2 (valeur p = 6.4.10-7) et clades (valeur p = 0.02), et donc la structure de la population de *E. coli*, est significativement différente pour les campagnes avec un IndiCE inférieur ou supérieur à 1,5. Le rapport A/B1 de 0,07 pour IndiCE<1,5 et 0,05 pour IndiCE >1,5 n'est pas significativement différent dans ces conditions. Il permet de confirmer une contamination microbiologique d'origine bovine plus qu'humaine dans les deux cas qui peut être expliquée par la mise au norme des fosses septiques (Partie 2, section 3.1.) et donc la suppression de l'apport en bactérie d'origine humaine. Ainsi l'utilisation du rapport A/B1 pour déterminer l'origine de la contamination microbiologique sur ce site d'étude demande à être revue. Le phylogroupe B1 est plus abondant pour les campagnes avec IndiCE >1,5 et représente 72% de la population de E. coli, suggérant une contamination majoritairement d'origine bovine sur ce site. Pour les campagnes avec IndiCE <1.5 mm le phylogroupe B2 est significativement plus abondant, représentant 47% de la population, suggérant une contamination provenant d'animaux sauvages. En effet sur ce bassin versant la population d'animaux domestiques est largement dominée par des bovins dont la proportion maximale de phylogroupe B2 dans la population d'E. coli du microbiote décrite dans la littérature est 0,6% (tableau 5).



Figure 60 : Structure des populations de *E. coli* dans l'eau de la source en présence de pâturage en fonction de IndiCE (\blacksquare) phylogroupe A,(\blacksquare) phylogroupe B1,(\blacksquare) phylogroupe B2,(\blacksquare) phylogroupe C,(\blacksquare) phylogroupe D,(\blacksquare) phylogroupe E, (\blacksquare) phylogroupe F,(\blacksquare) *Escherichia clades* et (\blacksquare) *E. albertii.*

La faune sauvage présente sur le bassin versant, composée de cervidés, sangliers, lapins et petits rongeurs est une source potentielle de contamination par des *E. coli* B2, les populations commensales de *E. coli* de ces espèces étant composé de 6,5% à 57% de B2.

La Figure 60 montre qu'à la source la structure des populations est significativement différente pour les campagnes avec IndiCE <1.5 et celles avec IndiCE >1.5. Le phylogroupe B1 représente une proportion significativement supérieure dans la population de *E. coli* prélevées avec un IndiCE >1,5 (80%) par rapport à sa proportion dans la population de *E. coli* prélevées pour IndiCE <1,5 (42%). Pour IndiCE <1,5 la population de *E. coli* est plus diversifiée avec chaque phylogroupe représentant au moins 3% de la population (excepté le phylogroupe F non représenté), par opposition avec la population de *E. coli* pour IndiCE <1.5 dans laquelle les souches d'autres phylogroupes que B1 représentent 20% de la population. Comme dans l'eau de la perte, la structure des populations est significativement différente pour les campagnes avec IndiCE inférieur et supérieur à 1,5 ; les souches de phylogroupe B1 sont majoritaires pour IndiCE supérieur à 1,5 montrant une contamination en *E. coli* cultivables majoritairement d'origine bovine.

Pour conclure pour IndiCE supérieur à 1,5, la contamination de l'eau de la perte et de la source est majoritairement d'origine bovine suggérant la formation d'une lame d'eau en surface du sol relargant les bactéries des fèces des bovins en pâturage sur le bassin versant, transitant ensuite dans le karst jusqu'à la source ; pour IndiCE<1,5 la structure des populations de *E. coli* très diversifiée suggère une contamination directe dans le cours d'eau de surface probablement liée aux animaux sauvages.



Figure 61 : Pour IndiCE () inférieur à la valeur seuil, l'eau du captage desinfectée peut être distribuée et stockée. En cas d'évenements pluvieux () menant à l'augmentation d'IndiCE au-delà de la valeur seuil () l'eau du captage peut soit être d'avantage desinfectée ou cesser d'être distribuée.

Partie 2 : Proposition d'un indicateur de conditions hydrologiques propices à la contamination des eaux d'un hydrosystème karstique par Escherichia coli - Du calcul d'IndiCE à l'utilisation opérationelle

4. Du calcul d'IndiCE à l'utilisation opérationelle

Pour éviter la distribution d'une eau à la qualité non conforme, des analyses microbiologiques sont réalisées régulièrement sur l'eau des captages. Ces analyses visent principalement à dénombrer les E. coli et les entérocoques qui doivent être absents de l'eau distribuée dans le réseau d'alimentation en eau potable. Les méthodes de dénombrement classiquement utilisées demandent 24 à 48 h de culture avant l'obtention des résultats, des méthodes plus rapides existent comme la PCR, cependant cette méthode ne permet pas de discriminer l'état métabolique (viable, viable non cultivable ou morte) et les tarifs sont actuellement prohibitifs. La qualité microbiologique de l'eau ne pouvant pas être suivi en permanence l'eau brute est toujours désinfectée avant d'être distribuée, même dans les stations de traitement les plus minimalistes. E. coli est très sensible à la désinfection de l'eau par des traitements au chlore (ou de ses dérivés) ou aux UV. Cependant il a été montré depuis 1981 (LeChevallier et al., 1981) et confirmé plus récemment (Keegan et al., 2012) une corrélation négative entre l'efficacité de la désinfection et la turbidité de l'eau brute. Pour une turbidité supérieure à 1 NTU, le temps d'exposition aux UV ou les doses de désinfectants utilisés pour traiter l'eau doivent être augmentés (OMS, 2017) sans toutefois dépasser la limite de 0,1mg/L de concentration résiduelle de chlore dans l'eau distribuée.

La turbidité est utilisée par les acteurs opérationnels de gestion des captages comme indicateur indirect de contamination de l'eau pour deux raisons : un pic de turbidité peut être associé à l'entrée de bactérie dans l'hydrosystème, une concentration importante en particules dans l'eau peut limiter l'action désinfectante du chlore. La turbidité est généralement mesurée in situ en continue au niveau du captage et son augmentation est suivie de différentes mesures en fonction du niveau de traitement de l'eau brute au captage : (i) le traitement de la turbidité au captage (floculation, ultrafiltration); (ii) le recours à des ressources de substitution (interconnexion entre des réseaux de distribution, utilisation de réserves d'eau); (iii) des restrictions d'usages de l'eau. Cependant l'alerte est donné au moment de l'augmentation de la turbidité et ne permet pas d'anticiper la dégradation de la qualité de l'eau, ne laissant que peu de temps aux gestionnaires du captage pour réagir et menant parfois à la distribution d'eau à la qualité altérée ou l'arrêt de la distribution en eau. De plus la qualité microbiologique de l'eau peut être altérée en l'absence de pics de turbidité lors du lessivage du sol sans érosion. L'utilisation d'IndiCE sur bassin versant alimentant un captage permet de prendre en compte les phénomènes de lessivage des sols ne provoquant pas d'érosion (comme montré par sa comparaison avec l'indicateur de l'ARES) et menant potentiellement à une contamination. De plus, une fois IndiCE calibré sur le site, la corrélation existant entre l'indicateur et la concentration en E. coli permet d'avoir une estimation fine de la concentration bactérienne de l'eau permettant de diminuer la concentration en désinfectant dans l'eau distribué en absence d'évènements de contamination microbiologique. L'utilisation d'IndiCE permet également d'anticiper les épisodes de contamination microbiologique des eaux. Pour des valeurs de IndiCE proches de la valeur seuil définie pour le site, il est possible de calculer la quantité de pluie nécessaire pour provoquer un épisode de contamination dans les 24 à 48h permettant de mettre les gestionnaires du captage en alerte et de constituer des réserves d'eau de bonne qualité microbiologique (Figure 61). IndiCE peut également être calculé à un pas de temps horaire en temps réel pour affiner la détection temporelle de la contamination.

Partie 2 : Proposition d'un indicateur de conditions hydrologiques propices à la contamination des eaux d'un hydrosystème karstique par Escherichia coli - Du calcul d'IndiCE à l'utilisation opérationelle

5. Conclusions et discussions

L'objectif de cette partie est de proposer un indicateur simple et facile d'utilisation, mesurable en continu par des paramètres facilement accessibles pour déterminer les conditions hydrologiques propices à la contamination en *E. coli* des eaux de surface et de source karstique.

L'hydrosystème karstique de Norville a été largement étudié ces 10 dernières années permettant d'acquérir des connaissances sur son fonctionnement enregistré grâce à des mesures continues de conductivité électrique et turbidité. Le site de Norville a été choisi pour cette étude car il permet l'accès au point d'engouffrement principal de l'eau de surface alimentant la source. De plus la petite taille du bassin versant permet de contrôler facilement l'usage des sols et les sources potentielles de contamination microbiologique qui sont par ailleurs bien connues depuis les travaux de Ratajczak et Laroche. Ces deux points ont permis de bien caractériser la contamination en *E. coli* entrant dans l'hydrosystème et de calibrer l'IndiCE sur le bassin versant et l'eau de surface. La prochaine étape de test de cet indicateur consistera à la calculer pour d'autres bassins versants alimentant des sources karstiques, le calibrer sur la concentration en *E. coli* de l'eau de source puis le valider sur les données de turbidité et conductivité électrique et sur d'autres prélèvements d'eau. Une fois IndiCE calibré pour le bassin versant seules la pluviométrie et la températures, paramètres facilement mesurables, sont nécessaires pour déterminer les périodes à risque de contaminations microbiologiques.

Le transport des bactéries présentes sur le bassin versant par une lame d'eau est à l'origine de l'entrée d'eau contaminée par *E. coli* dans l'hydrosystème. La formation d'une lame d'eau dépend de la quantité de pluie interagissant avec le sol et de la saturation des sols qui peut être définie par un indicateur de pluies antérieures (Kohler, 1951). De nombreux travaux ont montré que l'utilisation des seuls paramètres précipitations et températures permet de modéliser le phénomène de ruissellement (Justin,1914 ; Vogel *et al.*, 1999 ; Sellers, 1969 ; Hawley et Mc Cuen, 1982 ; Santos et Hawkins, 2011 ; Grillone et Baimonte, 2014). C'est pourquoi les paramètres d'entrée choisis, pour calculer l'indicateur, sont la hauteur de pluie et la température permettant de calculer la hauteur de pluie disponible pour interagir avec le sol (Oudin *et al.*, 2005) si l'eau n'est pas facteur limitant. Dans le cas contraire le calcul de l'ETP surestime la quantité d'eau retournant dans l'atmosphère. Sur le site étudié, les périodes de sécheresse et de déficit en eau n'ont pour le moment pas été enregistrées mais ce point est à prendre en compte si la méthodologie utilisée ici est reproduite dans des régions présentant des périodes de déficit en eau.

Le calcul d'IndiCE correspond au produit de l'indicateur de pluie antérieur API et de l'indicateur de forçage pluviométrique Ifp. IndiCE prend donc en compte l'intensité dans la durée et l'ancienneté d'un évènement pluvieux. Le calcul au pas de temps journalier permet une réactivité de l'indicateur en 24h, il augmente le jour même lors d'évènements pluvieux. Il peut également être calculé au pas de temps horaire pour plus de précision. Le décalage entre le retour à 0 de l'IndiCE et le fin d'un évènement pluvieux permet de simuler un « effet mémoire » des sols qui restent saturés plusieurs jours après un évènement pluvieux.

La calibration des paramètres k (nombre de jours à prendre en compte) et du facteur pondérateur utilisés dans le calcul de API_D par comparaison des différentes combinaisons possibles de la formule avec la concentration en *E. coli* de l'eau de la perte permet une adaptation à la configuration du site d'étude qui n'est pas prise en compte dans le calcul. En effet, la pente du bassin versant et la distance des sources de contaminations peuvent influencer sur la contamination de l'eau de l'hydrosystème (Yu *et al.*, 2016) ils sont ici pris en compte de manière indirecte au travers de cette calibration.

IndiCE permet également d'anticiper les épisodes de contamination microbiologique des eaux provoquées par le lessivage des sols: lors de périodes présentant un IndiCE élevé il est possible de déterminer quelle hauteur de pluie pourrait provoquer un épisode de contamination de l'hydrosystème au pas de temps journalier. L'utilisation d'IndiCE doit être couplée à une étude des sources de contamination potentielles sur le bassin versant étudié, celui-ci ne prenant pas en compte les contaminations directes des hydrosystèmes. IndiCE n'a pas pour vocation de remplacer un modèle prédictif de contamination des ressources en eau mais peut être utilisable dans le cas ou un modèle n'est pas calculable par exemple si le site ne peut être équipé de stations météorologiques et est difficilement accessible, ou pour des raisons de moyen et/ou de temps. Il peut permettre à des gestionnaires de ressources en eau vulnérables à la contamination microbiologique d'anticiper et déterminer les conditions hydrologiques menant à la contamination de l'eau par lessivage du sol et ainsi de pouvoir anticiper la dégradation de la qualité de l'eau. C'est par cet aspect d'anticipation des évenements de contamination qu'IndiCE est un meilleur indicateur de qualité de l'eau que les tests microbiologiques ou la mesure de la turbidité.

La comparaison de l'IndiCE avec la concentration et la diversité de E. coli dans l'eau de la perte et de la source de l'hydrosystème montre qu'il existe une valeur seuil de IndiCE comprise entre 1,5 et 3 au-delà de laquelle la concentration en E. coli de l'eau de la perte est supérieure à 100 UFC/100mL et celle de l'eau de la source à 50 UFC/100mL. Au-delà de cette limite, la population de E. coli est majoritairement composée du phylogroupe B1. L'étude de la contamination microbiologique de cet hydrosystème montre une origine de contamination en E. coli majoritairement bovine et humaine (Laroche et al., 2010; Ratajczak et al., 2010). Nous montrons ici que la source de contamination a évolué suite à la mise en application des arrêtés du 7 mars 2012 et 27 avril 2012 relatifs à la mise au norme des fosses septiques, diminuant significativement l'apport en E. coli d'origine humaine. En l'absence de contamination d'origine humaine ce site peu anthropisé n'est exposé qu'à des contaminations intermittentes d'origines bovines, liées au pâturage saisonnier de 25% du bassin versant (Partie 2, section 2.) et provenant de la faune sauvage (cervidés, sangliers, lapins, petits rongeurs). L'utilisation du rapport A/B1 pour déterminer l'origine de la contamination proposée par Ratajczak ne semble plus appropriée au vue des modifications d'usages du bassin versant. Les E. coli du microbiote des bovins présentent une proportion de B2 <1%, contrairement aux animaux sauvages (Synthèse bibliographique section 3.4_ tableau 5), l'utilisation du rapport B2/B1 pour discriminer les sources de contaminations microbiologique d'origine fécales de bovins et d'animaux sauvages semblerait à présent plus approprié pour ce site d'étude. Pour valider l'utilisation de ce rapport il faudrait prélever des fèces de la faune sauvage locale et déterminer la structure des populations de E. coli présentes dans les fèces de ces animaux, leurs antibiorésistance et la présence ou l'absence du gène hly, comme réalisé par Ratajczak dans ses travaux de thèse pour valider l'utilisation du rapport A/B1.
Cette méthode demanderait la comparaison avec d'autres méthodes de source tracking avant d'être validée. D'autres indicateurs que E. coli et les coliformes ont été proposés pour identifier les sources de contamination microbiologique d'origine fécale. En effet la multiplication des E. coli dans les eaux environnementales et leur distribution chez un grand nombre d'espèces animales (tableau 5) sont des inconvénients majeurs pour l'utilisation de cette espèce bactérienne pour identifier laes source de contaminations d'origine fécale. La détection de virus entériques qui persistent plus longtemps que E. coli dans l'environnement (Tran et al., 2015), sont présents en très grandes quantités (plus d'un trillion de virus infectieux par gramme de fèces) dans les selles et l'urine des hôtes (Hunt et al., 2010) et sont spécifiques de leurs hôtes (Fong et al., 2005 et Ahmed et al., 2010) comme outil de source tracking pourrait être une bonne alternative (Hunt et al., 2010 et H. Lee et al., 2011). Cependant la méthode la plus simple de détection de ces virus est la PCR et demande donc une étape d'extraction d'ADN ou d'ARN qui présente des biais méthodologiques, de plus la sensibilité PCR quantitative peut être altérée par des inhibiteurs environnementaux (Wong et al., 2012). Un autre outil de source tracking de plus en plus utilisé est la détection et quantification de bactéries anaérobies du microbiote comme les Bacteroides et les Bifidobacterium qui sont présents à de plus hautes concentrations que les FIB dans les fèces de leurs hôtes (Savage, 2001) et sont très spécifiques de leurs hôtes (Field et Samadpour, 2007). De plus les bactéries anaérobies ne se multiplient généralement pas dans l'environnement (Bernhard et Field, 2000). La détection de séquences génétiques spécifique de l'hôte de Bacteroidales permet également une bonne discrimination de la source de contamination. Cependant les séquences génétiques spécifiques à cibler ne sont déterminées que pour quelques espèces animales, auxquels s'ajoute l'être humain, et sont peu identifiées pour les espèces sauvages (Ahmed et al., 2009) ce qui est problématique pour le site de Norville vraisemblablement contaminé par la faune sauvage. De plus la détection se fait par PCR présentant donc les mêmes limites techniques que la détection des virus entériques et ne permettant pas de discriminer l'état métabolique des bactéries ce qui empêche une datation de la contamination. Dans les perspectives de cette étude il est donc proposé de discriminer les sources de contamination microbiologiques d'origine fécales de l'aquifère en associant l'analyse de la structure des populations de E. coli cultivables et la quantification de bactéries anaérobies comme les Bacteroides.

Sur ce site pour lequel les sources de contamination microbiologique sont bien connues, une proportion majoritaire du phylogroupe B1 suggère une contamination d'origine bovine liée à la formation d'une lame d'eau en surface du sol relarguant les bactéries des fèces déposées par des bovins en pâturage sur le bassin versant pour IndiCE supérieur à 1,5. Pour IndiCE inférieur à 1,5 la faible concentration en *E. coli* de l'eau de surface et la structure des populations de *E. coli* très diversifiées suggère une contamination directe dans le cours d'eau dépendant des déplacements d'animaux sauvages. Pour déterminer précisément la valeur seuil de IndiCE, le dénombrement de *E. coli* dans les eaux doit être réalisé pour des IndiCE compris entre 1,5 et 3 pour confirmer ou non le rapport exponentiel entre IndiCE et la concentration en *E. coli* de l'eau et affiner la valeur seuil.

Il a déjà été montré qu'un évènement pluvieux sur un sol contaminé par des matières fécales peut entrainer leur remise en suspension et élution provoquant le relargage des bactéries d'origine fécale et leur transport dans la lame d'eau formée à la surface du sol (Guber et al., 2006). Le temps de formation de la lame d'eau dépend de la saturation initiale du sol et de ses propriétés hydrauliques et varie selon les conditions hydrologiques antérieures (Cardoso et al., 2012; Kim et Lee, 2014) et la température. IndiCE ne prend pas en compte la durée des périodes sèches précédant les évènements pluvieux pouvant potentiellement provoquer le relargage massif de bactéries accumulées à la surface des sols comme montré pour le relargage des entérobactéries (Oliver et al., 2005 a, b). Cependant la contamination provient majoritairement de bouses de vaches et il a été montré que l'exposition aux conditions environnementales (UV, dessiccation) entre le dépôt des matières fécales et le relargage des bactéries diminue drastiquement, entre 3 et 4 ordres de magnitudes la quantité de bactéries fécales potentiellement relargables (Hodgson et al., 2009 ; Ling et al., 2009 ; Mishra et al., 2008). La dessiccation de la surface des matières fécales permet la formation d'une « croûte » en surface protégeant les bactéries des stress environnementaux mais aussi des précipitations. Les matières fécales exposées à un temps de latence de plusieurs mois entre leur dépôt sur le sol et le relargage des bactéries restent des réservoirs de bactéries d'origines fécales sur le long terme avec une concentration de 1,34 UFC de E. coli par gramme de fèces 16 jours après leur dépôt (Hodgson et al., 2009). Cependant la lame d'eau relargant majoritairement des bactéries présentent en surface des matières fécales, sa concentration en E. coli diminue avec l'augmentation du temps de latence entre le dépôt de matière fécale et l'évènement pluvieux (Drapcho et al., 2003 ; Muirhead et al., 2005) de l'ordre de 1 et 2 ordre de magnitudes pour des fèces de vaches et moutons après 16 jours (Hodgson et al., 2009).

Le transfert rapide dû à l'engouffrement du cours d'eau pérenne dans une perte connectée à un conduit principal dans l'hydrosystème karstique de Norville permet de conserver la cultivabilité des bactéries lors de leur transfert. Pour d'autres sites d'études, il est probablement nécessaire de prendre en compte la mortalité des bactéries lors de leur transfert dans l'hydrosystème pour l'estimation des E. coli cultivables dans l'eau de l'aquifère. Lors des périodes sèches avec un transfert majoritairement lent par la matrice et/ou des fissures, le temps de survie de E. coli dans cet environnement oligotrophique est le facteur limitant la contamination des sources karstiques. E. coli est trop souvent considérée comme une particule traversant la zone insaturée du karst sans interaction avec son environnement (Rockhold et al., 2004) et soumise à une mortalité graduelle (Foppen et Schijven, 2006 ; Pang, 2009) lorsque son transport dans les environnements aquatiques est modélisé. Il a été montré qu'un temps de transfert long permet un processus d'atténuation de la contamination microbiologique dans l'eau de l'aquifère (Iván et Mádl-Szőnyi, 2017), cependant il ne faut pas négliger les potentielles interactions physicochimiques et biologique de E. coli avec son environnement (Engström et al., 2015) lui permettant potentiellement de survivre dans la matrice ou les fissures, sous forme de biofilm notamment ou sous forme viable non cultivable (Petit et al., 2018). La multiplication de E. coli dans les sols a été montrée (Ishii et al., 2006) mais n'a pas encore été étudiée spécifiquement dans les karsts. Parmi les axes de recherches prioritaires pour mieux comprendre les dynamiques des bactéries d'origine fécale dans les karsts figure le développement de la recherche sur les transferts des indicateurs de contamination bactérienne d'origine fécale et leur survie dans la matrice des aquifères karstiques (Buckerfiel et al., 2019).

L'élaboration d'IndiCE s'inscrit dans une démarche multidisciplinaire par l'élaboration d'un indicateur simple, tant dans l'enregistrement des paramètres nécessaires à son calcul que dans son utilisation, permettant de définir objectivement les conditions hydrologiques. Il peut être utilisé dans des approches de microbiologie environnementale mais également par des gestionnaires de ressources en eau. Il reste une importante étape de test de cet indicateur sur plusieurs autres sites pour en définir les limites.

En résumé :

- L'indicateur IndiCE est un indicateur simple, à coupler à l'usage du bassin versant, permettant de détecter et d'anticiper les évènements hydrologiques propices à la contamination en *E. coli* de l'eau de l'hydrosystème.
- IndiCE se base sur l'enregistrement de données météorologiques facilement accessible, la pluviométrie et la température au pas de temps journalier.
- La comparaison de l'indicateur avec la contamination en *E. coli* des eaux de l'hydrosystème de Norville, suggère une remobilisation des *E. coli* du sol, majoritairement d'origine bovine, pour IndiCE compris entre 1,5 et 3 et leur transfert dans l'hydrosystème.

Partie 3 : Occurrence de E. coli dans des biofilms intra-karstiques -

Partie 3 : Occurrence de *E. coli* dans des biofilms intra-karstiques

Partie 3 : Occurrence de E. coli dans des biofilms intra-karstiques -

1. Contexte scientifique

L'entrée de bactéries d'origines fécales dans les hydrosystèmes peut mener à la contamination de sources karstiques par des bactéries pathogènes. Cette contamination, suivie par l'indicateur bactérien de contamination fécale *E. coli*, transporté dans le karst par les flux d'eau, est transitoire dans l'eau des sources karstiques qui est rapidement renouvelée après un évenement pluvieux. Lors de son transfert, *E. coli* interagit avec la matrice de l'hydrosystème et pourrait y persister. Hors de leur habitat primaire, le tractus digestif, la survie des souches d'*E. coli* dépend de leur capacité à surmonter les stress environnementaux (oligotrophie, température, compétition avec des communautés microbiennes autochtones) et la prédation par des protozoaires (John et Rose, 2005 ; Van Elsas *et al.*, 2011). Une stratégie de survie pour *E. coli* dans l'eau est l'association ou la formation de biofilms (Moreira *et al.*, 2012). Les biofilms sont des agrégats de microorganismes (bactéries, champignons, algues ou protozoaire) enchâssés dans une matrice d'exopolymères (EPS) attachés à des surfaces biotiques ou abiotiques (Costerton *et al.*, 1999 ; Flemming *et al.*, 2016).

La quantité de bactéries en biofilms est généralement supérieure à celle de bactéries planctoniques (en suspension) dans les hydrosystèmes souterrains (Goldscheider et al., 2006). La colonisation de ces biofilms autochtones par des microorganismes allochtones (provenant de la surface) dépend des caractéristiques de la communauté résidente comme sa diversité, la compétition pour les ressources et les modifications des conditions environnementales (Bellucci et al., 2015). Les biofilms formés dans les milieux aquatiques sont des environnements où des bactéries pathogènes sont susceptibles de se maintenir sous forme cultivables, mais également viables non cultivables (VNC). La lyse des bactéries pathogènes dans le biofilm provoque la libération de leur ADN, sous forme libre dans la matrice, à disposition des bactéries du biofilm (Wingender et Flemming, 2011). La concentration importante d'ADN dans les biofilms et la proximité des bactéries favorisant les contacts cellulecellule font des biofilms des lieux théoriquement favorables aux échanges génétiques horizontaux. Il a été montré des échanges génétiques, dont des gènes d'antibiorésistance et des intégrons cliniques, au sein de biofilms environnementaux (Balcàzar et al., 2015) et dans des systèmes de traitement des eaux (Farkas et al., 2013). L'intégrons clinique de classe 1 est fréquemment associé à des multirésistances chez des bactéries pathogènes, il est considéré comme un biomarqueur xénogénétique de contamination (Gillings et al., 2008 ; Stadler et al., 2012).

Les méthodes classiques culture-dépendante, utilisées pour déterminer la qualité de l'eau ne permettent pas la détection de pathogènes, potentiellement en état VNC, au sein des biofilms. La recherche de pathogènes doit également être réalisée dans des biofilms par des méthodes culture-indépendantes. Wingender et Flemming dans leur revue du rôle des biofilms comme réservoir de pathogène dans des systèmes de distribution des eaux proposent plusieurs méthodes dont la PCR ciblant des pathogènes spécifiques et l'hybridation fluorescente *in situ* (FISH) (Wingender et Flemming, 2011).

Dans le cadre de mes travaux de thèse le rôle des biofilms comme réservoir d'*E. coli* et/ou d'éléments génétiques mobiles dans les hydrosystémes karstiques et leur interaction avec la flore autochtone du karst en biofilm a été étudiée selon deux approches (i) une approche en laboratoire qui repose sur une expérimentation en chemostat et (ii) une approche *in situ* en exposant des supports à biofilm dans l'eau d'une source karstique.





Figure 63: Représentation schématique du déroulé de l'experimentation en chemostat au cours du temps. (--) Proportion de LB et (--) proportion de glucose dans le milieu d'alimentation du chemostat.

2. Démarche méthodologique

Culture et analyses de biofilms en réacteur

Les conditions d'expérimentation ont été préalablement mises au point au laboratoire dans le cadre d'une collaboration avec Phill Benett (Université d'Austin, Texas). Le chemostat utilisé est un réacteur de laboratoire d'une contenance maximale de 400 mL traversé par un flux continu de milieu. L'agitation permet de maintenir un apport en oxygène régulier et d'homogénéiser le milieu dans le réacteur. Deux tiges portant chacune 3 pastilles (0,942 cm2; 0,23 cm3) de craie stérilisées à l'autoclave sont plongées dans le bioréacteur durant 20 jours. L'alimentation du réacteur est assurée par une pompe qui prélève le milieu stérile. Afin d'éviter d'éventuelles contaminations celui-ci passe à travers 2 filtres de porosité 0,22 μ m (Sterile Filter Unit with Durapore **(B)** PVDF Membrane) placés entre les bouteilles de milieu nutritif et le chemostat (Figure 62).

Pour étudier la capacité de *E. coli* à former des biofilms, la souche de *E. coli* EC1286, isolée du karst de Norville dont le temps de survie en conditions environnementales est compris entre 7 et 14 jours (Berthe *et al.*, 2013) a été choisie. Dans le but d'adapter progressivement la croissance de *E. coli*, bactérie chimioorganotrophe, aux conditions oligotrophiques du karst l'expérimentation se déroule en 2 phases, une première phase au cours de laquelle le chemostat est alimenté en milieu A (eau du karst, 6,66% (m/v) milieu LB, 0,1% glucose(m/v) pH 7) et une seconde phase au cours de laquelle il est alimenté en milieu B, appauvri en source de carbone (eau du karst, 2,5% (m/v) milieu LB, 0,01% glucose (m/v), pH 7) (Figure 65).

Dans le cadre de ces travaux, les conditions expérimentales des expériences en chemostat précédemment réalisées au laboratoire ont été optimisées en calculant les valeurs de débit à appliquer pour chacun des milieux nutritifs. Lors d'une expérimentation en culture continue, le débit du milieu de culture nutritif stérile entrant dans le réacteur est égal au débit du milieu de culture, il est calculé afin que les bactéries soient toujours en phase exponentielle de croissance. Le nombre de cellules qui sort du chemostat ne doit pas être supérieur au nombre de cellules générées au sein du réacteur, des valeurs trop élevées du débit videraient le réacteur de son contenu en bactéries. Le débit a été calculé d'après la modélisation de Monod (1950). Ce modèle fondamental simplifié, repose sur le principe que les cellules se multiplient, avec une mortalité cellulaire nulle, et une absence de production de produit inhibiteur.

Le débit du milieu nutritif qui entre dans le chemostat est alors calculé en fonction du taux de croissance de la souche dans ce même milieu. Ainsi pour notre expérience la démarche cidessous a été suivie pour calculer le débit de la pompe pendant les deux phases de l'expérimentation :

Bilan de concentration en biomasse d'après la modélisation de Monod :

$$\frac{d[X]}{dt} = \mu_X - \frac{F}{V}[X] \qquad (\text{Equation 1})$$

Où X : la biomasse dans le réacteur, μ : le taux de croissance, F : le débit de sortie de biomasse et V : le volume du bioré acteur

On admet alors que le chemostat est en état stationnaire dynamique soit :

 $\frac{d[X]}{dt} = 0$ (Equation 2) donc : $F = \mu * V$ (Equation 3)



Figure 64: Graphique de la chronique des conditions hydrologiques (IndiCE) et usage du bassin versant (périodes pâturées) durant la période d'incubation des trois supports à biofilms.(—)IndiCE,(\blacklozenge) prélèvements de biofilms, et (\blacksquare) périodes de pâturage sur le bassin versant.



Figure 65 : Organigramme de l'analyse des biofilms, en bleu les étapes réalisées après dissociation des biofilms, en gris les étapes réalisées après dissociation des biofilms et extraction de l'ADN et en jaune l'étapes réalisées après marquage des biofilms.

Des expériences de suivi de croissance de la souche EC1286 en milieu A à 20°C sous agitation ont permis de déterminer la valeur du taux de croissance $\mu = 0,005 \text{ h}^{-1}$, et donc la valeur de débit (F) qui est de 2 mL.min⁻¹. De même en milieu B, le taux de croissance de la souche EC1286 est de 0,0035 h⁻¹, la valeur du débit est donc 1,4 mL/min.

Les biofilms ont été visualisés par imagerie en microscopie électronique à balayage après une étape de fixation et de métallisation des échantillons selon le protocole developpé par P. Benett (voir matériel et méthode section 9.2.). La biomasse totale de bactéries viables à la surface de la craie a été quantifiée par cytométrie en phase solide en utilisant le système ChemScan RDI (Chemunex, Ivry-Sur-Seine, France) après marquage avec le kit Bioburden. La quantification des *E. coli* cultivables en biofilm a été réalisée sur les suspensions cellulaires obtenues après dissociation des biofilms (voir matériel et méthode section 2.3.).

Formation et analyses de biofilms in situ

Un total de 14 campagnes de prélevement de biofilms formés sur le support à biofilm (partie 1. Section 7.) ont été réalisées en parallèle d'un dénombrement des *E. coli* de l'eau, du suivie des conditions hydrologiques (IndiCE) et de l'usage du bassin versant (Figure 64).

La densité bactérienne des biofilms formés sur la craie a été quantifiée par (i) PCR quantitative avec amplification de l'ADNr 16S permettant d'estimer les bactéries totales du biofilm, y compris celles lysées (matériel et méthodes section 7.2.) et par (ii) cytométrie en phase solide permettant de quantifier les bactéries totales viables, y compris les viables non cultivables (matériel et méthodes section 4.2.). La diversité bactérienne des communautés en biofilm a été étudiée par séquençage massif des amplicons correspondant aux gènes codant l'ARNr 16S (Illumina, MiSeq).

Les biofilms ont été observés par imagerie en microscope confocale à balayage laser (Plateforme PRIMACEN ; Leica TCS LSI, Leica Microsystems, Mannheim, Germany) après marquage de la matrice des biofilms, de l'ADN bactérien total et des *E. coli* viables par la sonde FISH Colinsitu (matériel et méthodes section 9.1.).

La détection et la quantification de *E. coli* dans les biofilms *in situ* a été réalisée par (i) une approche moléculaire de quantification du gène *ybbW* spécifique de *E. coli* par qPCR (Walker *et al.*, 2017), (ii) quantification des *E. coli* cultivables et analyse de la structure des populations par la méthode Clermont (Clermont *et al.*, 2013) et (iii) imagerie en microscopie confocale après marquage de l'ADN de *E. coli* par la sonde spécifique Colinsitu (Eurogentec). Les intégrons cliniques de classe 1 ont été recherchés dans l'ADN total des biofilms et dans les souches de *E. coli* cultivables isolées des biofilms par amplification du gène *int11* (Figure 65).

Partie 3 : Occurrence de E. coli dans des biofilms intra-karstiques - Démarche méthodologique



Figure 66: Evolution de la densité en *E. coli* en fonction du temps dans le chemostat. Le suivi a été réalisé par mesure de la turbidité (1 UDO= 2,68.108 UFc/mL).



Figure 67 : Formation de biofilms sur les pastilles de craie immergées dans le réacteur après 20 jours de culture continue d' *E. coli* (EC1286) (pastille de droite) ; pastille de craie grattée pour récupérer la biomasse (pastille de gauche).



Figure 68: Occurrence d'*E. coli* cultivable (UFC/cm²) et de bactéries totales viables (bactéries/cm²) après 20 jours de culture en chemostat sur de la craie

3. Résultats

3.1. Formation de biofilm en chemostat

Afin d'étudier la capacité d'E. coli à former des biofilms sur de la craie en conditions oligotrophiques, une culture de E. coli en présence de pastilles de craie de Norville a été réalisée en chemostat. La formation des biofilms sur la craie est étudiée par la quantification de la densité bactérienne sur la craie et une observation en microscopie éléctronique à balayage. Dans un second temps, une analyse protéomique a été réalisée pour identifier les protéines de E. coli spécifiques de la formation de biofilms et confirmer son passage du mode planctonique au mode biofilm au cours de la culture en réacteur.

3.1.1. Formation de biofilms de E. coli en chemostat

Un suivi de la DO du milieu du chemostat en fonction du temps a été réalisé sur une période de 20 jours. Ce paramètre permet d'évaluer le nombre de bactéries en suspension dans le milieu, il a été déterminé par approche expérimentale que 1 UDO de la souche de E. coli EC1286 correspond à 2,68.10⁸ UFC.mL⁻¹. Lors de la première phase de l'expérimentation, durant laquelle le chemostat est alimenté en milieu A, la densité en E. coli cultivables dans le réacteur augmente les cinq premiers jours montrant que la valeur du débit est inférieure au temps de génération de la souche, puis, elle se stabilise à $(3,3\pm0,7)$.10⁻¹ UDO soit $(8,8\pm2)$.10⁷ UFC/mL entre le 5^{ème} et le 9^{ème} jour. Au cours de cette phase, les bactéries sont sous forme planctonique dans le milieu de culture. Le 9^{ème} jour la formation de flocs à la surface du réacteur est observable. Le milieu alimentant le chemostat est progressivement appauvri en source de carbone. La deuxième phase de l'expérimentation, durant laquelle le chemostat est alimenté en milieu B est caractérisée par une forte diminution de la densité en E. coli en suspension dans le réacteur jusqu'à atteindre une valeur minimale de $(1 \pm 0,2)$.10⁻¹ UDO soit $(3 \pm 0,5)$.10⁷ UFC.mL entre le 13^{ème} jour et le 19^{ème} jour (Figure 66) et une désagrégation progressive des pastilles de craie. Après 20 jours de culture en chemostat, la densité cellulaire est divisée par 10 dans le réacteur, et des biofilms bactériens sont observables sur les pastilles de craie (Figure 67).

Cette évolution caractéristique de la densité bactérienne dans le réacteur avait été mesurée lors des précédentes expériences en chemostat. Ces résultats suggèrent que la diminution des sources de carbone dans le milieu induit un stress pour *E. coli* auquel elle s'adapte en passant d'un mode de vie planctonique à un mode de vie en biofilm sur la craie.

3.1.1. Densité bactérienne sur la craie

La densité des bactéries viables sur la craie est en moyenne de $(2,8\pm2,3).10^8$ bactéries/cm² et la densité de *E. coli* cultivable est $(5,7\pm9,7).10^6$ bactéries/cm² montrant la présence de *E. coli* dans des biofilms formés sur la craie dans le chemostat (Figure 68). La densité de bactéries viables associées à la craie est significativement supérieure à celle des *E. coli* cultivables (2% en moyenne) suggérant la présence de *E. coli* en étant viable non cultivable ou la présence d'autres bactéries à la surface de la craie.

Ces résultats montrent que *E. coli* cultivée dans un milieu oligotrophique peut former ou s'associer à des biofilms formés sur de la craie.



Figure 69: Micrographes obtenus par microscopie électronique à balayage après deshydratation et metallisation des pastilles de craies immergées dans le chemostat, pendant 20 jours de culture d' *E. coli* en continu : A grossissement 10 μ m, B grossissement 2 μ m.

100		
90	autres	
80	Paennibacillus E. coli	
70	L. com	
60		
50	Chryseobacterium	
40		
30	Enterobacter	
20		
10	Pseudomonas	
0		

Figure 70: Genres et espèces bactériennes dont des proteines ont été identifiées par analyse protéomique dans les biofilms formés en chemosat. Résultat exprimé en pourcentage



Figure 71: (A) Plan d'expérimentation pour rechercher les bactéries chimioorganotrophes aérobies autochtones de la craie non éliminées par le traitement à 121°C 20 min (autoclave) (B) Espèces bactériennes identifiées, dans la craie stérilisée, par séquençage

L'observation des pastilles de craie après 20 jours en chemostat au microscope électronique à balayage montre la formation de structures hétérogènes composées de filaments et d'éléments en forme de coques et de bâtonnets à la surface de la craie. Ces observations confirment la présence de biofilms bactériens sur la craie (Figure 69). Pour montrer le passage de *E. coli* du mode planctonique au mode biofilm lors de sa culture en conditions oligotrophiques, une analyse protéomique a été réalisée sur les biofilms formés lors d'une expérience similaire en chemostat. L'analyse des protéines exprimées dans les biofilms a montré la présence de seulement 17,6% de protéines strictement identifiées comme *E. coli* suggérant la présence d'autres souches dans le biofilm (Figure 70). L'intégralité du matériel utilisé ainsi que les milieux de culture ayant été préalablement stérilisé par autoclave et le chemostat ayant été inoculé par une culture pure de *E. coli*, la présence d'autres espèces bactériennes dans le chemostat n'était pas attendu. L'hypothèse d'une contamination lors de l'expérience a été écartée après la répétition de l'expérience à plusieurs reprises en conditions aseptiques, les autres espèces bactériennes présentes dans le chemostat proviennent donc de l'intérieur du réacteur suggérant la présence de bactéries dans la craie, matrice de l'hydrosystème karstique.

3.1.4. Identification de bactéries chimioorganotrophes, présentes dans la craie

Afin de tester si des bactéries autochtones présentes au sein de la craie ont pu persister après le traitement de stérilisation et contribuer au développement des biofilms, une caractérisation des communautés microbiennes chimioorganotrophes par analyse de la diversité de l'ADNr 16S a été réalisée (figure 70). Des pastilles de craie ont été stérilisées à l'autoclave (121°C 20 min) puis broyées et mises en culture dans le milieu A à 20°C sous agitation. Une pastille de craie témoin n'a pas été stérilisée avant d'être broyée. Après 30 jours, le milieu de culture est trouble suggérant le développement de bactéries. Les bactéries chimioorganotrophes cultivables étant les seules à pouvoir se développer dans le chemostat, nous les avons selectionnées par culture à température ambiante dans le milieu A, enrichi en sources de carbone. Elles ont été cultivées et isolées sur milieu A gélosé. Chaque isolat a ensuite été identifié par séquençage massif des amplicons correspondant aux gènes codant l'ARNr 16S bactérien (Figure 71A). Les résultats du séquençage montrent que 21 espèces de bactéries ont été identifiées à plus de 1% dans les échantillons des craies stérilisées (Figure 71B). Ces résultats montrent que la stérilisation de la craie par autoclavage ne permet pas d'éliminer certaines bactéries chimioorganotrophes cultivables résentes dans la craie suggérant la présence de bactéries insérées dans la craie.

L'analyse protéomique a montré la présence de 23% de protéines de *Pseudomonas* dans les expériences réalisées en chemostat. Trois espèces de *Pseudomonas* ont été identifiées par séquençage dans les 6 échantillons de craie mis en culture : *Pseudomonas brenneri, Pseudomonas mandelii, Pseudomonas orientalis* montrant que plusieurs espèces de *Pseudomonas* sont présentent dans la craie et peuvent résister à la stérilisation par autoclavage de la craie. Les autres espèces dont des protéines ont été identifiées dans les biofilms du chemostat en grande proportion (36% pour *Chryseobacterium* et 5% pour *Paennibacillus*) ont également été identifiées par séquençage dans les bactéries cultivables résistantes à l'autoclave.

Les biofilms formés sur la craie dans le chemostat ne sont pas uniquement composés de *E. coli* mais également d'autres bactéries ayant résisté à la stérilisation par autoclave protégées au sein des pastilles de craie suggérant la facilitation de la formation de biofilm de *E. coli* par un ou plusieurs colonisateurs primaires et la persistance de bactéries cultivables dans la craie.



Figure 72: Comparaison de deux méthodes de quantification de la densité bactérienne des biofilms (support 1): (\square) les bactéries totales viables dénombrées par cytométrie en phase solide et (\triangle) les bactéries totales dénombrées par qPCR sur la base du nombre de copies d'ADNr 16S/cellule. L'écart type est représenté par la barre verticale, son absence signifie qu'il est de taille inférieure au symbole.



Figure 73: Evolution de la densité des bactéries au sein des biofilm en fonction de l'âge des biofilms Avec (Δ) le nombre de bactéries déterminé par quantification du nombre de copies d'ADNr16S. L'écart type est de taille inférieure au symbole. (Δ) support n°1, (Δ) support n°2.



Figure 74: Représentation graphique de la matrice de corrélation des paramètres environnementaux et de la densité bactérienne des biofilms. Les corrélations non significatives sont barrées d'une croix. La taille et la couleur des cercles correspondent au coefficient de corrélation. En bleu les corrélation positives et en rouge les corrélations négatives.

3.2. Formation de biofilms *in situ*

Afin d'évaluer le rôle de réservoir de *E. coli* des biofilms karstiques, des biofilms formés *in situ* sur le support à biofilm immergé à la source sont étudiés. Dans l'objectif de confirmer la présence de biofilms sur le support à biofilm installé *in situ*, la densité bactérienne sur les cylindres de craie du support est analysée par différentes méthodes permettant de quantifier des bactéries non cultivables. Dans un second temps la présence d'une communauté bactérienne autochtone en biofilm dans l'hydrosysytème de Norville, et son évolution dans le temps en fonction des conditions hydrologique est étudiée par séquençage de la communauté totale présente dans les biofilms. La présence et la dynamique de *E. coli* et l'intégron de classe 1 dans les biofilms formés *in situ* a ensuite été suivie par différentes méthodes.

3.2.1. Caractérisation de la composante bactérienne des biofilms formés sur la craie, à la source du karst de Norville

Quantification de la densité bactérienne

Pour évaluer la densité bactérienne des biofilms, deux outils ont été testés sur les biofilms formés sur les supports en craie: (i) la cytométrie en phase solide permettant de quantifier toutes les bactéries chimioorganotrophes aérobies mésophiles viables, y compris celles en état viables non cultivables et (ii) la quantification du nombre de copies d'ADNr16S par qPCR permettant de déterminer le nombre de bactéries totales (en partant de l'hypothèse qu'il y a 4,1 copies d'ADNr16S par bactérie (Klappenbach *et al.*, 2001)) viables et lysées. Chaque échantillon a été analysé par ces deux méthodes en triplicat. La comparaison de ces deux méthodes a été réalisée sur des biofilms de 37 à 93 jours prélevés sur le support 1, en 5 campagnes de prélèvement (Figure 72). Les deux méthodes montrent la présence de bactéries en biofilms sur tous les cylindres de craie analysés. La densité moyenne mesurée par cytométrie en phase solide est $(3,2\pm3,9)$. 10^6 bactéries/cm², supérieure de deux ordres de magnitudes à celle mesurée par quantification de l'ADNr 16S, $(3,1\pm2,8).10^4$ bactéries/cm².

Ces résultats, qui différent, montrent que la quantification de l'ADNr 16S sous-estime de deux ordres de magnitudes la densité bactérienne dans les biofilms, probablement dû à une perte de matériel génétique lors de l'extraction d'ADN (153 ng/ biofilm en moyenne) ou d'une hypothèse non appropriée sur le nombre de copies d'ADNr 16S par cellule . Cependant l'évolution de la densité est identique quelle que soit la méthode employée, les deux méthodes semblent donc acceptables pour quantifier la densité bactérienne dans les biofilms. La méthode de quantification par qPCR, moins contraignante, a été choisie pour la suite de l'étude pour quantifier la densité bactérienne des biofilms.

La Figure 73 confirme que la densité bactérienne évolue peu dans le temps, n'étant pas significativement différente dans 6 campagnes de prélèvement sur 8 (valeur p=0,14) avec une moyenne de $4,5.10^4$ bactéries/cm². Cependant, les biofilms de 50 jours et de 286 jours présentent des densités bactériennes significativement différentes des autres (valeur p =0,036 et $2,2.10^{-16}$) suggérant une influence de paramétres environnementaux sur la densité bactérienne.

Le coefficient de corrélation entre la densité bactérienne, le pâturage, le nombre d'évènements pluvieux (nombre de jours avec IndiCE>1,5 auxquels ont été exposés chaque biofilms), le nombre de jour depuis le dernier évènement pluvieux, la valeur d'IndiCE le jour du prélèvement et l'âge des biofilms ont été calculés. La Figure 74 montre qu'il n'existe pas de corrélation significative entre ces paramètres et la densité bactérienne. La seule corrélation significative observée est entre l'âge des biofilms et le nombre d'événements pluvieux auquel ont été exposés les biofilms, ces deux paramétres étant indirectement liés.



Figure 75: Conditions hydrologiques sur la période du 17/02/2015 au 06/05/2015 et du 01/12/2016 au 29/01/2017 avec (|) IndiCE et () densité bactérienne dans les biofilms (bactéries/cm²).



Figure 76: Les phyla identifiés dans la craie, sont retrouvés dans les biofilms dont la communauté est enrichie de bactéries de l'eau

Les biofilms de 50 jours présentant la densité bactérienne la plus faible, $(2,4\pm0,8)$.10³ bactéries/cm², ont été prélevés le 07/04/2015, 4 jours après un évènement pluvieux avec un IndiCE de 6.4 suggérant le décrochage des bactéries en biofilms par l'augmentation du débit provoquée par cet évènement. La densité bactérienne revient à la normale pour les biofilms de 64 jours prélevés après une période sèche (IndiCE=0). Les biofilms de 286 jours prélevés le 10/01/2017 présentent une densité bactérienne supérieure de trois ordres de magnitudes, (3,4±0,3).10⁷ bactéries/cm², par rapport aux biofilms prélevés lors d'autres campagnes de prélèvement. Cette campagne de prélèvement fait suite à des conditions hydrologiques exceptionnelles : un mois de décembre très sec, marqué par un évènement pluvieux intense caractérisé par IndiCE=20 le 21/12/16 (Figure 75). La valeur d'IndiCE montre que cet évènement pluvieux a pu provoquer le lessivage du bassin versant menant à la contamination massive de l'hydrosystème karstique et donc l'adhésion importante d'une communauté bactérienne allochtone en biofilm. La densité bactérienne dans les biofilms prélevés 8 jours plus tard est de $(4,7\pm0,3)$. 10⁴ bactéries/cm², proche de la valeur moyenne de densité bactérienne des biofilms. Cette diminution importante de la densité bactérienne suggère un décrochage, ou une lyse des bactéries du biofilm, et de leur ADN. L'évènement pluvieux du 12 au 15 janvier caractérisé par un IndiCE maximal de 14,5 pourrait avoir provoqué un décrochage des bactéries en biofilm.

Ces résultats suggèrent que les bactéries autochtones du karst se multiplient dans les biofilms augmentant la densité bactérienne dans le temps mais sont régulièrement décrochées par des augmentations du débit intra-karstiques. Ce décrochage de la flore autochtone pourrait provoquer une diminution des interactions competitrices de la communauté en biofilm permettant la colonisation des biofilms par une flore allochtone (provenant de la surface) de façon transitoire.

Comparaison des communautés bactériennes identifiées dans la craie et dans les biofilms formés in situ

La structure des communautées bactérienne identifiée dans les biofilms formés *in situ* et dans la craie (tout échantillon confondu) est différente à l'échelle du phylum (Figure 76). Cependant les phyla majoritairement représentés dans la flore de la craie, *Proteobacteria, Actinobacteria, Firmicutes, et Bacteroidetes* sont également retrouvés parmis les 9 phyla les plus représentés dans les biofilms. Ces résultats suggérent qu'une partie de la communauté bactérienne des biofilms est entrée dans la craie et y persiste ou qu'une partie de cette communauté a été transféré lentement au travers de la porosité de la matrice de l'hydrosystème, et y persiste.

Diversité des communautés bactériennes des biofilms

Chaque support à biofilm n'étant pas incubé durant la même période, pour un âge équivalent le nombre d'évènements potentiels de contamination varie, les communautés bactériennes des différents supports ont donc été étudiées séparément. La diversité bactérienne des biofilms a été suivie dans le temps par séquençage massif des amplicons correspondant aux gènes codant l'ARNr 16S bactérien. L'indice de Shannon a été calculé pour chaque biofilm pour caractériser la diversité bactérienne, plus cet indice est élevé plus la communauté est diversifiée.



Figure 77: La structure des communautés bactériennes identifiées par séquençage (Illumina) en biofilm (A) au niveau des phyla, (B) au niveau des genres, (C) date des prélèvements et âge des biofilms. (*) structure des populations bactériennes des biofilms du support 1 significativement semblable (valeur p =0,08); (**) structure des populations bactériennes des biofilms du support 2 significativement semblable (valeur p =0,44); (***) structure des populations bactériennes des biofilms du support 3 significativement semblable (valeur p =0,07).

Tableau 11: Tableau représentant la proportion relative des genres bactériens identifiés dans au moins 5 campagnes de prélèvement de biofilms sur 11. (
) genres représentant entre 1 et 5% de la communauté bactérienne identifiée, (
) entre 5 et 10% et (
) plus de 10%.

support	1	1	1	1	2	2	2	2	2	3	3
date de prélèvement	25/03/2015	07/04/2015	21/04/2015	20/05/2016	10/01/2017	19/01/2017	28/04/2017	18/07/2017	05/12/2017		22/02/2018
Âge des biofilms	37	50	64	93	286	294	393	474	613	141	199
Pseudomonas	6,91	19,92	2,93	1,84	66,26	9,17	2,68	3,82	6,63	3,15	0,00
Pedosphaera	2,31	0,00	3,65	2,20	0,00	1,10	3,92	1,49	0,00	1,56	3,04
Acidobacterium	0,00	0,00	1,32	1,44	0,00	2,72	4,52	5,72	0,00	3,81	8,05
Opitutus	1,01	0,00	2,60	1,97	0,00	0,00	3,56	0,00	2,30	1,48	7,06
Acinetobacter	0,00	0,00	0,00	0,00	10,26	2,76	0,00	4,64	0,00	1,14	4,34
Pedobacter	1,40	0,00	2,23	1,85	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	5,18	11,81
Planctomyces	0,00	0,00	3,46	3,95	0,00	0,00	1,63	1,61	0,00	4,30	0,00
Flavobacterium	3,88	2,25	1,43	1,76	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	1,41	0,00
Nitrospira	1,44	0,00	0,00	1,48	0,00	0,00	1,83	3,09	0,00	0,00	1,06
Cytophaga	0,00	0,00	3,48	1,23	0,00	0,00	1,49	1,21	0,00	0,00	1,00
Nitrosovibrio	0,00	0,00	2,24	1,95	0,00	0,00	1,46	1,11	0,00	0,00	1,33

La Figure 77A montre que la communauté bactérienne des biofilms, identifiée à l'échelle des phyla n'est pas stable dans le temps (valeur p= $2,2.10^{-16}$). Sur le support 1 incubé du 17/02/2015au 20/05/2016 (93 jours), les communautés bactériennes sont semblables pour les biofilms de 37, 64 et 93 jours (valeur p=0,08) avec les phyla Proteobacteria, Bacteroidetes et Actinobacteria majoritaires représentant respectivement 48%, 14% et 9%. Seule la communauté des biofilms de 50 jours prélevés le 07/04/2015 est significativement différente avec une plus grande proportion d'Actinobacteria (29%) et elle présente l'indice de Shannon le plus bas pour ce support à biofilm (1,34). Les biofilms prélevés lors de cette campagne de prélèvement sont également ceux présentant la plus faible densité bactérienne confirmant un décrochage de bactéries en biofilms. Sur le support 2 incubé du 01/04/2016 au 05/12/2017 (613 jours), les communautés des biofilms de 294, 393 et 474 jours sont semblables (valeur p=0,44) et composées majoritairement des phyla Proteobacteria, Bacteroidetes et Cyanobacteria représentant respectivement 48%, 10% et 8%. La communauté des biofilms de 286 jours prélevée le 10/01/2017 est significativement différente avec seulement deux phyla représentés Proteobacteria (98%) et Firmicutes (2%) et l'indice de Shannon le plus faible mesuré sur tous les biofilms (0,15). Ces résultats confirment l'hypothèse d'une adhésion massive de bactéries allochtones suivant l'épisode de contamination exceptionnel du 20/12/2016. La communauté bactérienne des biofilms de 613 jours prélevés le 05/12/2017 est également significativement différente des autres communautés prélevées sur ce support, avec plus de quatre fois plus d'Actinobacteria, en effet c'est dans les biofilms prélevés sur cette campagne que la densité bactérienne est la plus faible pour ce support ce qui peut être expliqué par les évènements pluvieux important (IndiCE supérieur à 1,5 les 12 jours consécutifs précédant le prélèvement) des jours précédents qui auraient pu décrocher les bactéries du biofilm. Sur le 3^{ème} support incubé du 18/07/2017 au 22/02/2018 (199 jours), la communauté bactérienne est semblable (valeur p=0,07) pour les deux campagnes de prélèvement du 05/12/2017 et 22/02/2018 avec les phyla Proteobacteria (44%), Bacteroidetes (17%) et Verrucomicrobia (8%) majoritaires.

La structure des populations est significativement différente pour toutes les campagnes de prélèvement à l'échelle du genre (Figure 77B). La structure de population prélevée le 10/01/2017 est peu diversifiée même à cette échelle avec seulement 6 genres bactériens représentés contre 22 genres bactériens représentés en moyenne dans les autres biofilms. Onze genres bactériens sont retrouvés à plus de 1% dans 5 biofilms sur 11 (Tableau 11) composant une communauté bactérienne majoritaire stable en biofilm quels que soient les supports et l'âge des biofilms. Les deux genres les plus représentés sont *Pseudomonas* et *Pedosphaera* identifiée dans 10 et 8 campagnes de prélèvement. Le genre *Pseudomonas* est détecté dans 10 biofilms sur 11 et sa proportion est supérieure à 10 dans les biofilms présentant les communautés bactériennes les moins diversifiées de chaque support. De plus ce genre est largement majoritaire (66,26 %) dans les biofilms prélevés le 10/01/2017, 8 jours plus tard, sa proportion a diminué de plus de 6 fois (9%). Ces résultats suggérent une colonisation par *Pseudomonas* à la suite d'événements de décrochage de la flore autochtone des biofilms et une diminution de sa proportion lors du retour de la population autochtone.



Figure 78: Observation des biofilms de 146 jours en microscopie confocale laser (Leica Microsystems, Mannheim, Germany) avec un objectif macroscopique (Plan APO 2,0x ouverture numérique 0,2), sur les supports en craie (A) marquage de l'ADN intracellulaire au SYTO9 ; excitation laser 488 nm - bande d'émission 500-550 (B) marquage des EPS de la matrice avec une lectine, la concanavalin A ; excitation laser 635 nm – bande d'émission 650-700 nm, (C) marquage de l'ARN de *E. coli* par la sonde FISH Colinsitu laser 532 nm – Bande d'émission 550-600 nm, les flèches blanches désignent des *E. coli* marquées (D) superposition des trois images, les flèches blanches désignent des *E. coli* présentant le double marquage Syto9-Colinsitu enchâssés dans la matrice d'EPS. Acquisition des 3 marqueurs effectués de manière séquentielle afin d'éviter tout chevauchement spectral ; les images de biofilms bactériens doublement marquées ont été déconvoluées à l'aide du logiciel Huygens (SVI, Hilversum, The Netherlands) et ajustées avec le logiciel ImageJ (NIH, Bethesda, USA).

3.2.2. Présence de E. coli dans les biofilms exposés in situ Présence E. coli viables au sein des biofilms

Afin de s'assurer de la présence de *E. coli* viables insérées en biofilms des biofilms exposés 146 jours dans l'eau de la source du karst de Norville (support 3) ont été observés au microscope confocal après marquage FISH (Hybridation fluorescente *in situ*), de l'ADN total par le SYTO 9 et de la matrice du biofilm par la conA. Le protocole de marquage des biofilms par la sonde Colinsitu décrit par les éditeurs de la sonde a été optimisé pour pouvoir être utilisé en association avec du SYTO 9 et de la conA sur les biofilms formés sur les cylindres de craie. Différentes conditions de marquage ont été testés et celle retenue une immersion d'1h à 42°C dans la sonde colinsitu, suivie d'une immersion d'1h30 dans une solution de SYTO 9, suivie d'une immersion d'1h30 dans une solution précédente et une observation directe après le dernier rinçage. La complémentarité de la sonde Colinsitu (Regnault *et al.,* 2000) avec une portion d'ARNr 16S spécifique de *E. coli* permet de marquer des bactéries qui sont considérées viables car le temps de $\frac{1}{2}$ vie de l'ARN dans une cellule est très court, celuici n'est retrouvé que dans des cellules viables et métaboliquement actives.

Des bactéries présentant le triple marquage SYTO 9, Colinsitu ont été observées enchâssées dans la membrane, montrant la présence de *E. coli* viables dans les biofilms (Figure 78). De plus ces résultats montrent que cette sonde peut être utilisée pour l'observation de *E. coli* dans des biofilms naturels.



Figure 79 : Densité d' *E. coli* cultivable dans les biofilms en fonction des conditions hydrologiques et de l'usage du bassin versant pour les différents supports (•) support 1, (•) support 2, (•) support 3 ; les barres verticales représentent l'écart type. Le fond en vert indique les périodes de pâturage sur le bassin versant.



Figure 80: Evolution de la densité de *E. coli* cultivables (UFC/cm²) dans les biofilms sur les différents supports en fonction (A) de l'âge des biofilms(B) du nombre d'évènements potentiels de contamination auquel les biofilms ont été exposés ($_{\bullet}$) support 1, ($_{\bullet}$) support 2, ($_{\bullet}$) support 3 ; les barres verticales représentent l'écart type.

Occurrence de E. coli cultivables dans les biofilms en fonction des paramètres hydrologiques et de l'âge des biofilms

L'occurrence de *E. coli* cultivable dans les biofilms a été suivie par dénombrement des souches cultivables (11 campagnes de prélèvements). L'espèce *E. coli* a été dénombrée pour 9/11 campagnes montrant que cette bactérie peut s'associer à des biofilms *in situ* sous forme cultivable. La concentration en *E. coli* cultivable dans les biofilms n'augmente pas avec le temps d'exposition *in situ* (Figure 79 et Figure 80A). Pour un même support *E. coli* peut être détectée lors d'une campagne et ne plus l'être un mois plus tard : le 07/01/2016, $3\pm0,1$ UFC/cm² de *E. coli* cultivable ont été quantifiée, 41 jours plus tard, la quantité de *E. coli* cultivable est inférieure au seuil de détection de 0,1 UFC/cm² montrant un accrochage transitoire dans les biofilms.

La concentration et l'évolution de la concentration de *E. coli* cultivable dans les biofilms des différents supports n'est pas comparable suggérant un impact des conditions environnementales sur cette concentration. En effet, comme vu dans le chapitre 1, les conditions environnementales, d'hydrologie et d'usage du bassin versant, influencent la concentration de *E. coli* dans l'eau de la source à laquelle sont exposés les biofilms. Afin de tester cette hypothèse, l'impact des conditions hydrologiques sur la concentration en *E. coli* cultivable dans les biofilms a été étudiée. Le nombre d'évènements potentiels de contamination, définis par le nombre de jour avec IndiCE>1,5 en période de pâturage, auxquels ont été exposés chaque biofilm, a été défini.

La Figure 80B montre que le nombre d'évènements potentiels de contamination, auxquels a été exposé un biofilm, n'influence pas directement la concentration en *E. coli* cultivable dans les biofilms (coefficient de corrélation -0,1). Cependant la concentration en *E. coli* cultivable dans les biofilms augmente significativement entre chaque prélèvement en période de pâturage sur le bassin versant, et diminue au cours des périodes ou le bassin versant n'est pas pâturé (figure 59), c'est au cours des périodes de pâturage que les concentrations maximales en *E. coli* cultivables ont été observées pour chaque support. Le nombre potentiel d'évènements de contamination n'influence pas la densité en *E. coli* dans les biofilms, l'usage du bassin versant au moment du prélèvement du biofilm semble avoir plus d'incidence.

E. coli peut s'associer à des biofilms naturels sous forme cultivable, sa présence est consécutive à un évènement pluvieux sur le bassin versant pâturé toutefois *E. coli* ne semble pas persister sous forme cultivable dans les biofilms.



Figure 81: Structure des populations de *E. coli* cultivables en fonction de l'usage du bassin versant avec pour le phylogroupe A, pour le phylogroupe B1, pour le phylogroupe B2, pour le phylogroupe C, pour le phylogroupe D, pour le phylogroupe E, pour le phylogroupe F, pour les *Escherichia clades* et pour les *E. albertii*, ; (*) structure des population significativement semblable (valeur p= 0,07); (**) structure des populations significativement semblable (valeur p=0,25).



Figure 82: Quantification de *E. coli* dans les biofilms du support 2 et de l'integron clinique de classe 1 dans les biofilms et les souches de *E. coli* circulant dans l'eau. () Les barres jaunes représentent l'abondance relative de *E. coli* dans la communauté bactérienne totale séquencée des biofilms. La quantification de *E. coli* et de l'integron de classe 1 a été réalisée par qPCR sur l'ADN extrait des biofilms. Dans l'eau de source le gène *intII* a été recherché dans les souches de *E. coli* cultivables par PCR. NA : résultat non acquis

Structure des populations de E. coli cultivables

En parallèle à l'étude quantitative, une étude de la diversité des populations d'*E. coli* associées en biofilm a été réalisée en utilisant la méthode Clermont qui permet de déterminer le phylogroupe de chaque isolat de *E. coli* (Clermont *et al.*, 2013). La Figure 81 montre que la structure des populations de *E. coli* cultivables dans les biofilms est significativement différente en fonction de l'usage du bassin versant (valeur p=2,34.10⁻⁶). En période de pâturage les isolats de *E. coli* du phylogroupe B1 représentent la majorité, soit 80%, de la population totale de *E. coli* cultivables dans les biofilms et confirment une contamination majoritairement d'origine bovine. En absence de pâturage les phylogroupes B1 et *Escherichia* clades sont répartis à égales proportion (30%) suggérant une contamination de plusieurs origines, bovins et animaux sauvages. La structure des populations est semblable dans l'eau de la source et les biofilms en période de pâturage (valeur p=0,25) ou en absence de pâturage sur le bassin versant (valeur p=0,07).

Ces résultats confirment que le pâturage du bassin versant a un impact sur la structure des populations de *E. coli* cultivables dans les biofilms et montrent que la structure des populations de l'eau est semblable à celle des biofilms ce qui peut s'expliquer par l'hypothèse d'une association transitoire dans les biofilms.

Quantification de E. coli par qPCR

Afin de quantifier *E. coli* dans les biofilms sans discrimination de l'état métabolique, une quantification du gène *ybbW* spécifique de *E. coli* a été réalisée par PCR en temps réel sur l'ADN extrait de biofilms du support 2 immergés dans l'eau de la source de 286 jours à 613 jours (Walker *et al.*, 2017). Le nombre de copies du gène est inférieur au seuil de quantification de 200 copies du gène dans tous les biofilms, *E. coli* est cependant détectable dans 4 échantillons sur les 5 quantifiés (Figure 82).

Une approche semi-quantitative a également été utilisée par quantification de la proportion de *E. coli* détectées dans la communauté totale identifiée par séquençage massif des amplicons correspondant aux gènes codant l'ARNr 16S bactérien. Ces résultats ne concordent pas avec ceux obtenus par dénombrement des *E. coli* cultivables mais confirment la présence d'ADN de *E. coli* dans la majorité des biofilms. Ces résultats ne permettent pas de conclure avec certitude mais suggérent une absence d'accumulation d'ADN de *E. coli* dans les biofilms.

Occurrence d'intégrons cliniques de classe 1

Des intégrons cliniques de classe 1 ont été recherchés par amplification du gène *int11* dans l'ADN extrait de biofilms provenant de 8 campagnes de prélèvements. Ils ont été détectés uniquement dans les biofilms de 286 jours prélevés le 11/01/2017, alors que les biofilms prélevés sur 8 campagnes de prélèvement ont été testés. Des intégrons de classe 1 ont été détectés dans les *E. coli* cultivables de l'eau uniquement sur cette campagne de prélèvement également (Figure 82). Ces résultats confirment que l'évènement pluvieux exceptionnel (IndiCE=20) du 21/12/2016 a provoqué la contamination de l'hydrosystème, eau et biofilms. Des bactéries porteuses d'intégrons de classe 1 peuvent être intégrés à des biofilms naturels. Cependant ces intégrons n'ont pas été détectés dans les biofilms de 280 jours prélevés le 28/04/2017 sur le même support suggérant que les bactéries porteuses d'intégrons de classe 1 ne persistent pas dans les biofilms.



Figure 83: Des bactéries pathogènes opportunistes sont naturellement présentes dans l'environnement aquatique et certaines ont la capacité de persister sur de longues périodes et de se multiplier dans des biofilms. Modifié d'après Wingender et Flemming, 2011.

4. Conclusions et discussions

L'objectif de ce travail était d'étudier la capacité de *E. coli* à former et à s'associer à des biofilms dans un hydrosystème karstique pour déterminer le rôle de réservoir de pathogènes et d'élements géntiques mobiles des biofilms karstiques.

Le support à biofilm mis au point pour cette étude est adapté pour l'étude de la formation de biofilm sur de la craie car il permet une exposition *in situ* et un échantillonnage facile. Des biofilms ont été détectés sur les cylindres de craie comme le montrent les images en microscopie confocale qui mettent en évidence la structure du biofilm grâce aux marquages de la matrice et de l'ADN bactérien. Ces images montrent également l'association de *E. coli* viables au sein des biofilms.

L'espèce bactérienne E. coli sous forme cultivable peut s'associer à des biofilms in situ et en chemostat mais sa concentration dans les biofilms n'augmente pas avec le temps. Dans les biofilms formés à la source du karst de Norville la densité de bactéries viables moyenne mesurée par cytométrie en phase solide est de $(3,2\pm3,9)$.10⁶ bactéries/cm², ce qui est inférieur à la densité des biofilms formés en chemostat, (2,8±2,3).10⁸ bactéries/cm² confirmant les résultats montrés par Personné (Personné et al., 2004) avec une approche similaire. Cette différence peut être expliquée par la prédation des bactéries en biofilms in situ (Chabaud et al., 2006) et leur décrochage par des augmentations du débit. Ces bactéries d'origine fécale sont transportées dans l'hydrosystème lors d'épisodes de contamination, c'est-à-dire de ruissellement sur un sol contaminé comme montré dans le chapitre précédent, cependant leur concentration n'augmente pas avec le nombre d'expositions du biofilm aux évènements de contamination. Ces résultats suggérent que E. coli sous forme cultivable ne s'accumule pas dans les biofilms, sa colonisation est transitoire comme montré par Wingender et Flemming dans des réseaux d'eau potable (2011) (Figure 83) et Personné avec une approche similaire à celle de cette étude, dans trois systèmes karstiques (Personné et al., 2004). L'adhésion de E. coli transitoire dans les biofilms suggére un potentiel relargage dans l'eau de l'hydrosystème avec un temps de latence court par rapport aux évènements de contamination dans des biofilms comme montré en réacteur (Bellucci et al., 2015). Son adhésion, même à de faibles concentrations, peut donc interférer avec son utilisation comme indicateur de contamination d'origine fécale des eaux.

La capacité de *E. coli* à former des biofilms tout en étant exposée à un débit important (Abberton *et al.*, 2016) et sa présence récurrente dans des biofilms de système de distribution d'eau (Juhna *et al.*, 2007) vont à l'encontre de nos résultats, cependant, le transfert au travers de l'hydrosystème karstique expose les bactéries allochtones à de multiples stress : oligotrophie, température de 10°C, débit important dans les conduits, compétition avec la flore autochtone et potentiel broutage par des protozoaires. Or la capacité de *E. coli* à former des biofilms est altérée en conditions oligotrophiques ou en présence d'une communauté autochtone déjà en biofilm (Abberton *et al.*, 2016). Ces conditions mènent probablement à un ralentissement métabolique voir un état viable non cultivable des bactéries les rendant moins adaptables que dans des expériences in silico avec apport de source de carbone ou dans des systèmes de distribution des eaux dont les conditions sont stables.



Partie 3 : Occurrence de E. coli dans des biofilms intra-karstiques - Conclusions et discussions

Figure 84: Histogramme représentant la composition des communautés bactériennes identifiées en biofilm dans ce travail et celles identifiées dans des environnements souterrains. La communauté bactérienne identifiée dans les biofilms du karst de Norville est significativement semblable aux communautés bactériennes moyennes de 18 grottes.

L'usage du bassin versant et les conditions hydrologiques au moment du prélevement influencent la concentration et la structure des populations de *E. coli* cultivables au sein des biofilms qui est significativement semblable à celle de l'eau de source. Dans l'eau de la source et les biofilms en période de pâturage le phylogroupe majoritaire est B1 (80%) marqueur de contamination bovine, en dehors des périodes de pâturage les phylogroupes clades et B1 sont répartis à égale proportion (30%). La présence des intégrons cliniques de classe 1 dans les biofilms est également conditionnée par leur présence dans l'eau, ces éléments génétiques mobiles n'ont été détectés dans les biofilms et dans l'eau uniquement suite à un évènement pluvieux majeurs (IndiCE=20) suggérant un lessivage massif du bassin versant. Ces résultats montrent que des bactéries exposées à des antibiotiques, probablement d'origine humaines ou d'animaux d'élevage, ont la capacité d'adhérer à des biofilms naturels cependant leur présence dans les biofilms semble transitoire.

La densité bactérienne de biofilms formés in situ n'est pas dépendante du nombre d'évenements pluvieux auxquels sont exposés les biofilms, cependant c'est immédiatement à la suite d'évenements pluvieux majeurs que la densité est la plus basse suggérant un décrochage de la communauté autochtone des biofilms karstiques lors d'augmentations importantes du débit intra-karstique permettant la colonisation des surfaces par des bactéries allocthones qui ne persistent pas dans les biofilms. La communauté bactérienne est significativement semblable sur la majorité des biofilms prélevés sur chaque support suggérant la présence d'une communauté autochtone au karst stabilisée en biofilm et résiliente comme évoqué dans de précédentes études (Farnleitner et al., 2005 ; Goldscheider et al., 2006 ; Pronk et al., 2009). Cette communauté bactérienne est principalement constituée de Proteobacteria, Actinobacteria, Acidobacteria, Bacteroidetes, Firmicutes, Verrucomicrobia, Planctomycete, Nitrospirae et Chlorofexi comme précédemment observé dans des cavités souterraines et résumé dans la revue de Tomczyk-Zak et Zielenkiewicz portant sur 18 sites d'études (Tomczyk-Zak et Zielenkiewicz, 2014) (Figure 84). Ces résultats suggérent que les communautés bactériennes des biofilms autochtones vont entrer en compétition avec les communautés allocthones adhérant aux biofilms à la suite d'évènements de contamination. Les biofilms autochtones déjà adaptés aux conditions du milieu éliminent les bactéries provenant de la surface, retrouvant rapidement leur composition initiale comme montré en réacteur (Bellucci et al., 2015).

Il a été montré que des bactéries peuvent entrer dans la matrice poreuse de la craie (Kaster et al., 2012; Halim et al., 2014) nous montrons ici que des bactéries chimiorganotrophes cultivables peuvent résister à la stérilisation par autoclave dans les pores de la craie. Des protéines produites par Chryseobacterium, Pseudomonas, Enterobacter et Paennibacillus ont été identifiées dans les biofilms formés sur la craie en plus de protéines de E. coli, inoculée dans le réacteur. Une expérience de formation de biofilm en condition karstique par des bactéries isolées d'un échantillon d'eau souterraine filtrée sur membrane de 0,4µm a menée à l'identification de quatre groupes bactériens majeurs composant les biofilms : Zoogloea, Bacillus/Paenibacillus, Enterobacteriaceae, et Pseudomonas (Ross et al., 2001). La flore sélectionnée par filtration dans l'expérience de Ross est potentiellement la même que celle sélectionnée par la taille des pores de la craie pour y pénétrer, les pores de la craie pouvant varier entre 0,0004 et 6,1 µm. Trois des groupes bactériens identifiés dans les biofilms de Ross sont retrouvés dans les biofilms formés sur la craie en chemostat dans notre étude, la concordance des résultats confirme la capacité de ces espèces autochtones aux eaux souterraines à entrer dans la craie et à y former des biofilms en conditions oligotrophiques. L'ensemble de ces résultats montrent la présence de bactéries dans la craie provenant du transfert par la porosité de la matrice de bactéries de surface ou de bactéries en biofilm.

Partie 3 : Occurrence de E. coli dans des biofilms intra-karstiques - Conclusions et discussions

Le genre bactérien *Pseudomonas*, dont certaines espèces sont des pathogènes opportunistes impliqués dans des maladies nosocomiales (Aujoulat *et al.*, 2012) a par ailleurs été identifié dans 10/11 campagnes de prélèvement de biofilms *in situ*, de plus il a été montré que cette bactérie peut pénétrer dans les pores de la craie et y persister (Halim *et al.*, 2014) justifiant sa présence dans la craie. Il a été montré *in silico* que la formation initiale de biofilms de *P. aeruginosa* favorise la formation de biofilms de *E. coli*, y compris en conditions de faibles concentrations en nutriments (Culotti et Packman, 2014) ce qui rejoint nos observations en chemostat et confirment l'hypothèse du rôle de colonisateur primaire de *Pseudomonas* facilitant l'adhésion de *E. coli* au sein des biofilms. Ce genre bactérien circule en permanence dans l'eau du karst de Norville dû à une contamination de surface (Dussart *et al.*, 2003 ; Dussart-Baptista *et al.*, 2007). Des *Pseudomonas* isolées d'un karst à proximité résistent toutes à au moins un antibiotique et certaines présentent jusqu'à 6 résistances.

Acinetobacter, identifiée dans 5 campagnes de prélèvements de biofilms sur 11 est également un pathogène opportuniste dont l'habitat primaire est l'environnement (Joly-Guillou, 2005 ; Towner, 2009 ; Doughari *et al.*, 2011), et a une capacité de coaggrégation avec des bactéries de l'eau rendant sa présence déterminante pour la formation de biofilms (Simões *et al.*, 2007 ; Katharios-Lanwermeyer *et al.*, 2014) suggérant qu'elle pourrait agir comme « recruteur » de bactéries circulant dans l'eau en les intégrant au biofilm. La présence récurrente de *Pseudomonas* et d'Acinetobacter dans les biofilms montre qu'ils peuvent être des réservoirs de bactéries pathogènes opportunistes, potentiellement antibioresistantes, dont l'habitat primaire est l'environnement.

Ces travaux ont également permis de tester et developper plusieurs outils pour l'étude de biofilms *in situ* et en chemostat. Pour la détection et la localisation de *E. coli* au sein des biofilms nous recommandons une approche par marquage FISH, comme évoqué dans des études sur la détection de *E. coli* dans des biofilms de circuits de distribution d'eau (Juhna *et al.*, 2007 ; Wingender et Flemming, 2011) associée à une méthode de détection basée sur la cultivabilité. Cette dernière approche est moins sensible et ne permet pas la détection de bactéries viables non cultivables (Juhna *et al.*, 2007 ; Mezule *et al.*, 2013 ; Abberton *et al.*, 2016), cependant la cultivabilité est un critère indispensable pour estimer le risque sanitaire représenté par *E. coli*.

Deux approches ont été utilisées pour quantifier l'ADN de E. coli dans les biofilms : la qPCR amplifiant le gène ybbW et la quantification de la proportion de E. coli dans les communautés bactériennes totales séquencées. Cette dernière approche est semi quantitative car toutes les espèces bactériennes ne sont pas identifiées avec la même sensibilité. Cependant tous les paramètres étant constant (méthodes de prélèvement, de dissociation des biofilms, d'extraction d'ADN et de séquençage) les variations de proportion peuvent être interprétées, à défaut d'interpréter directement l'abondance relative de E. coli dans la communauté totale de E. coli séquencée. En effet l'abondance relative est plus impactante sur la variabilité entre plusieurs échantillons que la variabilité de biomasse (Bender et al., 2018). La faible biomasse étudié pose un verrou méthodologique à la quantification du gène ybbW par qPCR, qui est au mieux détectable mais en dessous des limites de quantification de cette méthode. Ce verrou n'a pas permis de quantifier le gène inIl dans les biofilms non plus mais a permis de le détecter. Les approches de biologie moléculaires demandent à être testées sur un pool d'ADN de plusieurs biofilms prélevés en même temps. L'approche la plus adaptée pour détecter et quantifier E. coli dans les biofilms semble être le double marquage par la sonde FISH ColinSitu et le SYTO 9 des E. coli viables. Cette méthode est la moins contraignante et permet une approche quantitative qui n'a pas été développée ici.
Partie 3 : Occurrence de E. coli dans des biofilms intra-karstiques - Conclusions et discussions

Pour l'estimation de la densité bactérienne des biofilms, nous recommandons l'utilisation de la PCR quantitative amplifiant l'ADNr 16S. Toutefois la proportion importante de bactéries en phase stationnaire au sein des biofilms qui ont moins de copies d'ADNr 16S que les bactéries métaboliquement actives demande de revoir le nombre moyen de copies d'ADNr 16S par bactéries pour l'estimation du nombre de bactéries.

L'espèce bactérienne *E. coli*, indicateur de contamination fécale dont certaines souches sont pathogènes pour l'être humain peut s'associer à des biofilms intra-karstiques et son comportement doit être étudié pour évaluer le risque sanitaire que pourrait représenter le relargage de ces bactéries et le transfert de gènes dans les biofilms autochtones. Dans ce travail nous montrons la capacité de *E. coli* à former et à adhérer à des biofilms sur de la craie en milieu karstique de façon transitoire. Les résultats suggèrent que les biofilms peuvent être assimilés à des réservoirs transitoires de *E. coli* dans les hydrosystèmes karstiques, alimentés par des évènements pluvieux sur un sol contaminé. Le décrochage des *E. coli* et d'autres bactéries allochtones potentiellement pathogènes des biofilms doit être étudié pour mesurer son potentiel impact sur la contamination de l'eau hors des évènements de contamination décrits dans le chapitre 1.

Pour résumer :

- L'espèce bactérienne *E. coli* peut s'associer a des biofilms sous forme cultivable en conditions karstiques *in situ* et en chemostat. Cependant son adhésion est transitoire dans l'hydrosystème karstique.
- Des intégrons cliniques ont été retrouvés dans les biofilms uniquement suite à un évènement pluvieux majeur (IndiCE=20), mais ne semblent pas persister dans le temps.
- La formation des biofilms par *E. coli* semble être facilitée par d'autres espèces bactériennes autochtones
- Ces biofilms peuvent être colonisés par des bactéries pathogènes opportuniste dont l'habitat primaire est l'environnement comme *Pseudomonas*.

Partie 3 : Occurrence de E. coli dans des biofilms intra-karstiques - Conclusions et discussions

Conclusions et perspectives



Figure 85: Représentation schématique des paramétres pris en compte par IndiCE.

Les hydrosystèmes karstiques sont vulnérables à la contamination microbiologique dont l'importance est fonction des conditions hydrologiques et de l'usage du bassin versant. La contamination en bactéries d'origine fécale est liée à l'activité humaine et dépend de la densité de population ou des usages agricoles (pâturage, épandage). L'objectif de ces travaux était de déterminer les conditions menant à la contamination microbiologique de ces hydrosystèmes, compte-tenu de l'enjeu majeur qu'ils représentent en tant que ressource en eau potable.

Dans un premier temps les conditions hydrologiques susceptibles d'entraîner la contamination d'une source karstique ont été étudiées. En l'absence de contamination ponctuelle, l'entrée de contaminants microbiologiques est provoquée par la formation d'une lame d'eau sur un sol contaminé ruisselant jusqu'à une perte, point d'entrée dans le système. Ce phénomène dépend de la quantité de pluie et de la saturation du sol. Une fois la contamination entrée dans l'hydrosystème, la structure interne de celui-ci peut (i) jouer un rôle de filtre et permettre l'épuration de l'eau si le transfert est plus long que le temps de survie des bactéries ou (ii) permettre le passage des contaminants microbiologiques en cas de transfert rapide au travers de larges conduits, menant à la contamination de la source karstique (Figure 85).

La contamination bactérienne de l'hydrosystème de Norville est provoquée par le relargage de E. coli des fèces déposés par les bovins en pâturage sur le bassin versant, ces évènements ne sont pas toujours associés au ruissellement et donc à des pics de turbidité dans les eaux. C'est pourquoi il était nécessaire de développer un indicateur indirect de contamination des eaux pour remplacer ou compléter la mesure de la turbidité. Un indicateur de contamination de l'eau de cet hydrosystème par E. coli, prenant en compte l'intensité dans la durée et l'ancienneté des évènements pluvieux ainsi que l'évapotranspiration est proposé ici. Plusieurs études ont montré une relation significative entre la pluviométrie antérieure et la présence de E. coli ou coliformes dans l'eau (Howard et al., 2003; Hynds et al., 2012, 2014a; O'Dwyer et al., 2016; Atherholt et al.,2017). Cependant dans cette étude la mesure de la pluviométrie antérieure est pondérée par l'évapotranspiration permettant de définir la quantité de pluie disponible pour ruisseler ou lessiver le sol. Cet indicateur, permet d'évaluer le risque de contamination de la ressource en eau karstique en temps réel et aussi de l'anticiper. Il a pour vocation d'être facilement calculable et interprétable pour être utilisé par des gestionnaires de ressources en eau. Il peut aussi permettre une aide à la gestion de sources en eau karstiques utilisées comme eau potable sans traitement préalable, notamment dans des pays en voie de développement.

Sur le site de Norville, dans les conditions de notre étude, nous avons déterminé qu'il existe une valeur seuil de cet indicateur (IndiCE) au-delà de laquelle l'hydrosystème est contaminé par *E. coli* en période de pâturage, que ce soit au niveau des eaux de surface (perte) ou souterraines (source). D'un point de vue pratique, l'utilisation d'IndiCE sur un site requiert dans un premier temps une étape de calibration, pour définir le nombre de jours de pluie antérieure à prendre en compte dans son calcul, et pour quantifier cette valeur-seuil. Cette calibration nécessite l'installation d'une sonde multiparamétrique TCD (turbidité, conductivité électrique, débit) sur une année, accompagné du recueil journalier des usages des sols (périodes de pâturage ou d'épandage notamment). Dans un second temps l'équipement des sites étudiés se résume à un pluviomètre et un thermomètre ou, le cas échéant, aux données habituellement recueillies par Météo France.

Cet indicateur établi dans les conditions météorologiques inhérentes à l'étude, sur une période de 18 mois, requiert d'être vérifié sur le site de Norville dans d'autres conditions, puis sur d'autres sites karstiques avec des bassins versants différents notamment plus complexes et plus anthropisés.

Un modèle prédictif de la contamination d'aquifères en Irlande, le modele ISI-LR (O'Dwyer et al., 2018), est basé sur l'entrée de 15 variables divisées en trois catégories : (i) intrinsèques correspondant principalement à la pluviométrie des 5 jours précédents la mesure et la température, (ii) spécifiques renseignant les sources de contamination fécales potentielles et (iii) structurales désignant le type de puit ou forage. Cette étude n'est pas centrée sur les aquifères karstiques cependant sa méthodologie permet d'anticiper à 85,7% l'absence de E. coli dans l'eau et à 90% sa présence. L'implémentation de ce modèle avec le calcul de IndiCE pourrait permettre d'améliorer à la fois le modèle de O'Dwyer par une meilleure évaluation de la pluviométrie antérieure et de l'eau disponible pour ruisseler et IndiCE par la prise en compte d'aspects spécifiques et structuraux. Cette démarche globale et multi-disciplinaire permettrai l'utilisation de l'indicateur présenté ici sur de nouveaux sites d'études. IndiCE peut également être associé à des démarches de cartographie de la vulnérabilité des eaux souterraines qui se sont développées en grand nombre ces dernieres années (EPIK, REKS RISKE, KARSTIC, COP, COP+K, PaPRIKa, DRASTIC). L'utilisation de l'indicateur n'est appropriée que sur des sources karstiques vulnérables à la contamination microbiologique, il peut donc être intéressant de commencer par déterminer la vulnérabilité de l'hydrosystème étudiée avec l'une de ces méthodes avant de se lancer dans la démarche de calibration de IndiCE.

La contamination microbiologique de l'eau des hydrosystèmes karstiques est le plus souvent transitoire, cependant, au sein même des karsts, des bactéries subsistent, majoritairement sous forme de biofilms. Elles peuvent ainsi amener une contamination différée des eaux lors du décrochage de pathogènes des biofilms. Nous avons montré l'existence de biofilms, formés en conditions karstiques sur de la craie, dont la composition bactérienne correspond à celle des eaux souterraines. La densité bactérienne des biofilms diminue à la suite d'évènements pluvieux majeurs suggérant un décrochage des biofilms lors d'augmentations importantes du débit. Des expériences doivent encore être réalisées pour déterminer les valeurs critiques de débit décrochant les biofilms. À la suite d'épisodes de décrochage et de colonisation par des bactéries allochtones, les biofilms retrouvent rapidement leur densité et leur communauté bactérienne initiale.

Ces biofilms karstiques peuvent intégrer de façon transitoire des bactéries pathogènes opportunistes dont l'habitat primaire est l'environnement de surface ; nous avons montré que les genres bactériens *Pseudomonas* et *Acinetobacter* ont été identifiés dans la majorité des biofilms prélevés. Soulignons l'enjeu sanitaire de leur étude : la présence de ce genre *Pseudomonas* présente un danger pour la santé des consommateurs de l'eau. Par exemple, sur le site de Norville, pour lequel l'eau est seulement traitée par chloration avant d'être distribuée, des souches de *Pseudomonas* résistantes à la chloration ont été isolées. De plus des *Pseudomonas* multi antibiorésistantes ont été isolées d'un hydrosystème voisin de ce même site.

E. coli peut s'associer à des biofilms en condition karstique sous forme cultivable in situ et en chemostat mais ne semble pas s'y accumuler ni y persister. Ces résultats sont contraires à ceux montrés par l'étude de biofilms de rivière et de systèmes de ditribution d'eau potable dans lesquels les E. coli peuvent persister (Balzer et al., 2010 ; Mackowiak et al., 2018 ; Juhna et al., 2007) et parfois s'accumuler. Bien que la présence de biofilms peut augmenter le taux d'attachement des bactéries (Strathmann et al., 2007) l'oligotrophie du milieu karstique ainsi que les basses températures de l'eau souterraine sont des facteurs pouvant limiter la croissance de E. coli dans les milieux karstiques. Nous avons montré que E. coli a la capacité de s'associer à des biofilms sur de la craie en conditions oligotrophique et de survivre sous forme cultivable au moins 20 jours en chemostat. In situ, E. coli peut s'associer en biofilm sous forme cultivable mais de façon transitoire, la structure de population de E. coli en biofilm correspondant à celle de l'eau de source. Ces résultats confirment ceux de Personné (Personné et al., 2004) qui a réalisé une étude sur la formation de biofilm en conditions karstiques en laboratoire et in situ. Cependant son étude se limitait à la recherche d'entérobactéries cultivables. Ici des méthodes de détection des E. coli viables (y compris les VNC) et de l'ADN de E. coli ont été utilisées pour s'affranchir des limites des méthodes ciblant les organismes cultivables. En effet dans les biofilms karstiques les E. coli pourraient se maintenir en état de dormance, VNC ou sous forme de trace d'ADN. Bien que l'ADN soit une molécule stable qui peut rester intact pendant plusieurs années dans un environnement protégé (Hebsgaard et al. 2005; Nicholls 2005) nous montrons dans cette étude que son ADN ne semble pas s'y maintenir non plus, écartant l'hypothèse qu'elle persisterait sous forme viable non cultivable ou d'une disponibilité de son ADN pour des échanges génétiques horizontaux avec les bactéries du biofilm. Ces résultats suggèrent un décrochage des E. coli des biofilms qui pourrait être dû à des contraintes physiques sur les biofilms provoquées par les variations du débit intra-karstique comme cela a déjà été montré (Wang et al., 2011 ; Liu et Li, 2008), à une compétition avec la flore autochtone des biofilms ou un broutage par des protozoaires. Le suivi des E. coli dans les biofilms d'un hydrosystème karstique contaminé en permanence est nécessaire avant d'écarter l'hypothèse que cette espèce bactérienne pourrait persister en biofilm karstiques.

Les biofilms sont souvent considérés comme des lieux potentiels d'échange de gènes entre des bactéries allochtones et autochtones de l'environnement, cependant nous avons montré sur le site de Norville que les intégrons cliniques de classe 1 peuvent être intégrés aux biofilms mais n'y persistent pas. Ces résultats contredisent des études montrant la persistance de ces éléments génétiques mobiles dans des biofilms de rivières (Lehmann *et al.*, 2016), cependant l'abondance de l'intégron de classe 1 dans l'environnement est fortement corrélé à l'activité anthropique du site étudié (Jechalke et al., 2015 ; Borruso et al., 2016 ; Chen et al., 2015). En effet notre site d'étude est peu exposé à des contaminations d'origine humaine, l'intégron clinique de classe 1 n'a été que rarement détecté dans les souches de *E. coli* circulant dans les eaux ce qui pourrait expliquer la présence de cet élément génétique mobile dans une seule campagne de prélèvement de biofilm sur huit. Les études sur les éléments génétiques mobiles conférant antibiorésistance et/ou pouvoir pathogène aux bactéries doivent être approfondies, et menées sur des sites plus anthropisés, avant d'écarter totalement l'hypothèse de la persistance de l'intégron clinique de classe 1 dans les environnementaux.

L'étude de la formation de biofilms par *E. coli* en chemostat a mené à l'identification d'une communauté bactérienne chimiorganotrophe, résistant à la stérilisation par autoclave, enchâssée dans les pores de la craie. Ceci montre qu'il est primordial d'utiliser d'autres moyens de stérilisation que l'autoclave pour des études en cultures pures avec des supports en minéral poreux, par exemple l'irradiation. Cette communauté semble favoriser la formation de biofilm par *E. coli* sur la craie montrant l'intérêt de faire des études sur la coopération inter-espèces dans la formation de biofilms. Un pathogène peut ne pas avoir la capacité de former des biofilms par lui-même mais s'associer à des biofilms autochtones, possiblement pathogènes, de l'environnement de surface. De plus ces résultats suggèrent un transfert possible de bactéries au travers de la matrice du karst.

Cette étude permet de prendre en compte de l'échelle du bassin versant à l'échelle du gène la dynamique de contamination d'un hydrosystème karstique par *E. coli* dans ses eaux et ses biofilms. Un indicateur permettant d'anticiper la concentration de *E. coli* dans l'eau de source karstique, très simple à calculer et à utiliser a été développé. A la question de savoir si les biofilms peuvent être des réservoirs de pathogènes et d'éléments génétiques mobiles, notre étude montre que l'adhésion de *E. coli* et d'intégrons cliniques de classe 1 est possible mais est transitoire dans les biofilms karstiques sur un site exposé à des contaminations diffuses majoritairement d'origine bovine.

Matériel et méthodes -

Matériel et méthodes

Matériel et méthodes -

1. Mesure des paramètres hydrologiques

Les paramètres hydrologiques sont enregistrés en continue à la perte et la source du karst de Norville avec un pas de temps de 15 minutes par les sondes citées ci-après. Les données sont régulièrement transférées sur un ordinateur portable à l'aide des logiciels cités ci-après.

1.1.Enregistrement à la perte

Vélocimètre ISCO 2150 (#212F00587) – logiciel « Flowlink (4.16) », mesure la hauteur (ft), la vitesse (ft/s) et le débit (gpm)

Multiparamètre « Logger » (#002017E2) – logiciel « Harvest (2.2.7), mesure la turbidité (NTU), le niveau d'eau (m), la température (°C), la conductivité (μ S/cm)

Multiparamètre « CTD Diver » (R2455) – logiciel « Diver-Office 2016 », mesure la pression (cm_H₂O), la conductivité (mS/cm), la température (°C)

Sonde « TROLL 9500 » (#SN48219) – logiciel « W*In situ* 4 (4.5818) », mesure la température (°C), la pression à bord (kPa/cm²), la pression barométrique (hPa), la turbidité (NTU), la batterie (V), la conductivité (μ S/cm)

1.2. Enregistrement à la source

Vélocimètre ISCO 2150 (#212D01410) – logiciel « Flowlink (4.16) », mesure la hauteur (ft), la vitesse (ft/s) et le débit (gpm)

Multiparamètre « Logger » (#00201287) – logiciel « Harvest (2.2.7), mesure la turbidité (NTU), le niveau d'eau (m), la température (°C), la conductivité (μ S/cm)

Multiparamètre « STBD » (#3305) – logiciel « WinMemmoII (v0.1.85.010) », mesure la turbidité (NTU), la profondeur (m), la température (°C)

Sonde « TROLL 9500 » (#SN48220) – logiciel « WIn situ 4 (4.5818) », mesure la température (°C), la pression à bord (kPa/cm²), la pression barométrique (hPa), la turbidité (NTU), la batterie (V), la conductivité (μ S/cm)

1.3. Enregistrement de la hauteur de pluie

Une station de mesure de la pluviométrie est installée sur la plaine alluviale de la Seine, elle est équipée d'un pluviomètre « ISCO 674 Rain Gauge » (00201A07) – logiciel « Flowlink (4.16) », mesure la pluviométrie (mm).

2. Échantillonnage

2.1. Conditionnement des eaux

Ces échantillons ont été conditionnés dans des bidons de 1 L nettoyés au détergent, puis rincés plusieurs fois à l'eau distillée stérile.

Matériel et méthodes - Échantillonnage

2.2. Conditionnement des biofilms

Une fois prélevés les cylindres étaient plongés dans des tubes stériles contenant 40 mL de PBS (tampon phosphate salin) supplémentés en Tween 20 1% (v/v) stérile. Les échantillons étaient conservés à 4°C jusqu'à leur analyse microbiologique effectuée dans les 4 h qui ont suivi le prélèvement.

2.3. Dissociation des biofilms des supports

Dans le cadre de cette étude un protocole a été développé pour dissocier les biofilms adhérés aux supports en craie. Les cylindres exposés *in situ* et les pastilles du chemostat ont été rincés avec une solution de PBS supplémentée de Tween 20 (1% v/v), pour éliminer les microorganismes faiblement associés au biofilm. La craie rincée est ensuite raclée à l'aide d'un scalpel stérile, le biofilm est remis en suspension dans 40 mL d'eau physiologique.

Une centrifugation de la suspension à basse vitesse a été utilisée pour sédimenter les particules de craie pouvant nuire au dénombrement. Le surnageant a été filtré sur filtre $0,45\mu$ m et mis en culture sur un milieu chromogène sélectif 48 heures, au lieu de 24 heures habituellement recommandées, pour dénombrer et isoler spécifiquement les *E. coli*.

3. Milieux de culture et tampons

<u>Milieu LB</u> : 10 g.L⁻¹ de tryptone ; 10 g.L⁻¹ de NaCl ; 5 g.L⁻¹ d'extrait de levure (Miller, USA). Le milieu gélosé correspondant est additionné de 14 g.L⁻¹ d'agar technique en poudre (Difco, USA).

<u>Rapid'*E. coli*</u> : 10 g.L⁻¹ de peptones ; 5 g.L⁻¹ de NaCl ; 3 g.L⁻¹ d'extrait de levure ; 6 g.L⁻¹ de substrats chromogéniques sélectifs de la β -D glucuronidase et de la β -D galactosidase ; 13 g.L⁻¹ d'agar ; pH 7,2 (Biorad, USA)

PBS : 137mM de NaCl ; 2,7 mM de KCl ; 4,3mM de Na₂HPO₄ ; 1,4 mM de KH₂PO₄ ; pH 7,3

 $\underline{Milieu}\ \underline{A}$: eau du karst supplémentée à 6,66 % (m/v) en milieu LB ; 0,1 % (m/v) en glucose ; pH 7

 $\underline{\text{Milieu B}}$: eau du karst supplémentée à 2,5% (m/v) en milieu LB ; 0,01 % (m/v) en glucose ; pH 7

4. Analyses microbiologiques des échantillons

4.1. Dénombrements d'Escherichia coli cultivables

Les populations d'*E. coli* cultivables ont été dénombrées selon la norme préconisée par l'ISO AFNOR, ISO 9308-1. Après filtration des volumes et des dilutions appropriées sur une membrane de 0,45 μ m HA047 (Millipore, France), *E. coli* a été dénombrée sur le milieu Rapid'*E. coli* (Biorad, USA), après 24h d'incubation à 37°C.

Matériel et méthodes - Analyses microbiologiques des échantillons

4.2. Dénombrement des bactéries viables

Pour chaque dénombrement, le volume d'eau à filtrer a été déterminé en fonction de l'origine de l'échantillon et du niveau de contamination microbienne, pour ne pas dépasser un certain nombre d'évènements de fluorescence par membrane qui entrainerait l'arrêt de toute analyse par le système Chem*Scan*® RDI . Dans le cadre de cette étude nous avons choisi des dilutions de façons à obtenir entre 100 et 3000 évènements par membrane.

4.2.1 Marquage des bactéries viables par conservation d'une intégrité membranaire

Le marquage des cellules viables est réalisé selon le protocole TVC BIOBURDEN (Chemunex) pour la flore aérobie mésophile. Les marquages ont été réalisés en suivant les recommandations du fournisseur (AES Chemunex). Les échantillons d'eau sont filtrés sur une membrane de 25 mm de diamètre et de 0,4 µm de porosité (Chemfilter CB04, Chemunex). Le dénombrement des bactéries viables est réalisé par cytométrie en phase solide après un marquage des cellules effectué à l'aide de substrats spécifiques de la C8 esterase.

4.2.2. Cytométrie en phase solide (ChemScan®RDI)

Après filtration sur membrane, les bactéries marquées par fluorescence sont détectées par un balayage laser de la totalité de la surface de la membrane (25 mm de diamètre, 0,4 μ m de porosité) à l'aide d'un laser argon (7 μ m de diamètre, λ =488 nm, 25 mW) avec une résolution de 1 μ m. Trois photomultiplicateurs, dont la gamme de détection linéaire se situe dans le rouge (λ =575-625 nm), l'orange (λ = 540-585 nm) et le vert (λ = 500-530 nm), collectent la fluorescence émise. Plusieurs étapes de validation successives permettront ensuite de faire correspondre les évènements fluorescents à des bactéries. Les étapes de validation de chaque évènement fluorescent correspondant à des bactéries marquées reposent sur une analyse automatique du Chem*Scan*® RDI par un logiciel de discriminants primaires et secondaires. Dans le cadre de ce travail, aucune modification des paramètres n'a été effectuée. Les paramètres ont été fixés par le service de recherche et développement de AES Chemunex en fonction de l'usage du kit de marquage pour bactéries viables que nous utilisons.

Tableau 12: Amorces utilisées pour les PCR.

Spécificité de	Séquenc	Amorces	Séquences	Taille du	Référence
la séquence	е			fragmen	S
	amplifié			t	
	е			amplifié	
Typage de	chuA	ChuA.1b	5'-ATGGTACCGGACGAACCAAC-3'	288	Clermont
souche d' <i>E.</i>					et al.,
coli					2013
		ChuA.2	5'-TGCCGCCAGTACCAAAGACA-3'		Clermont
					et al.,
					2000
	ујА	YjaA.1b	5'-CAAACGTGAAGTGTCAGGAG-	211	Clermont
			3'		et al.,
					2013
		YjaA.2b	5'-AATGCGTTCCTCAACCTGTG-3'		Clermont
					et al.,
					2013
	tspE4.C2	TspE4C2.1	5'-CACTATTCGTAAGGTCATCC-3'	152	Clermont
		b			et al.,
					2013
		TspE4C2.2	5'-AGTTTATCGCTGCGGGTCGC-3'		Clermont
					et al.,
					2013
	arpA	AceK.f	5'-AACGCTATTCGCCAGCTTGC-3'	400	Clermont
					et al.,
					2013
		ArpA1.r	5'-TCTCCCCATACCGTACGCTA-3'		Clermont
					et al.,
					2004
Groupe E	arpA	ArpAgpE.f	5'-	301	Lescat et
			GATTCCATCTTGTCAAAATATGCC-		al., 2012
			3'		
		ArpAgpE.r	5'-		
			GAAAAGAAAAAGAATTCCCAAGA		
			G-3′		
Groupe C	trpA	trpAgpC.1	5'-AGTTTTATGCCCAGTGCGAG-3'	219	Lescat et
		trpAgpC.2	5'-TCTGCGCCGGTCACGCCC-3'		<i>al.,</i> 2012
β-D-	uida	uidA.R	5'-	600	MLST
glucuronidas			CCATCAGCACGTTATCGAATCCTT-		Pasteur
е			3'		
		uidA.F	5'-		
			CATTACGGCAAAGTGTGGGTCAAT		
			-3'		
Intégron de	intl1	Inti1.F	5'-GGCATCCAAGCAGCAAGC-3'	286	Nemergut
classe 1		Inti1.R	5'-GAGGATGCGAACCACTTCCAT-		et al.,
			3'		2004
E. coli	ybbW	401 F	5'-TGATTGGCAAAATCTGGCCG-3'		Walker <i>et</i>
			5'-GAAATCGCCCAAATCGCCAT-3'	1	al., 2017

5. Collection de souches d'*E. coli* 5.1. Isolement des souches

La collection de souches d'*E. coli* issues des eaux et biofilms environnementaux a été effectuée à partir des filtres en culture sur les milieux de dénombrement Rapid'*E. coli* (Biorad, USA) où les colonies violettes caractéristiques ont été prélevées, puis isolées sur milieu Rapid'*E. coli* (Biorad, USA) (24h 37°C). À partir d'une colonie caractéristique isolée, une amplification de la biomasse a été réalisée sur milieu LB (24h 37°c) afin de procéder à son stockage.

5.2. Stockage des souches

Une partie des souches d'*E. coli* isolées lors de ces travaux ont été stockées à l'aide du système Cryo-billes (AES, France). Une partie a été stockée sur glycérol par ajout de 660μ L d'une culture de la bactérie à stocker en LB broth incubée 24h à 37°C, à 340 μ L de glycérol 50% (v/v).

6. Extraction des acides nucléiques

Les échantillons d'eau et de biofilm ont été filtrés sur membrane durapore 0,45µm et conservés à -20°C avant l'extraction de l'ADN à l'aide du kit DNeasy®PowerLyzer®PowerSoil® (Qiagen).

L'ADN a été quantifié en utilisant un spectrophotomètre Thermo Scientific [™] NanoDrop 2000 (plateforme PRIMACEN).

7. Amplification génique de séquences d'ADN par PCR (réaction de polymérisation en chaine) et PCR en temps réel

7.1. PCR

La réaction de polymérisation en chaine en point finale, décrite par Saiki (Saiki *et al.*, 1998), permet l'amplification exponentielle d'une séquence d'ADN d'intérêt à partir d'amorces oligonucléotidiques spécifiques. À la suite d'une dénaturation initiale de 5 à 15 minutes à 94°C, l'amplification est réalisée lors de la succession de plusieurs cycles (25 à 45 cycles) avec les réactions de (i) dénaturation de l'ADN à 94°C, (ii) hybridation des amorces à une température spécifique de la séquence des amorces et (iii) la polymérisation de l'ADN polymérase thermo résistante à 72°C. Enfin à la suite de la succession des réactions au cours de cycles, une réaction d'élongation finale est réalisée à 72°C pendant 7 minutes. L'ADN polymérase utilisée est la GoTaq® DNA Polymerase (Promega) associée au tampon 5X Green GoTaq® Reaction Buffer (Promega) (tableaux 8, 9 et 10). Des thermocycleurs Gene Amp PCR System 6700 (Perkin Elmer, USA) ont permis d'effectuer ces PCR.

Cette technique a été utilisée pour (i) le typage des souches de *E. coli* et l'identification des clades d'*Escherichia* par la méthode Clermont (Clermont *et al.*, 2013) ; (ii) l'amplification du gène codant la β -D-glucuronidase (*uidA*) ; (iii) l'amplification du gène *IntI1* spécifique des intégrons de classe1. Les couples d'amorces, la composition des mélanges réactionnels et les programmes d'amplification utilisés dans cette étude sont présentés dans les tableaux 8, 9 et 10. Les réactions de PCR ont été réalisées à partir de 10 à 100ng d'ADN extrait ou en utilisant directement une suspension bactérienne lysée.

Matériel et méthodes - Amplification génique de séquences d'ADN par PCR (réaction de polymérisation en chaine) et PCR en temps réel

Séquence cible spécifique	Tampon 5X	dNTP	Taq polymerase	Amorces (chaque amorce)	Magnésium	BSA	Eau milliQ stérile
Typage souche <i>E. coli</i>	4	0,2	0,2	0,2 sauf paire arpA : 0,4			10,6
Différenciation A/C	4	0,2	0,2	0,2			12,2
Différenciation E/D	4	0,2	0,2	0,2			11,8
uida	4	0,2	0,2	0,2			12
intl1	10	1	0,25	1	1	1	31,5
Quantification <i>E. coli</i>	12,5 SYBR :	Supermix		1			9,5

Tableau 13: Composition des mixs utilisés pour les PCR.

Tableau 14: Conditions d'amplification utilisées pour les PCR.

Séquence cible	Dénaturation initiale à 94°C	Dénaturation à 94°C	Hybridation des amorces	Extension finale à 72°C	Nombre de cycles
Typage souche <i>E. coli</i>	5 min	5 s	20s à 59°C	5 min	30
Différenciation A/C	5 min	30 s	30 s à 55°C+30 s à 72°C	7 min	30
Différenciation E/D	5 min	5 s	20s à 59°C	5 min	30
uida	3 min	1 min	1 min à 50°C		25
intl1	0 min			15 sec	30
Quantification <i>E. coli</i>	2 min	15 s	20 s à 55- 70°C+ 45s à 72°C	2 min	40

Matériel et méthodes - Amplification génique de séquences d'ADN par PCR (réaction de polymérisation en chaine) et PCR en temps réel

7.2. PCR temps réel (rtPCR) ou PCR quantitative (qPCR)

La PCR temps réel a été utilisé pour quantifier l'ADN de *E. coli* dans les biofilms exposés *in situ* avec les amorces spécifiques du gène *ybbW* (Walker *et al.*, 2017), l'ADN bactérien total des biofilms et les integrons de classe 1. Ces deux dernières quantifications ont été réalisées par Olivier Barraud, Margaux Gaschet, Christophe Dagot, Marie-Cécile Ploy (UMR Inserm 1092–Université de Limoges ; Laboratoire de Bactériologie-Virologie-Hygiène – CHU Limoges).

La PCR en temps réel fait donc le suivi de la fluorescence émise pendant la réaction avec un indicateur de la production des amplicons durant chaque cycle, à l'opposé de la PCR quantitative conventionnelle où les amplicons ne sont détectés qu'à la toute fin du processus.

L'augmentation du signal fluorescent est directement proportionnelle à la quantité d'amplicons générés durant la réaction de PCR. En observant la quantité de fluorescence émise à chaque cycle, il devient possible de suivre la réaction PCR durant sa phase exponentielle où la première augmentation significative dans la quantité d'amplicons est en corrélation directe avec la quantité initiale de la matrice originale cible (template).

Le cycle de PCR commence par 2 minutes à 95°C suivies par 40 cycles à 95°C de 15s, 55 cycles à 70°C de 20 s et 72°C de 45s. L'extension finale est de 2 minutes à 72°C.

Gamme étalon qPCR ybbW

Un fragment de 210 pb du gène *ybbW* d'*E. coli* (souche K12) a été amplifié par PCR afin de réaliser une gamme étalon permettant la quantification des *E. coli* par qPCR (Walker *et al.*, 2017). Les amplicons ont été clonés selon le principe du « T/A cloning « à l'aide du vecteur pGEM-T® Easy Vector (3 kpb, Promega). Le principe du clonage repose sur le fait que les Taq polymérases ajoutent une adénine en extrémité 3' des amplicons ; ce qui permet de les cloner dans un vecteur possédant une thymine à chaque extrémité 3' du vecteur. Après amplification PCR, les amplicons (10 ng) sont ajoutés à 50 ng de vecteur pGEM-T® Easy (rapport molaire 3:1). La ligation est effectuée en présence de T4 DNA Ligase (3 unités Weiss) à 4°C pendant 12 heures. La transformation de cellules d'*E. coli* DH5 rendues compétentes en présence de CaCl2 (50 mM) est ensuite effectuée avec la totalité du mélange de ligation. La sélection des bactéries transformées est effectuée en présence du gène d'intérêt dans les plasmides est finalement confirmée par PCR en utilisant des amorces ciblant le vecteur pGEM-T® Easy (amorces T7 etSP6, protocole pGEM®-T and pGEM®-TEasy Vector Systems, Promega).

7.3. Analyse électrophorétique des amplicons

L'agarose (de 1 à 3% (p/v)) est dissous dans un tampon TAE 1X (20mM Tris-acétate ; 0,5mM EDTA ; pH 8) additionné de BET à 0,1 μ g.mL. La migration électrophorétique s'effectue dans un tampon de migration (TAE 1X) sous une tension de 50 ou 100 V/cm. dans une cuve à électrophorèse Run One electrophoresis Cell (Embi Tec, USA). L'ADN amplifié est ensuite visualisé sous eclairage aux UV (λ =312 nm) avec un analyseur d'image (Fisher Biotec, Quantum STA ®) grâce au BET qui lui confere une fluorescence spécifique.

Matériel et méthodes - Amplification génique de séquences d'ADN par PCR (réaction de polymérisation en chaine) et PCR en temps réel

8. Séquençage des communautés bactérienens en biofilms

Les régions V3-V4 ont été amplifiées par, Dr Scot Dowd (Mr DNA, Shallowater, Texas) avec les amorces 341F 785r (Klindworth *et al.*, 2013).

9. Imagerie des biofilms

9.1.Imagerie en microscope confocale

Les biofilms bactériens formés sur les cylindres de craie exposé *In situ* ont été marqués avec les sondes SYTO^M9 (Thermo Fisher Scientific), marqueur fluorescent de l'ADN; concanavalin A associée au fluorochrome Alexa Fluor^M 633 marqueur des glycoconjugués présent dans la matrice extra cellulaire des biofilms et Colinsitu (GAG-ACT-CAA-GAT-TGC-CAG-TAT-CAG) (Eurogentec) associée à un fluorochrome. Le protocole de triple marquage a été mis au point après avoir testé différentes conditions de marquage. Trois concentrations différentes ont été testées pour chaque marqueur : 20 μ M, 40 μ M et 60 μ M pour le SYTO 9; 0,01 mg/mL, 0,1 mg/mL et 0,2 mg/mL pour la concanavalin A; et 20 μ M, 5 μ M et 10 μ M pour colinsitu. Trois temps de marquage pour chaque marqueur ont été testés 1h, 1h30 et 12h.

Le protocole de marquage retenu est :

- Immersion des biofilms 1 h à 42°C dans une solution de Colinsitu diluée (400µL de col*In situ*, 2 mL de TE buffer),
- Rinçage par immersion rapide dans de l'eau miliQ stérile
- Immersion 1h30 dans une solution de Syto 9 (12µL dans 3mL PBS pH 8),
- Rinçage par immersion rapide dans de l'eau miliQ stérile
- Immersion dans une solution de concanavalin A contenant $12\mu L$ de solution de concanavalin (1mg/mL dans eau mQ) dans $3\mu L$ d'eau mQ 1h30
- Rinçage par immersion rapide dans de l'eau miliQ stérile
- Observation immédiate au microscope.

Les images des biofilms bactériens ont été acquises avec un système de macroscopie confocal Leica TCS LSI (Leica Microsystems, Mannheim, Germany) avec les caractéristiques suivantes : objectif Plan APO 2,0x (ouverture numérique 0,2), taille d'image (1024*1024 pixels), piles d'images en z ou z-stack (intervalle entre chaque image de 5 µm).

Excitation de la Concanavalin A avec un laser 635 nm – bande d'émission 650-700 nm, excitation de colinsitu avec un laser 532 nm – Bande d'émission 550-600 nm, excitation du Syto9 avce un laser 488 nm - bande d'émission 500-550. L'acquisition des 3 marqueurs a été effectuée de manière séquentielle afin d'éviter tout chevauchement spectral.

Les images de biofilms bactériens triplement marquées ont été déconvoluées à l'aide du logiciel Huygens (SVI, Hilversum, The Netherlands) et ajustées avce le logiciel ImageJ (NIH, Bethesda, USA). Matériel et méthodes - Imagerie des biofilms

9.2. Imagerie en microscope electronique à balayage

Les pastilles ou les cylindres de craies sont immergées à 3 reprises dans le tampon cacodylate 0,05 M (8,16 g/L de cacodylate de sodium tri-hydraté (sigma C0250) titré à pH 7,4 avec de l'acide sulfurique H2SO4 0,1M) puis immédiatement transférés dans la solution de fixation lysine/glutaraldéhyde (2.5 mL solution de glutaraldéhyde à 2,5 % (à partir d'une solution mère à 25 % en solution aqueuse (Sigma G5852)) ; 0.73g lysine à une c ncentrati n de 50mM ; compléter avec du tampon cacodylate 0,05 M pour atteindre un volume de 100mL) pendant 90 min. À l'issue de cette première étape de fixation les échantillons sont incubés dans la solution mère à 25 % solution aqueuse (sigma G5852)) compléter avec du tampon cacodylate 0,05 M pour atteindre un volume de 100mL) pendant 90 min. À l'issue de cette première étape de fixation les échantillons sont incubés dans la solution mère à 25 % solution aqueuse (sigma G5852)) compléter avec du tampon cacodylate 0,05 M pour atteindre un volume de 100mL) pendant au moins 24h. Puis les échantillons sont rincés avec la solution A, avant d'être déshydratés après passages successifs dans différents bains d'éthanol à 50 %, 75 % puis 85 % pendant 20 min, et 100 % pendant 40 min. Les échantillons seront finalement incubés dans un bain d'héxaméthyldisilazane pure pendant 20 min avant d'être séchés sous hotte pendant au moins 2h (jusqu'à 12h). Les échantillons sont ensuite métallisés à l'or palladium avant d'être observés au microscope électronique à balayage.

10. Tests statistiques

Les tests statistiques ont été réalisés à l'aide du logiciel R studio. Le test de comparaison des proportions a été utilisé pour comparer les structures des populations de *E. coli*, le test du χ^2 pour comparer les concentrations dans différents échantillons et le test des résidus du χ^2 pour comparer les structures des populations séquencées dans les biofilms.

Matériel et méthodes -

Références bibliographiques -

Références bibliographiques

A

- Abberton, C.L., Bereschenko, L., Wielen, P.W.J.J. van der, Smith, C.J., 2016. Survival, Biofilm Formation, and Growth Potential of Environmental and Enteric Escherichia coli in Drinking Water Microcosms. Appl. Environ. Microbiol. AEM.01569-16. https://doi.org/10.1128/AEM.01569-16
- Aeschbach-Hertig, W., Gleeson, T., 2012. Regional strategies for the accelerating global problem of groundwater depletion. Nature Geoscience 5, 853–861. <u>https://doi.org/10.1038/ngeo1617</u>
- Ahmed, W., Goonetilleke, A., Powell, D., Gardner, T., 2009. Evaluation of multiple sewageassociated Bacteroides PCR markers for sewage pollution tracking. Water Research, Crossvalidation of detection methods for pathogens and fecal indicators 43, 4872–4877. <u>https://doi.org/10.1016/j.watres.2009.08.042</u>
- Ahmed, W., Goonetilleke, A., Gardner, T., 2010. Human and bovine adenoviruses for the detection of source-specific fecal pollution in coastal waters in Australia. Water Research, Shifting paradigms in the assessment of recreational water quality 44, 4662–4673. <u>https://doi.org/10.1016/j.watres.2010.05.017</u>
- Alonso, C.A., González-Barrio, D., Tenorio, C., Ruiz-Fons, F., Torres, C., 2016. Antimicrobial resistance in faecal Escherichia coli isolates from farmed red deer and wild small mammals. Detection of a multiresistant E. coli producing extended-spectrum beta-lactamase. Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases 45, 34–39. https://doi.org/10.1016/j.cimid.2016.02.003
- Arumugam, M., Raes, J., Pelletier, E., Le Paslier, D., Yamada, T., Mende, D.R., Fernandes, G.R., Tap, J., Bruls, T., Batto, J.-M., Bertalan, M., Borruel, N., Casellas, F., Fernandez, L., Gautier, L., Hansen, T., Hattori, M., Hayashi, T., Kleerebezem, M., Kurokawa, K., Leclerc, M., Levenez, F., Manichanh, C., Nielsen, H.B., Nielsen, T., Pons, N., Poulain, J., Qin, J., Sicheritz-Ponten, T., Tims, S., Torrents, D., Ugarte, E., Zoetendal, E.G., Wang, J., Guarner, F., Pedersen, O., de Vos, W.M., Brunak, S., Doré, J., MetaHIT Consortium (additional Members), Antolín, M., Artiguenave, F., Blottiere, H.M., Almeida, M., Brechot, C., Cara, C., Chervaux, C., Cultrone, A., Delorme, C., Denariaz, G., Dervyn, R., Foerstner, K.U., Friss, C., van de Guchte, M., Guedon, E., Haimet, F., Huber, W., van Hylckama-Vlieg, J., Jamet, A., Juste, C., Kaci, G., Knol, J., Kristiansen, K., Lakhdari, O., Layec, S., Le Roux, K., Maguin, E., Mérieux, A., Melo Minardi, R., M'rini, C., Muller, J., Oozeer, R., Parkhill, J., Renault, P., Rescigno, M., Sanchez, N., Sunagawa, S., Torrejon, A., Turner, K., Vandemeulebrouck, G., Varela, E., Winogradsky, Y., Zeller, G., Weissenbach, J., Ehrlich, S.D., Bork, P., 2011. Enterotypes of the human gut microbiome. Nature 473, 174–180. <u>https://doi.org/10.1038/nature09944</u>
- Askari Badouei, M., Jajarmi, M., Mirsalehian, A., 2015. Virulence profiling and genetic relatedness of Shiga toxin-producing Escherichia coli isolated from humans and ruminants. Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases 38, 15–20. https://doi.org/10.1016/j.cimid.2014.11.005

- Aubertheau, E., Stalder, T., Mondamert, L., Ploy, M.-C., Dagot, C., Labanowski, J., 2017. Impact of wastewater treatment plant discharge on the contamination of river biofilms by pharmaceuticals and antibiotic resistance. Science of The Total Environment 579, 1387–1398. https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2016.11.136
- Aujoulat, F., Roger, F., Bourdier, A., Lotthé, A., Lamy, B., Marchandin, H., Jumas-Bilak, E., Aujoulat, F., Roger, F., Bourdier, A., Lotthé, A., Lamy, B., Marchandin, H., Jumas-Bilak, E., 2012. From Environment to Man: Genome Evolution and Adaptation of Human Opportunistic Bacterial Pathogens. Genes 3, 191–232. <u>https://doi.org/10.3390/genes3020191</u>

В

- Bain, R., Cronk, R., Hossain, R., Bonjour, S., Onda, K., Wright, J., Yang, H., Slaymaker, T., Hunter, P., Prüss-Ustün, A., Bartram, J., n.d., 2014. Global assessment of exposure to faecal contamination through drinking water based on a systematic review. Tropical Medicine & International Health 19, 917–927. <u>https://doi.org/10.1111/tmi.12334</u>
- Balzer, M., Witt, N., Flemming, H.-C., Wingender, J., 2010. Faecal indicator bacteria in river biofilms. Water Sci Technol 61, 1105–1111. <u>https://doi.org/10.2166/wst.2010.022</u>
- Bakalowicz, M., 1975. Géochimie des eaux karstiques et karstification. *Annales de Spéléologie*, 30 (4), 581-589.
- Bakalowicz, M., 1995. La zone d'infiltration des aquifères karstiques. Méthodes d'étude. Structure et fonctionnement. Hydrogéologie, 4, 3-21.
- Bakalowicz M., 1999. Connaissance et gestion des ressources en eau souterraines dans les régions karstiques. Guide technique n°3, Lyon, Agence de l'eau Rhône-Méditerranée-Corse, 44 p.
- Bakalowicz, M., 2005. Karst groundwater: a challenge for new resources. Hydrogeology Journal 13, 148–160. <u>https://doi.org/10.1007/s10040-004-0402-9</u>
- Balcázar, J.L., Subirats, J., Borrego, C.M., 2015. The role of biofilms as environmental reservoirs of antibiotic resistance. Front. Microbiol. 6. <u>https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.01216</u>
- Banning, N., Toze, S., Mee, B.J., 2003. Persistence of biofilm-associated Escherichia coli and Pseudomonas aeruginosa in groundwater and treated effluent in a laboratory model system. Microbiology 149, 47–55. <u>https://doi.org/10.1099/mic.0.25938-0</u>
- Beaudeau, P., Payment, P., Bourderont, D., Mansotte, F., Boudhabay, O., Laubies, B., Verdiere, J., 1999. A time series study of anti-diarrheal drug sales and tap-water quality. International Journal of Environmental Health Research 9, 293–311. https://doi.org/10.1080/09603129973092
- Beaudeau, P., Zeghnoun, A., Corso, M., Lefranc, A., Rambaud, L., 2014. A time series study of gastroenteritis and tap water quality in the Nantes area, France, 2002–2007. Journal of Exposure Science & Environmental Epidemiology 24, 192–199. <u>https://doi.org/10.1038/jes.2013.5</u>

- Bellucci, M., Bernet, N., Harmand, J., Godon, J.-J., Milferstedt, K., 2015. Invasibility of resident biofilms by allochthonous communities in bioreactors. Water Research 81, 232–239. https://doi.org/10.1016/j.watres.2015.05.051
- Bender, J.M., Li, F., Adisetiyo, H., Lee, D., Zabih, S., Hung, L., Wilkinson, T.A., Pannaraj, P.S., She, R.C., Bard, J.D., Tobin, N.H., Aldrovandi, G.M., 2018. Quantification of variation and the impact of biomass in targeted 16S rRNA gene sequencing studies. Microbiome 6, 155. <u>https://doi.org/10.1186/s40168-018-0543-z</u>
- Bernhard, A.E., Field, K.G., 2000. 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. <u>https://doi.org/10.1128/AEM.66.4.1587-1594.2000</u>
- 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. <u>https://doi.org/10.1128/AEM.00698-13</u>
- Binh, C.T.T., Heuer, H., Kaupenjohann, M., Smalla, K., 2009. Diverse aadA gene cassettes on class 1 integrons introduced into soil via spread manure. Research in Microbiology 160, 427–433. https://doi.org/10.1016/j.resmic.2009.06.005
- Bjarnsholt, T., Alhede, Maria, Alhede, Morten, Eickhardt-Sørensen, S.R., Moser, C., Kühl, M., Jensen, P.Ø., Høiby, N., 2013. The in vivo biofilm. Trends in Microbiology 21, 466–474. https://doi.org/10.1016/j.tim.2013.06.002
- Blyton, M.D.J., Pi, H., Vangchhia, B., Abraham, S., Trott, D.J., Johnson, J.R., Gordon, D.M., 2015. The genetic structure and antimicrobial resistance of Escherichia coli and cryptic clades in birds with diverse human associations. Appl. Environ. Microbiol. AEM.00861-15. <u>https://doi.org/10.1128/AEM.00861-15</u>
- Borruso, L., Harms, K., Johnsen, P.J., Nielsen, K.M., Brusetti, L., 2016. Distribution of class 1 integrons in a highly impacted catchment. Science of The Total Environment 566–567, 1588–1594. <u>https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2016.06.054</u>
- Branda, S.S., Vik, Å., Friedman, L., Kolter, R., 2005. Biofilms: the matrix revisited. Trends in Microbiology 13, 20–26. <u>https://doi.org/10.1016/j.tim.2004.11.006</u>
- Brooks, Y.M., Baustian, M.M., Baskaran, M., Ostrom, N.E., Rose, J.B., 2016. Historical Associations of Molecular Measurements of Escherichia coli and Enterococci to Anthropogenic Activities and Climate Variables in Freshwater Sediment Cores. Environ. Sci. Technol. 50, 6902–6911. <u>https://doi.org/10.1021/acs.est.6b01372</u>
- Bucci, A., Petrella, E., Naclerio, G., Allocca, V., Celico, F., 2015. Microorganisms as contaminants and natural tracers: a 10-year research in some carbonate aquifers (southern Italy). Environ Earth Sci 74, 173–184. <u>https://doi.org/10.1007/s12665-015-4043-1</u>
- Buckerfield, S.J., Waldron, S., Quilliam, R.S., Naylor, L.A., Li, S., Oliver, D.M., 2019. How can we improve understanding of faecal indicator dynamics in karst systems under changing climatic, population, and land use stressors? – Research opportunities in SW China. Science of The Total Environment 646, 438–447. <u>https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.07.292</u>
- Butscher, C., Auckenthaler, A., Scheidler, S., Huggenberger, P., 2011. Validation of a Numerical Indicator of Microbial Contamination for Karst Springs. Ground Water 49, 66–76. https://doi.org/10.1111/j.1745-6584.2010.00687.x
- Byrne-Bailey, K.G., Gaze, W.H., Zhang, L., Kay, P., Boxall, A., Hawkey, P.M., Wellington, E.M.H., 2011. Integron Prevalence and Diversity in Manured Soil. Appl Environ Microbiol 77, 684– 687. <u>https://doi.org/10.1128/AEM.01425-10</u>

C

- Cambray, G., Guerout, A.-M., Mazel, D., 2010. Integrons. Annu. Rev. Genet. 44, 141–166. https://doi.org/10.1146/annurev-genet-102209-163504
- Capitani, G., Eidam, O., Glockshuber, R., Grütter, M.G., 2006. Structural and functional insights into the assembly of type 1 pili from Escherichia coli. Microbes and Infection 8, 2284–2290. https://doi.org/10.1016/j.micinf.2006.03.013
- Cardoso, F., Shelton, D., Sadeghi, A., Shirmohammadi, A., Pachepsky, Y., Dulaney, W., 2012. Effectiveness of vegetated filter strips in retention of Escherichia coli and Salmonella from swine manure slurry. Journal of Environmental Management 110, 1–7. <u>https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2012.05.012</u>
- Carlos, C., Pires, M.M., Stoppe, N.C., Hachich, E.M., Sato, M.I., Gomes, T.A., Amaral, L.A., Ottoboni, L.M., 2010. Escherichia coli phylogenetic group determination and its application in the identification of the major animal source of fecal contamination. BMC Microbiology 10, 161. <u>https://doi.org/10.1186/1471-2180-10-161</u>
- Chabaud, S., Andres, Y., Lakel, A., Le Cloirec, P., 2006. Bacteria removal in septic effluent: Influence of biofilm and protozoa. Water Research 40, 3109–3114. <u>https://doi.org/10.1016/j.watres.2006.06.008</u>
- Chen, B., Liang, X., Nie, X., Huang, X., Zou, S., Li, X., 2015. The role of class I integrons in the dissemination of sulfonamide resistance genes in the Pearl River and Pearl River Estuary, South China. Journal of Hazardous Materials, Advances in Analysis, Treatment Technologies, and Environmental Fate of Emerging Contaminants 282, 61–67. https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2014.06.010
- Cheng J., Palva A.M., de Vos W.M., Satokari R., 2013. Contribution of the intestinal microbiota to human health: from birth to 100 years of age. Curr Top Microbiol Immunol 358, 323-346.

- Chow, L., Waldron, L., Gillings, M., 2015. Potential impacts of aquatic pollutants: sub-clinical antibiotic concentrations induce genome changes and promote antibiotic resistance. Front. Microbiol. 6. <u>https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00803</u>
- Christensen, B.B., Haagensen, J.A.J., Heydorn, A., Molin, S., 2002. Metabolic Commensalism and Competition in a Two-Species Microbial Consortium. Appl. Environ. Microbiol. 68, 2495–2502. <u>https://doi.org/10.1128/AEM.68.5.2495-2502.2002</u>
- Claesson, M.J., Jeffery, I.B., Conde, S., Power, S.E., O'Connor, E.M., Cusack, S., Harris, H.M.B., Coakley, M., Lakshminarayanan, B., O'Sullivan, O., Fitzgerald, G.F., Deane, J., O'Connor, M., Harnedy, N., O'Connor, K., O'Mahony, D., van Sinderen, D., Wallace, M., Brennan, L., Stanton, C., Marchesi, J.R., Fitzgerald, A.P., Shanahan, F., Hill, C., Ross, R.P., O'Toole, P.W., 2012. Gut microbiota composition correlates with diet and health in the elderly. Nature 488, 178–184. <u>https://doi.org/10.1038/nature11319</u>
- Clermont, O., Bonacorsi, S., Bingen, E., 2000. Rapid and Simple Determination of the Escherichia coli Phylogenetic Group. Appl Environ Microbiol 66, 4555–4558.
- Clermont, O., Lescat, M., O'Brien, C.L., Gordon, D.M., Tenaillon, O., Denamur, E., 2008. Evidence for a human-specific Escherichia coli clone. Environmental Microbiology 10, 1000–1006. https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2007.01520.x
- Clermont, O., Christenson, J.K., Denamur, E., Gordon, D.M., 2013. The Clermont *Escherichia coli* phylo-typing method revisited: improvement of specificity and detection of new phylo-groups: A new *E. coli* phylo-typing method. Environmental Microbiology Reports 5, 58–65. https://doi.org/10.1111/1758-2229.12019
- Cooper, I.R., Taylor, H.D., Hanlon, G.W., 2007. Virulence traits associated with verocytotoxigenic Escherichia coli O157 recovered from freshwater biofilms. Journal of Applied Microbiology 102, 1293–1299. <u>https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2006.03178.x</u>
- Córdova, M., Carrillo-Rojas, G., Crespo, P., Wilcox, B., Célleri, R., 2015. Evaluation of the Penman-Monteith (FAO 56 PM) Method for Calculating Reference Evapotranspiration Using Limited Data. Mountain Research and Development 35, 230–239. <u>https://doi.org/10.1659/MRD-JOURNAL-D-14-0024.1</u>
- Costerton, J. W., Stewart, P. S., & Greenberg, E. P., 1999. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. Science, 284(5418), 1318-1322.
- Coyte, K.Z., Schluter, J., Foster, K.R., 2015. The ecology of the microbiome: Networks, competition, and stability. Science 350, 663–666. <u>https://doi.org/10.1126/science.aad2602</u>
- Craun, G.F., Brunkard, J.M., Yoder, J.S., Roberts, V.A., Carpenter, J., Wade, T., Calderon, R.L., Roberts, J.M., Beach, M.J., Roy, S.L., 2010. Causes of Outbreaks Associated with Drinking Water in the United States from 1971 to 2006. Clin Microbiol Rev 23, 507–528. https://doi.org/10.1128/CMR.00077-09
- Croxen, M.A., Finlay, B.B., 2010. Molecular mechanisms of *Escherichia coli* pathogenicity. Nature Reviews Microbiology 8, 26–38. <u>https://doi.org/10.1038/nrmicro2265</u>

Culotti, A., Packman, A.I., 2014. Pseudomonas aeruginosa Promotes Escherichia coli Biofilm Formation in Nutrient-Limited Medium. PLoS ONE 9, e107186. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0107186

D

- Danese, P.N., Pratt, L.A., Dove, S.L., Kolter, R., 2000. The outer membrane protein, Antigen 43, mediates cell-to-cell interactions within Escherichia coli biofilms. Molecular Microbiology 37, 424–432. <u>https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2000.02008.x</u>
- Davis, R.K., Hamilton, S., Brahana, J.V., 2005. Escherichia coli survival in mantled karst springs and streams, northwest Arkansas Ozarks, USA. JAWRA Journal of the American Water Resources Association 41, 1279–1287.
- De Stefano, L., Hernández-Mora, N., 2012. Water Planning and Management After the EU Water Framework Directive, in: Llamas, M. (Ed.), Water, Agriculture and the Environment in Spain. CRC Press, pp. 35–44. <u>https://doi.org/10.1201/b13078-5</u>
- De Waele, J., Follesa, R., 2003. Human impact on karst: the example of Lusaka (Zambia). International Journal of Speleology 32. <u>http://dx.doi.org/10.5038/1827-806X.32.1.5</u>
- Delahaye, D., 2003. Du ruissellement érosif à la crue turbide en domaine de grande culture: analyse spatiale d'un phénomène complexe. Bulletin de l'Association de géographes français: Geographies 80, 287–301.
- Doughari, H.J., Ndakidemi, P.A., Human, I.S., Benade, S., 2011. The ecology, biology and pathogenesis of Acinetobacter spp.: an overview. Microbes Environ. 26, 101–112.
- Drapcho, C. M., & Hubbs, A. K. B. (2002). Fecal coliform concentration in runoff from fields with applied dairy manure.
- Dreybrodt, W., 1999. Chemical kinetics, speleothem growth and climate. Boreas 28, 347–356. https://doi.org/10.1111/j.1502-3885.1999.tb00224.x
- Dreybrodt, W., Romanov, D., Gabrovsek, F., 2002. Karstification below dam sites: a model of increasing leakage from reservoirs. *Environmental Geology* 42, 518–524. https://doi.org/10.1007/s00254-001-0514-7
- Dura, G., Pándics, T., Kádár, M., Krisztalovics, K., Kiss, Z., Bodnár, J., Asztalos, Á., Papp, E., 2010. Environmental health aspects of drinking water-borne outbreak due to karst flooding: case study. Journal of Water and Health 08, 513. <u>https://doi.org/10.2166/wh.2010.099</u>
- Duran, L., 2015. Approches physique, conceptuelle et statistique du fonctionnement hydrologique d'un karst sous couverture. Thèse de doctorat en sciences de la Terre. Rouen

- Dussart, L., Dupont, J.-P., Zimmerlin, I., Lacroix, M., Saiter, J.M., Junter, G.-A., Jouenne, T., 2003. Occurrence of sessile Pseudomonas oryzihabitans from a karstified chalk aquifer. Water Research 37, 1593–1600. <u>https://doi.org/10.1016/S0043-1354(02)00555-9</u>
- Dussart-Baptista, L., Massei, N., Dupont, J.-P., Jouenne, T., 2003. Transfer of bacteria-contaminated particles in a karst aquifer: evolution of contaminated materials from a sinkhole to a spring. Journal of Hydrology 284, 285–295. <u>https://doi.org/10.1016/j.jhydrol.2003.08.007</u>
- Dussart-Baptista, L., Bodilis, J., Barray, S., Frébourg, N., Fournier, M., Dupont, J.-P., Jouenne, T., 2007. Recurrent recovery of Pseudomonas oryzihabitans strains in a karstified chalk aquifer. Water Research 41, 111–117. <u>https://doi.org/10.1016/j.watres.2006.10.007</u>
- Dwivedi, D., Mohanty, B.P., Lesikar, B.J., 2016. Impact of the Linked Surface Water-Soil Water-Groundwater System on Transport of E. coli in the Subsurface. Water Air Soil Pollut 227, 351. https://doi.org/10.1007/s11270-016-3053-2

E

- Edberg, S.C., Rice, E.W., Karlin, R.J., Allen, M.J., 2000. Escherichia coli: the best biological drinking water indicator for public health protection. Journal of Applied Microbiology 88, 106S-116S. <u>https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2000.tb05338.x</u>
- Elias, S., Banin, E., 2012. Multi-species biofilms: living with friendly neighbors. FEMS Microbiology Reviews 36, 990–1004. <u>https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2012.00325.x</u>
- Engström, E., Thunvik, R., Kulabako, R., Balfors, B., 2015. Water Transport, Retention, and Survival of Escherichia coli in Unsaturated Porous Media: A Comprehensive Review of Processes, Models, and Factors. Critical Reviews in Environmental Science and Technology 45, 1–100. <u>https://doi.org/10.1080/10643389.2013.828363</u>
- Ershadi, A., McCabe, M.F., Evans, J.P., Wood, E.F., 2015. Impact of model structure and parameterization on Penman–Monteith type evaporation models. Journal of Hydrology 525, 521–535. <u>https://doi.org/10.1016/j.jhydrol.2015.04.008</u>
- Escherich, T. 1885. Die Darmbakterien des Neugeborenen und Säuglings. I, II. Fortschritte der Medizin, **3**, 515–22 ; 547–54.
- Escobar-Páramo, P., Grenet, K., Menac'h, A.L., Rode, L., Salgado, E., Amorin, C., Gouriou, S., Picard, B., Rahimy, M.C., Andremont, A., Denamur, E., Ruimy, R., 2004. Large-Scale Population Structure of Human Commensal Escherichia coli Isolates. Appl. Environ. Microbiol. 70, 5698–5700. <u>https://doi.org/10.1128/AEM.70.9.5698-5700.2004</u>
- Escobar-Páramo, P., Menac'h, A.L., Gall, T.L., Amorin, C., Gouriou, S., Picard, B., Skurnik, D., Denamur, E., 2006. Identification of forces shaping the commensal Escherichia coli genetic structure by comparing animal and human isolates. Environmental Microbiology 8, 1975–1984. https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2006.01077.x

187

-

- Farkas, A., Butiuc-Keul, A., Ciatarâş, D., Neamţu, C., Crăciunaş, C., Podar, D., Drăgan-Bularda, M., 2013. Microbiological contamination and resistance genes in biofilms occurring during the drinking water treatment process. Science of The Total Environment 443, 932–938. https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2012.11.068
- Farnleitner, A.H., Wilhartitz, I., Ryzinska, G., Kirschner, A.K.T., Stadler, H., Burtscher, M.M., Hornek, R., Szewzyk, U., Herndl, G., Mach, R.L., 2005. Bacterial dynamics in spring water of alpine karst aquifers indicates the presence of stable autochthonous microbial endokarst communities. Environmental Microbiology 7, 1248–1259. <u>https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2005.00810.x</u>
- Field, K.G., Samadpour, M., 2007. Fecal source tracking, the indicator paradigm, and managing water quality. Water Research, Identifying Sources of Fecal Pollution 41, 3517–3538. <u>https://doi.org/10.1016/j.watres.2007.06.056</u>
- Flemming, H.-C., Wingender, J., 2010. The biofilm matrix. Nature Reviews Microbiology 8, 623–633. <u>https://doi.org/10.1038/nrmicro2415</u>
- Flemming, H.-C., Wingender, J., Szewzyk, U., Steinberg, P., Rice, S.A., Kjelleberg, S., 2016. Biofilms: an emergent form of bacterial life. Nature Reviews Microbiology 14, 563–575. https://doi.org/10.1038/nrmicro.2016.94
- Flores Ribeiro, A., Laroche, E., Hanin, G., Fournier, M., Quillet, L., Dupont, J.-P., Pawlak, B., 2012. Antibiotic-resistant Escherichia coli in karstic systems: a biological indicator of the origin of fecal contamination? FEMS Microbiology Ecology 81, 267–280. <u>https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2012.01382.x</u>
- Foley, J.A., Ramankutty, N., Brauman, K.A., Cassidy, E.S., Gerber, J.S., Johnston, M., Mueller, N.D., O'Connell, C., Ray, D.K., West, P.C., Balzer, C., Bennett, E.M., Carpenter, S.R., Hill, J., Monfreda, C., Polasky, S., Rockström, J., Sheehan, J., Siebert, S., Tilman, D., Zaks, D.P.M., 2011. Solutions for a cultivated planet. Nature 478, 337–342. https://doi.org/10.1038/nature10452
- Fong, T.-T., Griffin, D.W., Lipp, E.K., 2005. Molecular Assays for Targeting Human and Bovine Enteric Viruses in Coastal Waters and Their Application for Library-Independent Source Tracking. Appl. Environ. Microbiol. 71, 2070–2078. <u>https://doi.org/10.1128/AEM.71.4.2070-2078.2005</u>
- Foppen, J.W.A., Schijven, J.F., 2006a. Evaluation of data from the literature on the transport and survival of Escherichia coli and thermotolerant coliforms in aquifers under saturated conditions. Water Research 40, 401–426. <u>https://doi.org/10.1016/j.watres.2005.11.018</u>
- Foppen, J.W.A., Schijven, J.F., 2006b. Evaluation of data from the literature on the transport and survival of Escherichia coli and thermotolerant coliforms in aquifers under saturated conditions. Water Research 40, 401–426. <u>https://doi.org/10.1016/j.watres.2005.11.018</u>

- Foppen, J.W.A., van Herwerden, M., Kebtie, M., Noman, A., Schijven, J.F., Stuyfzand, P.J., Uhlenbrook, S., 2008. Transport of Escherichia coli and solutes during waste water infiltration in an urban alluvial aquifer. Journal of Contaminant Hydrology 95, 1–16. <u>https://doi.org/10.1016/j.jconhyd.2007.07.005</u>
- Ford, D.C., Williams, P., 2007. Karst Hydrogeology and Geomorphology. John Wiley & Sons Ltd., Chichester, United Kingdom. 562 p.
- Ford, D., Williams, P., 2013. Introduction to Karst, in: Karst Hydrogeology and Geomorphology. Wiley-Blackwell, pp. 1–8. <u>https://doi.org/10.1002/9781118684986.ch1</u>
- Foster, K.R., Bell, T., 2012. Competition, Not Cooperation, Dominates Interactions among Culturable Microbial Species. Current Biology 22, 1845–1850. https://doi.org/10.1016/j.cub.2012.08.005
- Fournier, M., Massei, N., Bakalowicz, M., Dussart-Baptista, L., Rodet, J., Dupont, J.P., 2007. Using turbidity dynamics and geochemical variability as a tool for understanding the behavior and vulnerability of a karst aquifer. Hydrogeology Journal 15, 689–704. https://doi.org/10.1007/s10040-006-0116-2
- Fux, C.A., Costerton, J.W., Stewart, P.S., Stoodley, P., 2005. Survival strategies of infectious biofilms. Trends in Microbiology 13, 34–40. <u>https://doi.org/10.1016/j.tim.2004.11.010</u>

G

- Garzio-Hadzick, A., Shelton, D.R., Hill, R.L., Pachepsky, Y.A., Guber, A.K., Rowland, R., 2010. Survival of manure-borne E. coli in streambed sediment: Effects of temperature and sediment properties. Water Research 44, 2753–2762. <u>https://doi.org/10.1016/j.watres.2010.02.011</u>
- Gaze, W.H., Zhang, L., Abdouslam, N.A., Hawkey, P.M., Calvo-Bado, L., Royle, J., Brown, H., Davis, S., Kay, P., Boxall, A.B.A., Wellington, E.M.H., 2011. Impacts of anthropogenic activity on the ecology of class 1 integrons and integron-associated genes in the environment. ISME J 5, 1253–1261. <u>https://doi.org/10.1038/ismej.2011.15</u>
- Gillings, M., Boucher, Y., Labbate, M., Holmes, A., Krishnan, S., Holley, M., Stokes, H.W., 2008. The Evolution of Class 1 Integrons and the Rise of Antibiotic Resistance. Journal of Bacteriology 190, 5095–5100. <u>https://doi.org/10.1128/JB.00152-08</u>
- Gillings, M.R., Gaze, W.H., Pruden, A., Smalla, K., Tiedje, J.M., Zhu, Y.-G., 2015. Using the class 1 integron-integrase gene as a proxy for anthropogenic pollution. The ISME Journal 9, 1269–1279. <u>https://doi.org/10.1038/ismej.2014.226</u>
- Goeppert, N., Goldscheider, N., 2011. Transport and Variability of Fecal Bacteria in Carbonate Conglomerate Aquifers. Ground Water 49, 77–84. <u>https://doi.org/10.1111/j.1745-6584.2010.00741.x</u>

- Goldscheider, N., 2005. Karst groundwater vulnerability mapping: application of a new method in the Swabian Alb, Germany. Hydrogeol J 13, 555–564. <u>https://doi.org/10.1007/s10040-003-0291-3</u>
- Goldscheider, N., Hunkeler, D., Rossi, P., 2006. Review: Microbial biocenoses in pristine aquifers and an assessment of investigative methods. Hydrogeol J 14, 926–941. https://doi.org/10.1007/s10040-005-0009-9
- Goldscheider, N., Mádl-Szőnyi, J., Erőss, A., Schill, E., 2010. Review: Thermal water resources in carbonate rock aquifers. Hydrogeol J 18, 1303–1318. <u>https://doi.org/10.1007/s10040-010-0611-3</u>
- Gonçalves, A., Igrejas, G., Radhouani, H., Correia, S., Pacheco, R., Santos, T., Monteiro, R., Guerra, A., Petrucci-Fonseca, F., Brito, F., Torres, C., Poeta, P., 2013. Antimicrobial resistance in faecal enterococci and Escherichia coli isolates recovered from Iberian wolf. Letters in Applied Microbiology 56, 268–274. <u>https://doi.org/10.1111/lam.12044</u>
- Gordon, D.M., Cowling, A., 2003. The distribution and genetic structure of Escherichia coli in Australian vertebrates: host and geographic effects. Microbiology (Reading, Engl.) 149, 3575–3586. <u>https://doi.org/10.1099/mic.0.26486-0</u>
- Gregory, S.P., Maurice, L.D., West, J.M., Gooddy, D.C., 2014. Microbial communities in UK aquifers: current understanding and future research needs. Quarterly Journal of Engineering Geology and Hydrogeology 47, 145–157.
- Grillone, G., Baiamonte, G., n.d. Empirical determination of the average annual runoff coefficient in the Mediterranean area. Am. J. Appl. Sci 89–95.
- Guber, A.K., Shelton, D.R., Pachepsky, Y.A., Sadeghi, A.M., Sikora, L.J., 2006. Rainfall-Induced Release of Fecal Coliforms and Other Manure Constituents: Comparison and Modeling. Appl. Environ. Microbiol. 72, 7531–7539. <u>https://doi.org/10.1128/AEM.01121-06</u>

Η

- Halim, A., Shapiro, A., Lantz, A.E., Nielsen, S.M., 2014. Experimental Study of Bacterial Penetration into Chalk Rock: Mechanisms and Effect on Permeability. Transp Porous Med 101, 1–15. <u>https://doi.org/10.1007/s11242-013-0227-x</u>
- Hall-Stoodley, L., Stoodley, P., 2009. Evolving concepts in biofilm infections. Cellular Microbiology 11, 1034–1043. <u>https://doi.org/10.1111/j.1462-5822.2009.01323.x</u>
- Hamelin, K., Bruant, G., El-Shaarawi, A., Hill, S., Edge, T.A., Fairbrother, J., Harel, J., Maynard, C., Masson, L., Brousseau, R., 2007. Occurrence of Virulence and Antimicrobial Resistance Genes in Escherichia coli Isolates from Different Aquatic Ecosystems within the St. Clair River and Detroit River Areas. Applied and Environmental Microbiology 73, 477–484. <u>https://doi.org/10.1128/AEM.01445-06</u>

- Hartmann, A., Goldscheider, N., Wagener, T., Lange, J., Weiler, M., 2014. Karst water resources in a changing world: Review of hydrological modeling approaches. Reviews of Geophysics 52, 218–242. <u>https://doi.org/10.1002/2013RG000443</u>
- Rijsewijk, B.R.B.H. van, Nanchen, A., Nallet, S., Kleijn, R.J., Sauer, U., 2011. Large-scale 13Cflux analysis reveals distinct transcriptional control of respiratory and fermentative metabolism in Escherichia coli. Molecular Systems Biology 7, 477. https://doi.org/10.1038/msb.2011.9
- Hauchard, E., Laignel, B., Delahaye, D., 2002. Proposition d'un nouveau schéma structural du Nord-Ouest du bassin de Paris reposant sur l'analyse fractale des réseaux de thalwegs et les données récentes de la géologie régionale. Comptes Rendus Geoscience 334, 295–302. <u>https://doi.org/10.1016/S1631-0713(02)01733-9</u>
- Hawley, M.E., McCuen, R.H., 1982. Water Yield Estimation in Western United States. Journal of the Irrigation and Drainage Division 108, 25–34.
- Hebsgaard, M.B., Phillips, M.J., Willerslev, E., 2005. Geologically ancient DNA: fact or artefact? Trends in Microbiology 13, 212–220. <u>https://doi.org/10.1016/j.tim.2005.03.010</u>
- Heuer, H., Smalla, K., 2007. Manure and sulfadiazine synergistically increased bacterial antibiotic resistance in soil over at least two months. Environmental Microbiology 9, 657–666. https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2006.01185.x
- Hodgson, C.J., Bulmer, N., Chadwick, D.R., Oliver, D.M., Heathwaite, A.L., Fish, R.D., Winter, M., 2009. Establishing relative release kinetics of faecal indicator organisms from different faecal matrices. Letters in Applied Microbiology 49, 124–130. <u>https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.2009.02630.x</u>
- Hojo, K., Nagaoka, S., Ohshima, T., Maeda, N., 2009. Bacterial Interactions in Dental Biofilm Development. J Dent Res 88, 982–990. <u>https://doi.org/10.1177/0022034509346811</u>
- Holden, N.J., Wright, F., MacKenzie, K., Marshall, J., Mitchell, S., Mahajan, A., Wheatley, R., Daniell, T.J., 2014. Prevalence and diversity of Escherichia coli isolated from a barley trial supplemented with bulky organic soil amendments: green compost and bovine slurry. Letters in Applied Microbiology 58, 205–212. <u>https://doi.org/10.1111/lam.12180</u>
- Howard, G., Pedley, S., Barrett, M., Nalubega, M., Johal, K., 2003. Risk factors contributing to microbiological contamination of shallow groundwater in Kampala, Uganda. Water Research 37, 3421–3429. <u>https://doi.org/10.1016/S0043-1354(03)00235-5</u>
- Hunt, R.J., Borchardt, M.A., Richards, K.D., Spencer, S.K., 2010. Assessment of Sewer Source Contamination of Drinking Water Wells Using Tracers and Human Enteric Viruses [WWW Document]. <u>https://doi.org/10.1021/es100698m</u>
- Hynds, P.D., Misstear, B.D., Gill, L.W., 2012. Development of a microbial contamination susceptibility model for private domestic groundwater sources: MICROBIAL SUSCEPTIBILITY MODEL FOR PRIVATE WELLS. Water Resources Research 48. <u>https://doi.org/10.1029/2012WR012492</u>

Hynds, P.D., Gill, L.W., Misstear, B.D., 2014. A Quantitative Risk Assessment of Verotoxigenic E. coli (VTEC) in Private Groundwater Sources in the Republic of Ireland. Human and Ecological Risk Assessment: An International Journal 20, 1446–1468. <u>https://doi.org/10.1080/10807039.2013.862065</u>

1-

Ι

- Ishii, S., Ksoll, W.B., Hicks, R.E., Sadowsky, M.J., 2006. Presence and Growth of Naturalized Escherichia coli in Temperate Soils from Lake Superior Watersheds. Appl. Environ. Microbiol. 72, 612–621. <u>https://doi.org/10.1128/AEM.72.1.612-621.2006</u>
- Ishii, S., Meyer, K.P., Sadowsky, M.J., 2007. Relationship between Phylogenetic Groups, Genotypic Clusters, and Virulence Gene Profiles of Escherichia coli Strains from Diverse Human and Animal Sources. Appl. Environ. Microbiol. 73, 5703–5710. https://doi.org/10.1128/AEM.00275-07
- Ishii, S., Sadowsky, M.J., 2008. Escherichia coli in the Environment: Implications for Water Quality and Human Health. Microbes Environ. 23, 101–108.
- Iván, V., Mádl-Szőnyi, J., 2017. State of the art of karst vulnerability assessment: overview, evaluation and outlook. Environ Earth Sci 76, 112. <u>https://doi.org/10.1007/s12665-017-6422-2</u>

J

- Jacques, M., Aragon, V., Tremblay, Y.D.N., 2010. Biofilm formation in bacterial pathogens of veterinary importance. Animal Health Research Reviews 11, 97–121. <u>https://doi.org/10.1017/S1466252310000149</u>
- Jang, J., Hur, H.-G., Sadowsky, M.J., Byappanahalli, M.N., Yan, T., Ishii, S., 2017. Environmental Escherichia coli: ecology and public health implications—a review. Journal of Applied Microbiology 123, 570–581. <u>https://doi.org/10.1111/jam.13468</u>
- Jechalke, S., Broszat, M., Lang, F., Siebe, C., Smalla, K., Grohmann, E., 2015. Effects of 100 years wastewater irrigation on resistance genes, class 1 integrons and IncP-1 plasmids in Mexican soil. Front. Microbiol. 6. <u>https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00163</u>
- John, D.E., Rose, J.B., 2005. Review of Factors Affecting Microbial Survival in Groundwater. Environ. Sci. Technol. 39, 7345–7356. <u>https://doi.org/10.1021/es047995w</u>
- Johnson, J.R., Russo, T.A., 2005. Molecular epidemiology of extraintestinal pathogenic (uropathogenic) Escherichia coli. Int. J. Med. Microbiol. 295, 383–404. https://doi.org/10.1016/j.ijmm.2005.07.005

- Johnson, T.B., McKay, L.D., Layton, A.C., Jones, S.W., Johnson, G.C., Cashdollar, J.L., Dahling, D.R., Villegas, L.F., Fout, G.S., Williams, D.E., Sayler, G., 2011. Viruses and Bacteria in Karst and Fractured Rock Aquifers in East Tennessee, USA. Ground Water 49, 98–110. <u>https://doi.org/10.1111/j.1745-6584.2010.00698.x</u>
- Johnson, J.R., Johnston, B.D., Delavari, P., Thuras, P., Clabots, C., Sadowsky, M.J., 2017. Phylogenetic Backgrounds and Virulence-Associated Traits of Escherichia coli Isolates from Surface Waters and Diverse Animals in Minnesota and Wisconsin. Appl. Environ. Microbiol. 83, e01329-17. <u>https://doi.org/10.1128/AEM.01329-17</u>
- Joly-Guillou, M.-L., 2005. Clinical impact and pathogenicity of Acinetobacter. Clinical Microbiology and Infection 11, 868–873. <u>https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2005.01227.x</u>
- Jozefczuk, S., Klie, S., Catchpole, G., Szymanski, J., Cuadros-Inostroza, A., Steinhauser, D., Selbig, J., Willmitzer, L., 2010. Metabolomic and transcriptomic stress response of Escherichia coli. Molecular Systems Biology 6, 364. <u>https://doi.org/10.1038/msb.2010.18</u>
- Juhna, T., Birzniece, D., Larsson, S., Zulenkovs, D., Sharipo, A., Azevedo, N.F., Ménard-Szczebara, F., Castagnet, S., Féliers, C., Keevil, C.W., 2007. Detection of Escherichia coli in Biofilms from Pipe Samples and Coupons in Drinking Water Distribution Networks. Appl Environ Microbiol 73, 7456–7464. <u>https://doi.org/10.1128/AEM.00845-07</u>
- Justin, J.D., 1914. Derivation of Run-off from Rainfall Data. Transactions of the American Society of Civil Engineers LXXVII, 346–363.

Κ

- Kaper, J.B., Nataro, J.P., Mobley, H.L.T., 2004. Pathogenic Escherichia coli. Nature Reviews Microbiology 2, 123–140. <u>https://doi.org/10.1038/nrmicro818</u>
- Karched, M., Bhardwaj, R.G., Asikainen, S.E., 2015. Coaggregation and biofilm growth of Granulicatella spp. with Fusobacterium nucleatum and Aggregatibacter actinomycetemcomitans. BMC Microbiology 15, 114. <u>https://doi.org/10.1186/s12866-015-0439-z</u>
- Kaster, K.M., Hiorth, A., Kjeilen-Eilertsen, G., Boccadoro, K., Lohne, A., Berland, H., Stavland, A., Brakstad, O.G., 2012. Mechanisms Involved in Microbially Enhanced Oil Recovery. Transport in Porous Media 1, 59–79. <u>https://doi.org/10.1007/s11242-011-9833-7</u>
- Katharios-Lanwermeyer, S., Xi, C., Jakubovics, N.S., Rickard, A.H., 2014. Mini-review: Microbial coaggregation: ubiquity and implications for biofilm development. Biofouling 30, 1235–1251. https://doi.org/10.1080/08927014.2014.976206
- Kavouri, K.P., Karatzas, G.P., Plagnes, V., 2017. A coupled groundwater-flow-modelling and vulnerability-mapping methodology for karstic terrain management. Hydrogeol J 25, 1301–1317. <u>https://doi.org/10.1007/s10040-017-1548-6</u>

- Keegan, D.A., Wati, D.S., Robinson, B., 2012. Chlor(am)ine disinfection of human pathogenic viruses in recycled waters 195.
- Kim, H.S., Lee, S., 2014. Assessment of a seasonal calibration technique using multiple objectives in rainfall–runoff analysis. Hydrological Processes 28, 2159–2173. https://doi.org/10.1002/hyp.9785
- Knierim, K.J., Hays, P.D., Bowman, D., 2015. Quantifying the variability in Escherichia coli (E. coli) throughout storm events at a karst spring in northwestern Arkansas, United States. Environmental Earth Sciences 74, 4607–4623. <u>https://doi.org/10.1007/s12665-015-4416-5</u>
- Koch, H., Lücker, S., Albertsen, M., Kitzinger, K., Herbold, C., Spieck, E., Nielsen, P.H., Wagner, M., Daims, H., 2015. Expanded metabolic versatility of ubiquitous nitrite-oxidizing bacteria from the genus Nitrospira. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 112, 11371–11376. https://doi.org/10.1073/pnas.1506533112
- Kohler, M.A., 1915-, 1951. Predicting the runoff from storm rainfall.
- Kolenbrander, P.E., 2011. Multispecies communities: interspecies interactions influence growth on saliva as sole nutritional source. Int J Oral Sci 3, 49–54. <u>https://doi.org/10.4248/IJOS11025</u>
- Kotlarska, E., Łuczkiewicz, A., Pisowacka, M., Burzyński, A., 2015. Antibiotic resistance and prevalence of class 1 and 2 integrons in Escherichia coli isolated from two wastewater treatment plants, and their receiving waters (Gulf of Gdansk, Baltic Sea, Poland). Environ Sci Pollut Res Int 22, 2018–2030. <u>https://doi.org/10.1007/s11356-014-3474-7</u>
- Kresic, N., 2010. Chapter 2 Types and classifications of springs, in: Kresic, N., Stevanovic, Z. (Eds.), Groundwater Hydrology of Springs. Butterworth-Heinemann, Boston, pp. 31–85. https://doi.org/10.1016/B978-1-85617-502-9.00002-5

L

- Laroche, E., Petit, F., Fournier, M., Pawlak, B., 2010. Transport of antibiotic-resistant Escherichia coli in a public rural karst water supply. Journal of Hydrology 392, 12–21. https://doi.org/10.1016/j.jhydrol.2010.07.022
- LeChevallier, M.W., Evans, T.M., Seidler, R.J., 1981. Effect of turbidity on chlorination efficiency and bacterial persistence in drinking water. Appl. Environ. Microbiol. 42, 159–167.
- Leclerc, H., Mossel, D.A., Edberg, S.C., Struijk, C.B., 2001. Advances in the bacteriology of the coliform group: their suitability as markers of microbial water safety. Annu. Rev. Microbiol. 55, 201–234. <u>https://doi.org/10.1146/annurev.micro.55.1.201</u>
- Lee, H., Kim, Misoon, Lee, J.E., Lim, M., Kim, MinJung, Kim, J.-M., Jheong, W.-H., Kim, J., Ko, G., 2011. Investigation of norovirus occurrence in groundwater in metropolitan Seoul, Korea. Science of The Total Environment 409, 2078–2084. <u>https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2011.01.059</u>

- Lewis, K., 2005. Persister cells and the riddle of biofilm survival. Biochemistry (Moscow) 70, 267–274. <u>https://doi.org/10.1007/s10541-005-0111-6</u>
- Ling, T.Y., Jong, H.J., Apun, K., Wan Sulaiman, W.H., 2009. Quantifying Escherichia coli Release from Soil under High-Intensity Rainfall. Transactions of the ASABE.
- Liu, Y., Li, J., 2008. Role of Pseudomonas aeruginosa Biofilm in the Initial Adhesion, Growth and Detachment of Escherichia coli in Porous Media. Environ. Sci. Technol. 42, 443–449. https://doi.org/10.1021/es071861b
- Liu, H., Wang, H., Huang, M., Mei, Y., Gu, B., Wu, R., Huang, Y., Chen, Y., Xu, Y., Wang, T., 2013. Analysis of antimicrobial resistance and class 1 integrons among strains from upper respiratory tract of healthy adults. J Thorac Dis 5, 149–155. <u>https://doi.org/10.3978/j.issn.2072-1439.2013.03.09</u>
- Liu, Z., Li, Q., Sun, H., Wang, J., 2007. Seasonal, diurnal and storm-scale hydrochemical variations of typical epikarst springs in subtropical karst areas of SW China: Soil CO2 and dilution effects. Journal of Hydrology 337, 207–223. <u>https://doi.org/10.1016/j.jhydrol.2007.01.034</u>
- Loop, C.M., White, W.B., 2001. A Conceptual Model for DNAPL Transport in Karst Ground Water Basins. Groundwater 39, 119–127. <u>https://doi.org/10.1111/j.1745-6584.2001.tb00357.x</u>
- López-Gálvez, F., Sampers, I., Gil, M.I., Allende, A., 2017. Modelling of E. coli inactivation by chlorine dioxide in irrigation water. Agricultural Water Management 192, 98–102. https://doi.org/10.1016/j.agwat.2017.07.001
- Lyautey, E., Lu, Z., Lapen, D.R., Wilkes, G., Scott, A., Berkers, T., Edge, T.A., Topp, E., 2010. Distribution and diversity of Escherichia coli populations in the South Nation River drainage basin, eastern Ontario, Canada. Applied and environmental microbiology 76, 1486–1496.

Μ

- Maal-Bared, R., Bartlett, K.H., Bowie, W.R., Hall, E.R., 2013. Phenotypic antibiotic resistance of Escherichia coli and E. coli O157 isolated from water, sediment and biofilms in an agricultural watershed in British Columbia. Science of The Total Environment 443, 315–323. https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2012.10.106
- Mackowiak, M., Leifels, M., Hamza, I.A., Jurzik, L., Wingender, J., 2018. Distribution of Escherichia coli, coliphages and enteric viruses in water, epilithic biofilms and sediments of an urban river in Germany. Science of The Total Environment 626, 650–659. https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.01.114
- Madsen, J.S., Burmølle, M., Hansen, L.H., Sørensen, S.J., 2012. The interconnection between biofilm formation and horizontal gene transfer. FEMS Immunol Med Microbiol 65, 183–195. https://doi.org/10.1111/j.1574-695X.2012.00960.x

M -

- Maeda, S., Sawamura, A., Matsuda, A., 2004. Transformation of colonial Escherichia coli on solid media. FEMS Microbiol Lett 236, 61–64. <u>https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2004.tb09627.x</u>
- Mahler, B., Massei, N., 2007. Anthropogenic contaminants as tracers in an urbanizing karst aquifer. Journal of Contaminant Hydrology 91, 81–106. <u>https://doi.org/10.1016/j.jconhyd.2006.08.010</u>
- Majowicz, S.E., Scallan, E., Jones-Bitton, A., Sargeant, J.M., Stapleton, J., Angulo, F.J., Yeung, D.H., Kirk, M.D., 2014. Global Incidence of Human Shiga Toxin–Producing Escherichia coli Infections and Deaths: A Systematic Review and Knowledge Synthesis. Foodborne Pathogens and Disease 11, 447–455. <u>https://doi.org/10.1089/fpd.2013.1704</u>
- Mallin, M.A., Williams, K.E., Esham, E.C., Lowe, R.P., 2000, n.d. Effect of Human Development on Bacteriological Water Quality in Coastal Watersheds. Ecological Applications 10, 1047– 1056. <u>https://doi.org/10.1890/1051-0761(2000)010[1047:EOHDOB]2.0.CO;2</u>
- Mangin, A. (1978, Octobre). Le karst, entité physique, abordé par l'étude du système karstique. Dans Colloque le karst: son originalité physique son importance économique (pp. 21-37).
- Marchant, M., Vinué, L., Torres, C., Moreno, M.A., 2013. Change of integrons over time in Escherichia coli isolates recovered from healthy pigs and chickens. Vet. Microbiol. 163, 124–132. <u>https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2012.12.011</u>
- Marsaud, B., 1996. Structure et fonctionnement de la zone noyee des karsts à partir des resultats experimentaux. Thèse de doctorat en Terre, océan, espace. Paris
- Massei, N., 2001. Transport de particules en suspension dans l'aquifère crayeux karstique et à l'interface craie-alluvions. Thèse de doctorat. Interfaces continentales, environnement. Rouen.
- Massei, N., Lacroix, M., Wang, H.Q., Mahler, B.J., Dupont, J.P., 2002. Transport of suspended solids from a karstic to an alluvial aquifer: the role of the karst/alluvium interface. Journal of Hydrology 260, 88–101. <u>https://doi.org/10.1016/S0022-1694(01)00608-4</u>
- Massei, N., Wang, H., Dupont, J., Rodet, J., Laignel, B., 2003. Assessment of direct transfer and resuspension of particles during turbid floods at a karstic spring. Journal of Hydrology 275, 109–121. <u>https://doi.org/10.1016/S0022-1694(03)00020-9</u>
- Massei, N., Dupont, J.P., Mahler, B.J., Laignel, B., Fournier, M., Valdes, D., Ogier, S., 2006. Investigating transport properties and turbidity dynamics of a karst aquifer using correlation, spectral, and wavelet analyses. Journal of Hydrology 329, 244–257. https://doi.org/10.1016/j.jhydrol.2006.02.021
- Massot, M., Daubié, A.-S., Clermont, O., Jauréguy, F., Couffignal, C., Dahbi, G., Mora, A., Blanco, J., Branger, C., Mentré, F., Eddi, A., Picard, B., Denamur, E., the COLIVILLE Group, 2016a. Phylogenetic, virulence and antibiotic resistance characteristics of commensal strain populations of Escherichia coli from community subjects in the Paris area in 2010 and evolution over 30 years. Microbiology 162, 642–650. <u>https://doi.org/10.1099/mic.0.000242</u>
- Massot, M., Picard, B., Denamur, E., 2016b. Diversité des populations d'Escherichia coli et leurs variations au cours du temps au sein du microbiote intestinal. Revue Francophone des Laboratoires, Escherichia coli 2016, 35–43. <u>https://doi.org/10.1016/S1773-035X(16)30326-4</u>

M -

- Mazel, D., 2006. Integrons: agents of bacterial evolution. Nature Reviews Microbiology 4, 608–620. https://doi.org/10.1038/nrmicro1462
- Medini, D., Serruto, D., Parkhill, J., Relman, D.A., Donati, C., Moxon, R., Falkow, S., Rappuoli, R., 2008. Microbiology in the post-genomic era. Nature Reviews Microbiology 6, 419–430. https://doi.org/10.1038/nrmicro1901
- Meusburger, S., Reichart, S., Kapfer, S., Schableger, K., Fretz, R., Allerberger, F., 2007. Outbreak of acute gastroenteritis of unknown etiology caused by contaminated drinking water in a rural village in Austria, August 2006. Wiener klinische Wochenschrift 119, 717–721. https://doi.org/10.1007/s00508-007-0916-y
- Mezule, L., Larsson, S., Juhna, T., 2013. Application of DVC-FISH method in tracking *Escherichia coli* in drinking water distribution networks. Drinking Water Engineering and Science 6, 25–31. <u>https://doi.org/10.5194/dwes-6-25-2013</u>
- Mishra, A., Benham, B.L., Mostaghimi, S., 2008. Bacterial Transport from Agricultural Lands Fertilized with Animal Manure. Water Air Soil Pollut 189, 127–134. https://doi.org/10.1007/s11270-007-9561-3
- Monteith, J.L., 1965. Evaporation and environment. Symp. Soc. Exp. Biol. 19, 205–234.
- Morcatti Coura, F., Diniz, S. de A., Silva, M.X., Mussi, J.M.S., Barbosa, S.M., Lage, A.P., Heinemann, M.B., 2015. Phylogenetic Group Determination of Escherichia coli Isolated from Animals Samples [WWW Document]. The Scientific World Journal. <u>https://doi.org/10.1155/2015/258424</u>
- Moreira, S., Brown, A., Ha, R., Iserhoff, K., Yim, M., Yang, J., Liao, B., Pszczolko, E., Qin, W., Leung, K.T., 2012. Persistence of Escherichia coli in freshwater periphyton: biofilm-forming capacity as a selective advantage. FEMS Microbiol Ecol 79, 608–618. <u>https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2011.01244.x</u>
- Moreira, N.A., Bondelind, M., 2017. Safe drinking water and waterborne outbreaks. J Water Health 15, 83–96. <u>https://doi.org/10.2166/wh.2016.103</u>
- Morton, F.I., 1983. Operational estimates of areal evapotranspiration and their significance to the science and practice of hydrology. Journal of Hydrology 66, 1–76. https://doi.org/10.1016/0022-1694(83)90177-4
- Muirhead, R.W., Collins, R.P., Bremer, P.J., 2005. Erosion and Subsequent Transport State of Escherichia coli from Cowpats. Applied and Environmental Microbiology 71, 2875–2879. https://doi.org/10.1128/AEM.71.6.2875-2879.2005
- Muirhead, R.W., Collins, R.P., Bremer, P.J., 2006. Interaction of Escherichia coli and Soil Particles in Runoff. Appl. Environ. Microbiol. 72, 3406–3411. <u>https://doi.org/10.1128/AEM.72.5.3406-3411.2006</u>
- Murphy, S., Jordan, P., Mellander, P.-E., O' Flaherty, V., 2015. Quantifying faecal indicator organism hydrological transfer pathways and phases in agricultural catchments. Science of The Total Environment 520, 286–299. <u>https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2015.02.017</u>

M -

Ν

- Nguyet, V.T.M., Nguyet, V.T.M., 2016. Hydrogeochemical characteristics of karst groundwater in Tam Diep, Ninh Binh, Vietnam. Acta Carsologica 45. <u>https://doi.org/10.3986/ac.v45i3.3588</u>
- Nicholls, H., 2005. Ancient DNA Comes of Age. PLOS Biology 3, e56. https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0030056

O

- O'Dwyer, J., Morris Downes, M., Adley, C.C., 2016. The impact of meteorology on the occurrence of waterborne outbreaks of vero cytotoxin-producing Escherichia coli (VTEC): a logistic regression approach. J Water Health 14, 39–46. <u>https://doi.org/10.2166/wh.2015.016</u>
- O'Dwyer, J., Hynds, P.D., Byrne, K.A., Ryan, M.P., Adley, C.C., 2018. Development of a hierarchical model for predicting microbiological contamination of private groundwater supplies in a geologically heterogeneous region. Environmental Pollution 237, 329–338. https://doi.org/10.1016/j.envpol.2018.02.052
- Oliver, D.M., Clegg, C.D., Haygarth, P.M., Heathwaite, A.L., 2005a. Assessing the potential for pathogen transfer from grassland soils to surface waters. Advances in agronomy.
- Oliver, D.M., Heathwaite, L., Haygarth, P.M., Clegg, C.D., 2005b. Transfer of Escherichia coli to water from drained and undrained grassland after grazing. Journal of environmental quality.
- Orth, J.D., Conrad, T.M., Na, J., Lerman, J.A., Nam, H., Feist, A.M., Palsson, B.Ø., 2011. A comprehensive genome-scale reconstruction of Escherichia coli metabolism—2011. Mol Syst Biol 7, 535. <u>https://doi.org/10.1038/msb.2011.65</u>
- Oudin, L., 2004. Recherche d'un modèle d'évapotranspiration potentielle pertinent comme entrée d'un modèle pluie-débit global. Thèse de doctorat Sciences de l'universe. ENGREF (AgroParisTech).
- Oudin, L., Hervieu, F., Michel, C., Perrin, C., Andréassian, V., Anctil, F., Loumagne, C., 2005. Which potential evapotranspiration input for a lumped rainfall-runoff model?: Part 2— Towards a simple and efficient potential evapotranspiration model for rainfall-runoff modelling. Journal of Hydrology 303, 290–306. <u>https://doi.org/10.1016/j.jhydrol.2004.08.026</u>
- Ouvry, J., & Lherlteau, M. (2006). Lutte contre l'érosion des terres: l'expérience de la Haute-Normandie en matière d'aménagements d'hydraulique rapprochée à la parcelle sur une exploitation. Qualité de l'eau en milieu rural: Savoirs et pratiques dans les bassins versants, 151.

- Pachepsky, Y.A., Guber, A.K., Shelton, D.R., McCarty, G.W., 2009. Size distributions of manure particles released under simulated rainfall. Journal of Environmental Management 90, 1365– 1369. <u>https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2008.08.001</u>
- Pang, L., 2009. Microbial Removal Rates in Subsurface Media Estimated From Published Studies of Field Experiments and Large Intact Soil Cores. Journal of Environmental Quality 38, 1531–1559. <u>https://doi.org/10.2134/jeq2008.0379</u>
- Papy, F., Douyer, C., 1988. Les déterminants des catastrophes liées au ruissellement des terres agricoles en Pays de Caux. Rapport INRA SAD, 44 p.
- Perini, L., Quero, G.M., Serrano García, E., Luna, G.M., 2015. Distribution of Escherichia coli in a coastal lagoon (Venice, Italy): Temporal patterns, genetic diversity and the role of tidal forcing. Water Research 87, 155–165. <u>https://doi.org/10.1016/j.watres.2015.09.021</u>
- Personné, J.-C., Poty, F., Mahler, B.J., Drogue, C., 2004. Colonization by Aerobic Bacteria in Karst: Laboratory and In Situ Experiments. Groundwater 42, 526–533. https://doi.org/10.1111/j.1745-6584.2004.tb02621.x
- Peterson, E.W., Wicks, C.M., 2003. Characterization of the physical and hydraulic properties of the sediment in karst aquifers of the Springfield Plateau, Central Missouri, USA. Hydrogeology Journal 11, 357–367. <u>https://doi.org/10.1007/s10040-003-0260-x</u>
- Petit, F., Ratajczak, M., Massei, N., Lafite, R., Clermont, O., Denamur, E., Berthe, T., 2012. Existence of both culturable and viable but non culturable (VNC) E. coli populations with distinct settling velocities in karst aquifer. AGU Fall Meeting Abstracts 11, H11F-1249.
- Petit, F., Clermont, O., Delannoy, S., Servais, P., Gourmelon, M., Fach, P., Oberlé, K., Fournier, M., Denamur, E., Berthe, T., 2017. Change in the Structure of Escherichia coli Population and the Pattern of Virulence Genes along a Rural Aquatic Continuum. Front. Microbiol. 8. <u>https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00609</u>
- Petit, F., Berthe, T., Chaix, G., Denamur, E., Clermont, O., Massei, N., Dupont, J.-P., 2018. Factors Influencing the Occurrence and the Fate of E. coli Population in Karst Hydrosystems, in: White, W.B., Herman, J.S., Herman, E.K., Rutigliano, M. (Eds.), Karst Groundwater Contamination and Public Health, Advances in Karst Science. Springer International Publishing, pp. 219–230.
- Plagnes, V., Kavouri, K., Huneau, F., Fournier, M., Jaunat, J., Pinto-Ferreira, C., Leroy, B., Marchet, P., Dörfliger, N., 2010. PaPRIKa, the French Multicriteria Method for Mapping the Intrinsic Vulnerability of Karst Water Resource and Source Two Examples (Pyrenees, Normandy), in: Andreo, B., Carrasco, F., Durán, J.J., LaMoreaux, J.W. (Eds.), Advances in Research in Karst Media, Environmental Earth Sciences. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, pp. 323–328. <u>https://doi.org/10.1007/978-3-642-12486-0_50</u>

- Pleuvret, C., 1997. Etude d'environnement préalable à la définition des périmètres de protection du captage de Norville., B.E.T. SOGETI.
- Prescott, S.C., Winslow, C-E.A., 1915. Elements of water bacteriology with special reference to sanitary water analysis. 3d ed., J. Wiley & sons, New York, 318 p
- Pronk, M., Goldscheider, N., Zopfi, J., 2007. Particle-Size Distribution As Indicator for Fecal Bacteria Contamination of Drinking Water from Karst Springs. Environmental Science & Technology 41, 8400–8405. <u>https://doi.org/10.1021/es071976f</u>
- Pronk, M., Goldscheider, N., Zopfi, J., 2009. Microbial communities in karst groundwater and their potential use for biomonitoring. Hydrogeology Journal 17, 37–48. https://doi.org/10.1007/s10040-008-0350-x

R

- Radhouani, H., Igrejas, G., Gonçalves, A., Estepa, V., Sargo, R., Torres, C., Poeta, P., 2013. Molecular characterization of extended-spectrum-beta-lactamase-producing Escherichia coli isolates from red foxes in Portugal. Arch Microbiol 195, 141–144. https://doi.org/10.1007/s00203-012-0853-7
- Ratajczak, M., Laroche, E., Berthe, T., Clermont, O., Pawlak, B., Denamur, E., Petit, F., 2010. Influence of hydrological conditions on the Escherichia coli population structure in the water of a creek on a rural watershed. BMC microbiology 10, 222.
- Ren, D., Madsen, J.S., Sørensen, S.J., Burmølle, M., 2015. High prevalence of biofilm synergy among bacterial soil isolates in cocultures indicates bacterial interspecific cooperation. ISME J 9, 81–89. <u>https://doi.org/10.1038/ismej.2014.96</u>
- Richet, J. B., Helloco, F., 2008. Anticipation des désordres hydrologiques majeurs en hiver sous pluie peu intense en Seine Maritime. Colloque SFH, Lyon, 18-19 nov. 2008.
- Rijsewijk, B.R.B.H. van, Nanchen, A., Nallet, S., Kleijn, R.J., Sauer, U., 2011. Large-scale 13Cflux analysis reveals distinct transcriptional control of respiratory and fermentative metabolism in Escherichia coli. Molecular Systems Biology 7, 477. <u>https://doi.org/10.1038/msb.2011.9</u>
- Rockhold, M.L., Yarwood, R.R., Selker, J.S., 2004. Coupled Microbial and Transport Processes in Soils. Vadose Zone Journal 3, 368–383. <u>https://doi.org/10.2136/vzj2004.0368</u>
- Rollet, C., 2009. Evaluation de l'efficacité de traitements enzymatiques sur les biofilms et étude du risque lié au détachement des bactéries : cas de Pseudomonas aeruginosa. Thèse de doctorat en microbiologie, sciences de l'alimentation. Dijon.
- Ross, N., Villemur, R., Marcandella, É., Deschênes, L., 2001. Assessment of changes in biodiversity when a community of ultramicrobacteria isolated from groundwater is stimulated to form a biofilm. Microb Ecol 42, 56–68. <u>https://doi.org/10.1007/s002480000085</u>

214

-

- Sabarly, V., Bouvet, O., Glodt, J., Clermont, O., Skurnik, D., Diancourt, L., de Vienne, D., Denamur, E., Dillmann, C., 2011. The decoupling between genetic structure and metabolic phenotypes in Escherichia coli leads to continuous phenotypic diversity. Journal of evolutionary biology 24, 1559–71. <u>https://doi.org/10.1111/j.1420-9101.2011.02287.x</u>
- Sabarly, V., Aubron, C., Glodt, J., Balliau, T., Langella, O., Chevret, D., Rigal, O., Bourgais, A., Picard, B., de Vienne, D., Denamur, E., Bouvet, O., Dillmann, C., 2016. Interactions between genotype and environment drive the metabolic phenotype within *E scherichia coli* isolates: Metabolic diversity within *Escherichia coli* isolates. Environmental Microbiology 18, 100–117. <u>https://doi.org/10.1111/1462-2920.12855</u>
- Sabater, S., Guasch, H., Ricart, M., Romaní, A., Vidal, G., Klünder, C., Schmitt-Jansen, M., 2007. Monitoring the effect of chemicals on biological communities. The biofilm as an interface. Anal Bioanal Chem 387, 1425–1434. <u>https://doi.org/10.1007/s00216-006-1051-8</u>
- Salyers, A.A, Whitt, D.D., 2002. Bacterial pathogenesis: a molecular approach. 2nd ed., ASM Press, Washington, DC., 526 p.
- Santos, F.L., Hawkins, R.H., 2011. Generalized Mediterranean Annual Water Yield Model: Grunsky's Equation and Long-Term Average Temperature. Journal of Hydrologic Engineering 16, 874–879. <u>https://doi.org/10.1061/(ASCE)HE.1943-5584.0000402</u>
- Satpathy, S., Sen, S.K., Pattanaik, S., Raut, S., 2016. Review on bacterial biofilm: An universal cause of contamination. Biocatalysis and Agricultural Biotechnology 7, 56–66. https://doi.org/10.1016/j.bcab.2016.05.002
- Savage, D.C., n.d. Microbial Biota of the Human Intestine: 17.

S -

- Schiperski, F., 2018. Turbidity as an Indicator of Contamination in Karst Springs: A Short Review, in: White, W.B., Herman, J.S., Herman, E.K., Rutigliano, M. (Eds.), Karst Groundwater Contamination and Public Health, Advances in Karst Science. Springer International Publishing, pp. 127–139.
- Schlüter, A., Szczepanowski, R., Kurz, N., Schneiker, S., Krahn, I., Pühler, A., 2007. Erythromycin Resistance-Conferring Plasmid pRSB105, Isolated from a Sewage Treatment Plant, Harbors a New Macrolide Resistance Determinant, an Integron-Containing Tn402-Like Element, and a Large Region of Unknown Function. Appl Environ Microbiol 73, 1952–1960. https://doi.org/10.1128/AEM.02159-06
- Schwartz, T., Kohnen, W., Jansen, B., Obst, U., 2003. Detection of antibiotic-resistant bacteria and their resistance genes in wastewater, surface water, and drinking water biofilms. FEMS Microbiology Ecology 43, 325–335. <u>https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2003.tb01073.x</u>
- Sellers, W.D., 1969. A Global Climatic Model Based on the Energy Balance of the Earth-Atmosphere System. J. Appl. Meteor. 8, 392–400. <u>https://doi.org/10.1175/1520-0450(1969)008<0392:AGCMBO>2.0.CO;2</u>
- Seo, H., Kim, J., Jung, J., Jin, H.M., Jeon, C.O., Park, W., 2012. Complexity of cell-cell interactions between Pseudomonas sp. AS1 and Acinetobacter oleivorans DR1: metabolic commensalism, biofilm formation and quorum quenching. Research in Microbiology 163, 173–181. https://doi.org/10.1016/j.resmic.2011.12.003
- Simões, L.C., Simões, M., Vieira, M.J., 2008. Intergeneric Coaggregation among Drinking Water Bacteria: Evidence of a Role for Acinetobacter calcoaceticus as a Bridging Bacterium. Appl. Environ. Microbiol. 74, 1259–1263. <u>https://doi.org/10.1128/AEM.01747-07</u>
- Sinreich, M., Pronk, M., Kozel, R., 2014. Microbiological monitoring and classification of karst springs. Environ Earth Sci 71, 563–572. <u>https://doi.org/10.1007/s12665-013-2508-7</u>
- Slimani, S., 2009. Les fonctionnements hydrologiques de l'aquifère karstifié de la Craie de Haute-Normandie : conséquences des contextes morphologiques et structuraux. Thèse de doctorat, Hydrogéologie. Rouen.
- Slimani, S., Massei, N., Mesquita, J., Valdés, D., Fournier, M., Laignel, B., Dupont, J.-P., 2009. Combined climatic and geological forcings on the spatio-temporal variability of piezometric levels in the chalk aquifer of Upper Normandy (France) at pluridecennal scale. Hydrogeol J 17, 1823. <u>https://doi.org/10.1007/s10040-009-0488-1</u>
- Smart PL, Friedrich H., 1986 Water movement and storage in the unsaturated zone of a maturely karstified carbonate aquifer, Mendip Hills, England. Proc. Conf. Environmental Problems of Karst Terranes and Their Solutions, N
- Smati, M., Clermont, O., Le Gal, F., Schichmanoff, O., Jauréguy, F., Eddi, A., Denamur, E., Picard, B., 2013. Real-Time PCR for Quantitative Analysis of Human Commensal Escherichia coli Populations Reveals a High Frequency of Subdominant Phylogroups. Appl Environ Microbiol 79, 5005–5012. <u>https://doi.org/10.1128/AEM.01423-13</u>
- Smati, M., Clermont, O., Bleibtreu, A., Fourreau, F., David, A., Daubié, A.-S., Hignard, C., Loison, O., Picard, B., Denamur, E., 2015. Quantitative analysis of commensal Escherichia coli populations reveals host-specific enterotypes at the intra-species level. MicrobiologyOpen 4, 604–615. <u>https://doi.org/10.1002/mbo3.266</u>
- Soupir, M.L., Mostaghimi, S., Lou, J., 2008. Die-off of E. coli and enterococci in dairy cowpats. https://doi.org/10.13031/2013.25403
- Stadler, H., Skritek, P., Sommer, R., Mach, R.L., Zerobin, W., Farnleitner, A.H., 2008. Microbiological monitoring and automated event sampling at karst springs using LEOsatellites. Water Science & Technology 58, 899. <u>https://doi.org/10.2166/wst.2008.442</u>
- Stalder, T., Barraud, O., Casellas, M., Dagot, C., & Ploy, M. C., 2012. Integron involvement in environmental spread of antibiotic resistance. Frontiers in microbiology, 3, 119.
- Stewart, P.S., Franklin, M.J., 2008. Physiological heterogeneity in biofilms. Nat. Rev. Microbiol. 6, 199–210. <u>https://doi.org/10.1038/nrmicro1838</u>

Strathmann, M., Leon-Morales, C.F., Flemming, H.-C., 2007. Influence of Biofilms on Colloid Mobility in the Subsurface, in: Frimmel, F.H., Von Der Kammer, F., Flemming, H.-C. (Eds.), Colloidal Transport in Porous Media. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, pp. 143–173. <u>https://doi.org/10.1007/978-3-540-71339-5_6</u>

Т

- Tajbakhsh, E., Khamesipour, F., Ranjbar, R., Ugwu, I.C., 2015. Prevalence of class 1 and 2 integrons in multi-drug resistant Escherichia coli isolated from aquaculture water in Chaharmahal Va Bakhtiari province, Iran. Ann Clin Microbiol Antimicrob 14. <u>https://doi.org/10.1186/s12941-015-0096-y</u>
- Tallon, P., Magajna, B., Lofranco, C., Leung, K.T., 2005. Microbial Indicators of Faecal Contamination in Water: A Current Perspective. Water Air Soil Pollut 166, 139–166. https://doi.org/10.1007/s11270-005-7905-4
- Taylor, R., Cronin, A., Pedley, S., Barker, J., Atkinson, T., 2004. The implications of groundwater velocity variations on microbial transport and wellhead protection – review of field evidence. FEMS Microbiology Ecology 49, 17–26. <u>https://doi.org/10.1016/j.femsec.2004.02.018</u>
- Tenaillon, O., Skurnik, D., Picard, B., Denamur, E., 2010. The population genetics of commensal
Escherichia coli. Nature Reviews Microbiology 8, 207–217.https://doi.org/10.1038/nrmicro2298
- Teschler, J.K., Zamorano-Sánchez, D., Utada, A.S., Warner, C.J.A., Wong, G.C.L., Linington, R.G., Yildiz, F.H., 2015. Living in the matrix: assembly and control of *Vibrio cholerae* biofilms. Nature Reviews Microbiology 13, 255–268. <u>https://doi.org/10.1038/nrmicro3433</u>
- Thurston-Enriquez, J.A., Gilley, J.E., Eghball, B., 2005. Microbial quality of runoff following land application of cattle manure and swine slurry. J Water Health 3, 157–171. https://doi.org/10.2166/wh.2005.0015
- Tielen, P., Rosin, N., Meyer, A.-K., Dohnt, K., Haddad, I., Jänsch, L., Klein, J., Narten, M., Pommerenke, C., Scheer, M., Schobert, M., Schomburg, D., Thielen, B., Jahn, D., 2013. Regulatory and Metabolic Networks for the Adaptation of Pseudomonas aeruginosa Biofilms to Urinary Tract-Like Conditions. PLOS ONE 8, e71845. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0071845
- Toleman, M.A., Bennett, P.M., Walsh, T.R., 2006. Common regions e.g. orf513 and antibiotic resistance: IS91-like elements evolving complex class 1 integrons. J. Antimicrob. Chemother. 58, 1–6. <u>https://doi.org/10.1093/jac/dkl204</u>
- Tomczyk-Żak, K., Zielenkiewicz, U., 2016. Microbial Diversity in Caves. Geomicrobiology Journal 33, 20–38. <u>https://doi.org/10.1080/01490451.2014.1003341</u>

- Touchon, M., Hoede, C., Tenaillon, O., Barbe, V., Baeriswyl, S., Bidet, P., Bingen, E., Bonacorsi, S., Bouchier, C., Bouvet, O., Calteau, A., Chiapello, H., Clermont, O., Cruveiller, S., Danchin, A., Diard, M., Dossat, C., Karoui, M.E., Frapy, E., Garry, L., Ghigo, J.M., Gilles, A.M., Johnson, J., Bouguénec, C.L., Lescat, M., Mangenot, S., Martinez-Jéhanne, V., Matic, I., Nassif, X., Oztas, S., Petit, M.A., Pichon, C., Rouy, Z., Ruf, C.S., Schneider, D., Tourret, J., Vacherie, B., Vallenet, D., Médigue, C., Rocha, E.P.C., Denamur, E., 2009. Organised Genome Dynamics in the Escherichia coli Species Results in Highly Diverse Adaptive Paths. PLOS Genetics 5, e1000344. <u>https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1000344</u>
- Toussaint, A., Chandler, M., 2012. Prokaryote genome fluidity: toward a system approach of the mobilome. Methods Mol. Biol. 804, 57–80. <u>https://doi.org/10.1007/978-1-61779-361-5_4</u>
- Towner, K.J., 2009. Acinetobacter: an old friend, but a new enemy. Journal of Hospital Infection, Proceedings of The Lancet Conference on Healthcare-Associated Infections 73, 355–363. https://doi.org/10.1016/j.jhin.2009.03.032
- Tran, N.H., Gin, K.Y.-H., Ngo, H.H., 2015. Fecal pollution source tracking toolbox for identification, evaluation and characterization of fecal contamination in receiving urban surface waters and groundwater. Science of The Total Environment 538, 38–57. <u>https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2015.07.155</u>

U

Unc, A., Goss, M.J., 2004. Transport of bacteria from manure and protection of water resources. Applied Soil Ecology 25, 1–18. <u>https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2003.08.007</u>

V

- Valdes, D., Dupont, J.-P., Massei, N., Laignel, B., Rodet, J., 2006. Investigation of karst hydrodynamics and organization using autocorrelations and T–ΔC curves. Journal of Hydrology 329, 432–443. <u>https://doi.org/10.1016/j.jhydrol.2006.02.030</u>
- 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. <u>https://doi.org/10.1038/ismej.2010.80</u>
- Vogel Richard M., Wilson Ian, Daly Chris, 1999. Regional Regression Models of Annual Streamflow for the United States. Journal of Irrigation and Drainage Engineering 125, 148–157. <u>https://doi.org/10.1061/(ASCE)0733-9437(1999)125:3(148)</u>
- Vörösmarty, C.J., Green, P., Salisbury, J., Lammers, R.B., 2000. Global Water Resources: Vulnerability from Climate Change and Population Growth. Science 289, 284–288.

222

-

W

- Wada, Y., Beek, L.P.H. van, Kempen, C.M. van, Reckman, J.W.T.M., Vasak, S., Bierkens, M.F.P., 2010. Global depletion of groundwater resources. Geophysical Research Letters 37. <u>https://doi.org/10.1029/2010GL044571</u>
- Walk, S.T., Alm, E.W., Calhoun, L.M., Mladonicky, J.M., Whittam, T.S., 2007. Genetic diversity and population structure of Escherichia coli isolated from freshwater beaches. Environmental Microbiology 9, 2274–2288. <u>https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2007.01341.x</u>
- Walker, D.I., McQuillan, J., Taiwo, M., Parks, R., Stenton, C.A., Morgan, H., Mowlem, M.C., Lees, D.N., 2017. A highly specific Escherichia coli qPCR and its comparison with existing methods for environmental waters. Water Research 126, 101–110. https://doi.org/10.1016/j.watres.2017.08.032
- Wang, A., Lin, B., Sleep, B.E., Liss, S.N., 2011. The Impact of Biofilm Growth on Transport of Escherichia coli O157:H7 in Sand. Groundwater 49, 20–31. <u>https://doi.org/10.1111/j.1745-6584.2010.00690.x</u>
- Waters, E.M., Rowe, S.E., O'Gara, J.P., Conlon, B.P., 2016. Convergence of Staphylococcus aureus Persister and Biofilm Research: Can Biofilms Be Defined as Communities of Adherent Persister Cells? PLOS Pathogens 12, e1006012. <u>https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1006012</u>
- Weaver, L., Karki, N., Mackenzie, M., Sinton, L., Wood, D., Flintoft, M., Havelaar, P., Close, M., 2016. Microbial transport into groundwater from irrigation: Comparison of two irrigation practices in New Zealand. Science of The Total Environment 543, 83–94. <u>https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2015.09.075</u>
- Wilhartitz, I.C., Kirschner, A.K.T., Stadler, H., Herndl, G.J., Dietzel, M., Latal, C., Mach, R.L., Farnleitner, A.H., 2009. Heterotrophic prokaryotic production in ultraoligotrophic alpine karst aquifers and ecological implications. FEMS Microbiol Ecol 68, 287–299. <u>https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2009.00679.x</u>
- Willems, L., Vicat, J.-P., Pouclet, A.,1999. Karst dans les micaschistes d'Akok Bekoé (Sud-Cameroun), Bulletin de la Société géographique de Liège 37 (1999) 5–18.
- Willems, L., Compère, P., Hatert, F., Pouclet, A., Vicat, J.P., Ek, C., Boulvain, F., 2002. Karst in granitic rocks, South Cameroon: cave genesis and silica and taranakite speleothems. Terra Nova 14, 355–362. <u>https://doi.org/10.1046/j.1365-3121.2002.00429.x</u>
- Wingender, J., Flemming, H.-C., 2011. Biofilms in drinking water and their role as reservoir for pathogens. International Journal of Hygiene and Environmental Health, The second European PhD students workshop: Water and health? Cannes 2010 214, 417–423. https://doi.org/10.1016/j.ijheh.2011.05.009
- Wong, K., Fong, T.-T., Bibby, K., Molina, M., 2012. Application of enteric viruses for fecal pollution source tracking in environmental waters. Environment International 45, 151–164. <u>https://doi.org/10.1016/j.envint.2012.02.009</u>

W -

Wright, M.S., Baker-Austin, C., Lindell, A.H., Stepanauskas, R., Stokes, H.W., McArthur, J.V., 2008. Influence of industrial contamination on mobile genetic elements: class 1 integron abundance and gene cassette structure in aquatic bacterial communities. The ISME Journal 2, 417–428. <u>https://doi.org/10.1038/ismej.2008.8</u>

Y

Yu, S., He, L., Lu, H., 2016. An environmental fairness based optimisation model for the decisionsupport of joint control over the water quantity and quality of a river basin. Journal of Hydrology 535, 366–376. <u>https://doi.org/10.1016/j.jhydrol.2016.01.051</u>

Ζ

- Zhang, J., Li, W., Chen, J., Qi, W., Wang, F., Zhou, Y., 2018. Impact of biofilm formation and detachment on the transmission of bacterial antibiotic resistance in drinking water distribution systems. Chemosphere 203, 368–380. <u>https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2018.03.143</u>
- Zhang, X.-X., Zhang, T., Fang, H.H.P., 2009a. Antibiotic resistance genes in water environment. Appl Microbiol Biotechnol 82, 397–414. <u>https://doi.org/10.1007/s00253-008-1829-z</u>
- Zhang, X.-X., Zhang, T., Zhang, M., Fang, H.H.P., Cheng, S.-P., 2009b. Characterization and quantification of class 1 integrons and associated gene cassettes in sewage treatment plants. Appl Microbiol Biotechnol 82, 1169–1177. <u>https://doi.org/10.1007/s00253-009-1886-y</u>
- Zwahlen, F., 2004. Union européenne. Direction générale de la recherche, & Coopération européenne dans le domaine de la recherche scientifique et technique. COST Action 620: vulnerability and risk mapping for the protection of carbonate (karst) aquifers. Office for Official Publications of the European Communities.

Table des illustrations -

Table des illustrations

FIGURE 1: LES AQUIFERES KARSTIQUES SONT PRESENTS SUR TOUS LES CONTINENTS, SOUS TOUTES LES LATITUDE.	12
FIGURE 2: BLOC DIAGRAMME PRESENTANT L'HYDROLOGIE ET LES FORMATIONS SUPERFICIELLES	12
CARACTERISTIQUES DES HYDROSYSTEMES KARSTIQUES (BAKALOWICZ, 1999)	16
FIGURE 3: DESCRIPTION SCHEMATIQUE DU PROCESSUS DE KARSTIFICATION QUI DETERMINE LA STRUCTURE	
HYDROGEOLOGIQUE DU MILIEU KARSTIQUE ET LE COMPORTEMENT HYDRODYNAMIQUE DE LA SOURCE	16
FIGURE 4: IL EXISTE DEUX TYPES DE KARST DEFINIS EN FONCTION DE LA NATURE DE LEUR IMPLUVIUM : (A) KARST LINAIRE (B) KARST BINAIRE (MARSAUD 1996)	Т 18
FIGURE 5: LES DIFFERENTES ZONES D'UN HYDROSYSTEME KARSTIQUE ET LES FLUX D'EAU ASSOCIES LES FLECHE	S
NOIRES REPRESENTENT LE FLUX RAPIDE ET LES FLECHES GRISES ET ROSE LE FLUX LENT (COST ACTION 05)) 18
FIGURE 6: LE SOL, PREMIER MILIEU D'ECHANGE ENTRE L'EAU ET L'AQUIFERE KARSTIQUE	18
FIGURE 7: MODELE CONCEPTUEL DE STOCKAGE ET TRANSPORT DANS UN AQUIFERE KARSTIQUE (MODIFIE D'APRE LOOP ET WHITE, 2001).	.s 20
FIGURE 8: OUALITE MICROBIOLOGIOUE DES EAUX DISTRIBUEES EN NORMANDIE EN 2017 OU LA TOTALITE DE LA	
RESSOURCE EN EAU A DESTINATION DE LA CONSOMMATION HUMAINE EST D'ORIGINE KARSTIOUE	20
FIGURE 9: LA POPULATION N'AYANT PAS ACCES AU MOINS A DES SERVICES ELEMENTAIRES	
D'APPROVISIONNEMENT EN EAU DE BOISSON, EST PRINCIPALEMENT LOCALISEE SUR LE CONTINENT AFRICAI	٧.
D'APRES L'OMS, DONNEES : 2015 (RAPPORT JMP 2017, PROGRES EN MATIERE D'EAU, D'ASSAINISSEMENT	ว ว
FIGURE 10 : DANS LES PAYS INDUSTRIALISES. DES EPISODES DE GASTRO-ENTERITES D'ORIGINE HYDRIOUE	<u> </u>
PEUVENT SURVENIR PONCTUELLEMENT	22
FIGURE 11: PUBLICATIONS COMPORTANT LE TERME « ESCHERICHIA COLI » PUBLIEES PAR ANNEE. (PUBMED,	
27/08/2018)	28
FIGURE 12 : ESCHERICHIA COLI OBSERVEE EN MICROSCOPIE ELECTRONIQUE A BALAYAGE (CAPITANI ET AL., 2006).	28
FIGURE 13: REPRESENTATION SCHEMATIQUE DE L'ARBRE PHYLOGENETIQUE DES MICROORGANISMES RESIDANT	
DANS LE COLON CHEZ L'ÊTRE HUMAIN (CHENG ET AL., 2013).	28
FIGURE 14: LES SITES D'INFECTIONS PAR E. COLI CHEZ L'ÊTRE HUMAIN (CROXEN ET FINLAY, 2010)	30
FIGURE 15: LA PROPORTION DE LA POPULATION DE E. COLI RESISTANTES AUX ANTIBIOTIQUES EST EN	
AUGMENTATION CONSTANTE DANS LES SELLES DES HABITANTS DE PARIS DEPUIS 1980	30
FIGURE 16 : LES INTEGRONS SONT COMPOSES DE TROIS PARTIES	32
FIGURE 17 : LE GENOME DE E. COLI, OU PAN GENOME EST CONSTITUE DE 4500 GENES.	32
FIGURE 18: DIAGRAMME SCHEMATIQUE DU CYCLE DE VIE DE E. COLI DANS L'ENVIRONNEMENT (D'APRES ISHII ET	,
SADUWSKI 2000)	54 54
FIGURE 19 : ARBRE PHYLOGENETIQUE DES PHYLOGROUPES DE E. COLI, D'APRES CLERMIONT ET AL., 2015	54 ;
(A) OU ADHEREES A DES PARTICULES (B) MAIS ELLES PEUVENT EGALEMENT Y PERSISTER DANS LES SEDMENTS (C) EN DIOEU M (D) OU ENCLASSEES DANS LA MATRICE (E) (MODIEUE D'ADDES COLDSCHEIDED	,
ET AL 2006)	28
ET AL., 2000). FIGURE 21: LES BIOEU MS SE EORMENT SUR TOUS TYPES DE SURDOPTS DAD EXEMPLE (Δ) A LA SURFACE DE LA	50
POCHE DANG LINE GROTTE (AUGUST CAVE CREDIT "BUEORD PRINT IR ") (B) ET A L'INTEREACE E AU/AIR	12
Figure 22: (A) Redecentation schemationic des A states de La compation du diosi M	т2 ЛЛ
FIGURE 22: (A) REPRESENTATION SCHEMATIQUE DES 4 ETAFES DE LA FORMATION DU BIOFILM	+4 FC
I F MILIEU DES BACTEDIES EN BIOFILM MODIFIE D'ADDES EI EMMING ET AL 2016	16
FIGURE 24: LA STRUCTURE DE CERTAINS BIOFILMS MONTRE LA CO-AGREGATION D'UN COLONISATEUR PRIMAIRE	10
AVEC LINE ESPECE BACTERIENNE DITE « ORGANISME PONT » (ICLE ATLIM) AVANT UN FORT POLIVOIR	
DE CO-AGREGATION AVEC D'AUTRES ESPECES DITES « COLONISATEURS TARDIFS ». CO-AGREGATION	
BACTERIENNE DANS UN BIOFILM PARODONTAL. MODIFIE D'APRES KARCHED ET AL., 2015.	48
FIGURE 25 : COUPE SCHEMATIOUE DE L'ANTICLINAL DE VILLEOUIER (PLEUVRET EL AL. 1997)	56
FIGURE 26 : LOCALISATION DU SECTEUR D'ETUDE (MASSEI. 2001).	56
FIGURE 27 : PROFIL TOPOGRAPHIOUE DU KARST DE NORVILLE.	58
FIGURE 28: USAGE DES SOLS SUR LE BASSIN VERSANT DU BEBEC (SOURCE: GEOPORTAIL).	58
FIGURE 29: SCHEMA D'ECOULEMENT ET DE TRANSPORT DU KARST DE NORVILLE, (MASSEI, 2001)	50

FIGURE 30: CONTAMINATION MICROBIOLOGIQUE DES EAUX DE L'HYDROSYSTEME KARSTIQUE PAR E. COLI (PETIT ET AL., 2018)
FIGURE 31: SUIVI DE LA CONCENTRATION () ET DE LA STRUCTURE DES POPULATIONS DE E. COLI LORS D'UN
EPISODE DE CRUE, SUIVI PAR LA TURBIDITE () A LA PERTE (MODIFIE D'APRES RATAJCZAK ET AL., 2010) 62
FIGURE 32: ÉOUIPEMENTS DU SITE DE NORVILLE (A) SOURCE DE NORVILLE EOUIPEE DE SONDES
MULTIPARAMETRIOUES. (B) PRELEVEUR ISCO. (C) PLUVIOMETRE INSTALLE DANS LA PLAINE ALLUVIALE DE
LA SEINE
FIGURE 33: CHRONIOLIES DE DONNEES DE (A) TEMPERATURE MOYENNEES PAR MOIS ($)$ (°C). TEMPERATURE
MOYENNE MENSUELLE () (°C) PLUVIOMETRIE CUMULEE PAR MOIS ()(MM) ET PLUVIOMETRIE CUMULEE
MOTENNE MENSUELLE $(-)$
EDITEE PAR METEO FRANCE: (B) CONDUCTIVITE ELECTRIQUE MOVENNEE PAR IOUR ($_{1}$) ($_{1}$ S CM) ET
TURBIDITE MOVENNIEE DAD JOUR () (NTU) ENDECISTDEES A LA SOURCE DU KADST DE NORVILLE : (C)
HALITELID DE LA NADDE DE LA CRAIE () (MNGE) RASSES FALLY () NIVEAU MOVEN () ET HALITES FALLY (
) ENDECISTDEES DAD LE DIEZOMETDE DE FOUDMETOT
), ENREOIS TREES FAR LE FIEZOMETRE DE FOURMETOT
DELEVES SUD 3 SUDDOPTS DIECEDENTS ONT ETE DE ALISEES DOUD DES CONDITIONS DE DI UNIOMETDIE (
, FRELEVES SUR 5 SUFFORTS DIFFERENTS, ONT ETE REALISEES FOUR DES CONDITIONS DE FLUVIOMETRIE ()
VARIEES EN 1001E SAISON DE 2013 A 2017
PIEURE 55. EN CAS DE VARIATIONS DE LA TURBIDITE () ET LA CONDUCTIVITE ELECTRIQUE () AU COURS DU
PRELEVEMENT (A), LES ECHANTILLONS CHOISIS () CORRESPONDENT AU PIC DE TRUBIDITE ET À LA CHUTE
DE CONDUCTIVITE À LA PERTE ET À LA SOURCE AFIN DE REALISER UN SUIVI DE MASSE D'EAU; EN CAS DE
STABILITE DES PARAMETRES HYDROLOGIQUES SUIVIS AU COURS DE LA PERIODE DE PRELEVEMENT (D), 5
ECHANTILLONS SONT MOYENNES
FIGURE 50 : PROTOTYPE DE SUPPORT À BIOFILMS COMPOSE DE CYLINDRES DE CRAIE (RAYON : $0,5$ CM ; HAUTEUR :
2 CM ; AIRE : 7,85 CM ² ; VOLUME : 1,57 CM3) TAILLES DANS (A) UN BLOC DE CRAIE DE NORVILLE, FIXES SUR
(B) LE SUPPORT A BIOFILM MAINTENANT LES CYLINDRES DE CRAIE IMMERGES A LA SOURCE DU KARST DE
NORVILLE : (C) LES CYLINDRES DE CRAIE APRES UNE EXPOSITION D' I AN EN HAUT ET 6 MOIS EN BAS
FIGURE 3'/: LORS D'EVENEMENTS PLUVIEUX UNE PARTIE DE LA HAUTEUR D'EAU DE PLUIE RETOURNE DANS
L'ATMOSPHERE PAR LE PHENOMENE D'EVAPOTRANSPIRATION DEPENDANT DU COUVERT VEGETAL ET DE LA
TEMPERATURE. LA DIFFERENCE ENTRE LA HAUTEUR D'EAU DE PLUIE ET L'EVAPOTRANSPIRATION EST
DISPONIBLE POUR SATURER PROGRESSIVEMENT LE SOL PAR INFILTRATION LENTE, JUSQU'A UN SEUIL
DEPENDANT DE SES PROPRIETES HYDRAULIQUES, AU-DELA DUQUEL UNE PARTIE DE LA HAUTEUR D'EAU DE
PLUIE RUISSELLE A LA SURFACE. MODIFIE D'APRES SMART ET FRIEDERICH, 1986
FIGURE 38: LES CONCENTRATIONS MAXIMALES EN E. COLI DE L'HYDROSYSTEME KARSTIQUE DE NORVILLE ONT
ETE ENREGISTREES LORS D'EVENEMENTS PLUVIEUX SUIVANT UNE PERIODE SECHE. LORS DES EVENEMENTS
PLUVIEUX AU COURS DE PERIODES HUMIDE, LES PICS DE TURBIDITE PEUVENT ETRE DECOLERES DE LA
CONCENTRATION EN E. COLI (LAROCHE ET AL., 2010). CONCENTRATIONS EN E. COLI DES EAUX $()$ DU
BEBEC, ()DE LA PERTE, () DE LA SOURCE, () DU FORAGE EN UFC/100ML ET () LA TURBIDITE EN NTU
(MODIFIE D'APRES LAROCHE ET AL., 2010)
FIGURE 39: ORGANIGRAMME DE CONSTRUCTION ET DE VALIDATION DE L'INDICATEUR DE CONTAMINATION DE
L'EAU PAR E. COLI DE L'HYDROSYSTEME KARSTIQUE DE NORVILLE
FIGURE 40: COMPARAISON DES STRUCTURES DES POPULATIONS DE E. COLI DANS L'EAU DE LA PERTE DU KARST DE
NORVILLE POUR LES CAMPAGNES DE PRELEVEMENTS ANTERIEURES ET POSTERIEURES A L'APPLICATION DES
ARRETES DU 7 MARS 2012 ET 27 AVRIL 2012 RELATIFS A LA MISE AUX NORMES DES FOSSES SEPTIQUES. ()
POUR LE PHYLOGROUPE A,() POUR LE PHYLOGROUPE B1,() POUR LE PHYLOGROUPE B2,() POUR LE
PHYLOGROUPE C,() POUR LE PHYLOGROUPE D,() POUR LE PHYLOGROUPE E, () POUR LE PHYLOGROUPE
F,() POUR LES ESCHERICHIA CLADES ET () POUR LES E. ALBERTII
FIGURE 41: DIAGRAMME DE CONSTRUCTION DE INDICE
FIGURE 42: LES MODELES D'OUDIN (2014) ET PENMAN MONTEITH (1965) DONNENT DES RESULTATS SEMBLABLES
POUR LE CALCUL DE L'EVAPOTRANSPIRATION POTENTIELLE (ETP) SUR UNE ANNEE, CUMUL MENSUEL. ($~$)
ETP CALCULEE D'APRES LE MODELE D'OUDIN ; () ETP CALCULEE D'APRES LE MODELE DE PENMAN
Monteith
FIGURE 43: L'EVAPOTRANSPIRATION POTENTIELLE (PE) CALCULEE D'APRES LE MODELE D'OUDIN SUIT LES
VARIATIONS DE TEMPERATURES LIEES AUX SAISONS. CHRONIQUE DE TEMPERATURE ET DE PE OUDIN DE
2013 A 2017, PAS DE TEMPS JOURNALIER. () PE OUDIN (MM), ET () TEMPERATURE (°C)

FIGURE 44 : L'EVAPOTRANSPIRATION POTENTIELLE (MM) CALCULEE SELON LA METHODE D'OUDIN EST
PROPORTIONELLE A LA TEMPERATURE (°C)
FIGURE 45 : IFP () (DIFFERENCE ENTRE LA PLUVIOMETRIE ET L'ETP) MONTRE UNE MEILLEURE CORRELATION
QU'IFP* () (DIFFERENCE ENTRE LA PLUVIOMETRIE ET LA TEMPERATURE) AVEC LA PLUVIOMETRIE POUR LES
deux classes de temperatures etudiees, respectivement (A) entre 5 et 10° et entre 15° C et 20° C
FIGURE~46:~VARIATIONS~DE~L'EVAPOTRANSPIRATION~POTENTIELLE~(ETP),~LA~PLUVIOMETRIE~ET~L'INDICATEUR~DE
FORÇAGE PLUVIOMETRIQUE (IFP) SUR L'ANNEE 2017. ($)$ ETP en MM, ($)$ pluviometrie en MM et ($)$ IFP
AU PAS DE TEMPS JOURNALIER
FIGURE 47: CHRONIQUE DE PLUVIOMETRIE TURBIDITE ET CONDUCTIVITE ELECTRIQUE A LA SOURCE DU KARST DE
Norville () conductivite electrique moyennee par jour en $\mu S/\text{cm},$ () turbidite moyennee par
JOUR (NTU) ENREGISTREES A LA SOURCE DU KARST DE NORVILLE, () PLUVIOMETRIE CUMULEE PAR JOUR
EN MM ET () EVENEMENTS PLUVIEUX DE 10 MM
FIGURE 48 : LE TEST DE SENSIBILITE DES 9 INDICE PRESENTES DANS LE TABLEAU 8 MONTRENT UNE CORRELATION
EXPONENTIELLE ENTRE LES INDICE A ET D ET LA CONCENTRATION EN E. COLI DE L'EAU DE LA PERTE. (A)
INDICE EN FONCTION DE LA CONCENTRATION EN E. COLI DE L'EAU DE LA PERTE AVEC () INDICE A, ()
INDICE B, () INDICE C, () INDICE D, () INDICE E, () INDICE F, () INDICE G, () INDICE H, () INDICE I
ET (B) LES COURBES DE TENDANCE EXPONENTIELLES DES 9 INDICE
FIGURE 49: CHRONIQUE DE PLUVIOMETRIE, INDICE, IFP ET API (INDICATEUR DE PLUIES ANTERIEURES) POUR LES
MOIS DE JANVIER ET JUIN 2017, PAS DE TEMPS JOURNALIER. () PLUVIOMETRIE CUMULEE PAR JOUR EN MM ()
INDICE, () IFP, ET () API)
FIGURE 50 : LA CHRONIQUE D'INDICE () ET DE PLUVIOMETRIE () DE 2013 A 2017 MONTRE UN COMPORTEMENT
D INDICE VARIABLE EN FONCTION DES SAISONS ET DE LA PLUVIOMETRIE
FIGURE 51 : INDICE EST MAJORITAIREMENT DISTRIBUE ENTRE U ET 1
FIGURE 52: LA REPRESENTATION GRAPHIQUE DE INDICE ET DE LA HAUTEUR DE PLUIE JOURNALIERE SUR UN MOIS D'HIVED ET UN MOIS D'ETE A. ()DI UNIOMETRIE CUMUL EE JOURNALIERE ET () INDICE. ANNEE 2017 P
D HIVER ET UN MOIS D'ETE A. () $FLUVIOMETRIE CUMULEE JOURNALIERE ET () INDICE, ANNEE 2017. D.MISE EN EVIDENCE DU MOIS DE JANVIER C. ET DE HUN, DAS DE TEMPS JOURNALIER. ()$
FIGURE 53: CHRONIQUE DE () DIEEERENTIEL DE TURBIDITE ET () DIEEERENTIEL DE CONDUCTIVITE ELECTRIQUE
MESUBEES A LA SOURCE DI L'ARST DE NORVILLE AU DAS DE TEMPS JOURNALIER ANNIEE 2013 04
Figure 54. Distribution o'Indi $CE($) en conction du discedentiel de tuddidite 04
FIGURE 55 · DISTRIBUTION D'INDICE () EN FONCTION DU DIFFERENTIEL DE CONDUCTIVITE ELECTRIQUE 0
FIGURE 55: DISTRIBUTION D'INDICE () ENTONCTION DU DITTERENTIEL DE CONDUCTIVITE ELECTRIQUE :
E COLIDE L'EAU() DE LA PERTE ET () DE LA SOURCE 96
FIGURE 57: () CONCENTRATION EN E. COLIDANS LES FAUX DE LA PERTE (A ET B) DE L'HYDROSYSTEME
KARSTIOUE DE NORVILLE EN FONCTION DE INDICE POUR UN MEME USAGE DU BASSIN VERSANT 96
FIGURE 58: () CONCENTRATION EN E. COLI DANS LES EAUX DE LA SOURCE DE L'HYDROSYSTEME KARSTIQUE DE
NORVILLE EN FONCTION DE INDICE POUR UN MEME LISAGE DU BASSIN VERSANT 98
FIGURE 59 : STRUCTURE DES POPULATIONS DE E. COLI DANS L'EAU DE LA PERTE EN PRESENCE DE PATURAGE EN
FONCTION DE INDICE () PHYLOGROUPE A.() PHYLOGROUPE B1.() PHYLOGROUPE B2.() PHYLOGROUPE
C,() PHYLOGROUPE D,() PHYLOGROUPE E, () PHYLOGROUPE F, () ESCHERICHIA CLADES ET () E.
ALBERTII
FIGURE 60 : STRUCTURE DES POPULATIONS DE E. COLI DANS L'EAU DE LA SOURCE EN PRESENCE DE PATURAGE EN
FONCTION DE INDICE () PHYLOGROUPE A,() PHYLOGROUPE B1,() PHYLOGROUPE B2,()
PHYLOGROUPE C,() PHYLOGROUPE D,() PHYLOGROUPE E, () PHYLOGROUPE F,() ESCHERICHIA CLADES
et () E. albertii
FIGURE 61 : POUR INDICE () INFERIEUR A LA VALEUR SEUIL, L'EAU DU CAPTAGE DESINFECTEE PEUT ETRE
DISTRIBUEE ET STOCKEE. EN CAS D'EVENEMENTS PLUVIEUX () MENANT A L'AUGMENTATION D'INDICE AU-
DELA DE LA VALEUR SEUIL () L'EAU DU CAPTAGE PEUT SOIT ETRE D'AVANTAGE DESINFECTEE OU CESSER
D'ETRE DISTRIBUEE
FIGURE 62: LE CHEMOSTAT DANS LES CONDITIONS DE L'EXPERIENCE : LE CHEMOSTAT EST POSE SUR UN
AGITATEUR MAGNETIQUE, LE MILIEU STERILE EST POMPE DE LA BOUTEILLE (A DROITE), FILTRE (STERILE
FILTER UNIT WITH DURAPORE $\ensuremath{\mathbb{B}}$ PVDF Membrane, 0,22mm) avant d'etre introduit dans le
BIOREACTEUR

FIGURE 63: REPRESENTATION SCHEMATIQUE DU DEROULE DE L'EXPERIMENTATION EN CHEMOSTAT AU COURS TEMPS. () PROPORTION DE LB ET () PROPORTION DE GLUCOSE DANS LE MILIEU D'ALIMENTATION DU		
CHEMOSTAT		
FIGURE 64: GRAPHIQUE DE LA CHRONIQUE DES CONDITIONS HYDROLOGIQUES (INDICE) ET USAGE DU BASSIN VERSANT (PERIODES PATUREES) DURANT LA PERIODE D'INCUBATION DES TROIS SUPPORTS A BIOFILMS.(
)INDICE,() PRELEVEMENTS DE BIOFILMS, ET () PERIODES DE PATURAGE SUR LE BASSIN VERSANT 120		
FIGURE 65 : ORGANIGRAMME DE L'ANALYSE DES BIOFILMS, EN BLEU LES ETAPES REALISEES APRES DISSOCIATION DES BIOFILMS, EN GRIS LES ETAPES REALISEES APRES DISSOCIATION DES BIOFILMS ET EXTRACTION DE		
L'ADN ET EN JAUNE L'ETAPES REALISEES APRES MARQUAGE DES BIOFILMS		
FIGURE 66: EVOLUTION DE LA DENSITE EN E. COLI EN FONCTION DU TEMPS DANS LE CHEMOSTAT. LE SUIVI A ETE REALISE PAR MESURE DE LA TURBIDITE (1 UDO= 2,68.108 UFC/ML)		
FIGURE 67 : FORMATION DE BIOFILMS SUR LES PASTILLES DE CRAIE IMMERGEES DANS LE REACTEUR APRES 20 JOURS DE CULTURE CONTINUE D' E. COLI (EC1286) (PASTILLE DE DROITE) ; PASTILLE DE CRAIE GRATTEE		
POUR RECUPERER LA BIOMASSE (PASTILLE DE GAUCHE)		
FIGURE 68: OCCURRENCE D'E. COLI CULTIVABLE (UFC/CM ²) ET DE BACTERIES TOTALES VIABLES		
(BACTERIES/CM ²) APRES 20 JOURS DE CULTURE EN CHEMOSTAT SUR DE LA CRAIE		
FIGURE 69: MICROGRAPHES OBTENUS PAR MICROSCOPIE ELECTRONIQUE A BALAYAGE APRES DESHYDRATATION ET METALLISATION DES PASTILLES DE CRAIES IMMERGEES DANS LE CHEMOSTAT, PENDANT 20 JOURS DE		
CULTURE D' E. COLI EN CONTINU : A GROSSISSEMENT 10 MM, B GROSSISSEMENT 2µM 124		
FIGURE 70: GENRES ET ESPECES BACTERIENNES DONT DES PROTEINES ONT ETE IDENTIFIEES PAR ANALYSE		
PROTEOMIQUE DANS LES BIOFILMS FORMES EN CHEMOSAT. RESULTAT EXPRIME EN POURCENTAGE		
FIGURE 71: (A) PLAN D EXPERIMENTATION POUR RECHERCHER LES BACTERIES CHIMIOORGANOTROPHES AEROBIES AUTOCHTONES DE LA CRAIE NON ELIMINEES PAR LE TRAITEMENT A 121°C 20 MIN (AUTOCLAVE) (B) ESPECES		
BACTERIENNES IDENTIFIEES, DANS LA CRAIE STERILISEE, PAR SEQUENÇAGE		
FIGURE 72: COMPARAISON DE DEUX METHODES DE QUANTIFICATION DE LA DENSITE BACTERIENNE DES BIOFILMS (SUPPORT 1): () LES BACTERIES TOTALES VIABLES DENOMBREES PAR CYTOMETRIE EN PHASE SOLIDE ET () LES BACTERIES TOTALES DENOMBREES PAR QPCR SUR LA BASE DU NOMBRE DE COPIES D'ADNR		
105/CELLULE. L'ECART TYPE EST REPRESENTE PAR LA BARRE VERTICALE, SON ABSENCE SIGNIFIE QU'IL EST		
DE TAILLE INFERIEURE AU SYMBOLE		
FIGURE 73: EVOLUTION DE LA DENSITE DES BACTERIES AU SEIN DES BIOFILM EN FONCTION DE L'AGE DES		
BIOFILMS AVEC () LE NOMBRE DE BACTERIES DETERMINE PAR QUANTIFICATION DU NOMBRE DE COPIES D'ADNR16S. L'ECART TYPE EST DE TAILLE INFERIEURE AU SYMBOLE. () SUPPORT N°1, () SUPPORT N°2. 		
FIGURE 74: REPRESENTATION GRAPHIQUE DE LA MATRICE DE CORRELATION DES PARAMETRES		
ENVIRONNEMENTAUX ET DE LA DENSITE BACTERIENNE DES BIOFILMS. LES CORRELATIONS NON		
SIGNIFICATIVES SONT BARREES D'UNE CROIX. LA TAILLE ET LA COULEUR DES CERCLES CORRESPONDENT AU		
COEFFICIENT DE CORRELATION. EN BLEU LES CORRELATION POSITIVES ET EN ROUGE LES CORRELATIONS		
FIGURE 75: CONDITIONS HYDROLOGIQUES SUR LA PERIODE DU 17/02/2015 AU 06/05/2015 ET DU 01/12/2016 AU		
29/01/2017 AVEC () INDICE ET () DENSITE BACTERIENNE DANS LES BIOFILMS (BACTERIES/CM ²)		
FIGURE 76: LES PHYLA IDENTIFIES DANS LA CRAIE, SONT RETROUVES DANS LES BIOFILMS DONT LA COMMUNAUTE EST ENRICHIE DE BACTERIES DE L'EAU		
FIGURE 77: LA STRUCTURE DES COMMUNAUTES BACTERIENNES IDENTIFIEES PAR SEOUENCAGE (ILLUMINA) EN		
BIOFILM (A) AU NIVEAU DES PHYLA, (B) AU NIVEAU DES GENRES, (C) DATE DES PRELEVEMENTS ET AGE DES BIOFILMS. (*) STRUCTURE DES POPULATIONS BACTERIENNES DES BIOFILMS DU SUPPORT 1		
SIGNIFICATIVEMENT SEMBLABLE (VALEUR P = 0.08); (**) STRUCTURE DES POPULATIONS BACTERIENNES DES		
BIOFILMS DU SUPPORT 2 SIGNIFICATIVEMENT SEMBLABLE (VALEUR P = 0.44); (***) STRUCTURE DES		
POPULATIONS BACTERIENNES DES BIOFILMS DU SUPPORT 3 SIGNIFICATIVEMENT SEMBLABLE (VALEUR P =0.07)		
FIGURE 78: OBSERVATION DES BIOFII MS DE 146 IOURS EN MICROSCOPIE CONFOCALE LASER (LEICA		
MICROSYSTEMS, MANNHEIM, GERMANY) AVEC UN ORIECTIF MACROSCOPIOLE (PLAN APO 2 0X OLIVERTURE		
NUMERIOUE (1.2), SUR LES SUPPORTS EN CRAIE (A) MAROUAGE DE L'ADN INTRACELLULAIRE AU SYTO9 :		
EXCITATION LASER 488 NM - BANDE D'EMISSION 500-550 (B) MAROUAGE DES EPS DE LA MATRICE AVEC		
UNE LECTINE, LA CONCANAVALIN A ; EXCITATION LASER 635 NM – BANDE D'EMISSION 650-700 NM, (C) MARQUAGE DE L'ARN DE E. COLI PAR LA SONDE FISH COLINSITU LASER 532 NM – BANDE D'EMISSION 550-		

600 NM, LES FLECHES BLANCHES DESIGNENT DES E. COLI MARQUEES (D) SUPERPOSITION DES TROIS LES FLECHES BLANCHES DESIGNENT DES E. COLI PRESENTANT LE DOUBLE MARQUAGE SYTO9-COLINE ENCHASSES DANS LA MATRICE D'EPS. ACQUISITION DES 3 MARQUEURS EFFECTUES DE MANIERE SEQUENTIELLE AFIN D'EVITER TOUT CHEVAUCHEMENT SPECTRAL ; LES IMAGES DE BIOFILMS BACTER DOUBLEMENT MARQUEES ONT ETE DECONVOLUEES A L'AIDE DU LOGICIEL HUYGENS (SVI, HILVERSU NETHERLANDS) ET AJUSTEES AVEC LE LOGICIEL IMAGEJ (NIH, BETHESDA, USA)	IMAGES, SITU IENS JM, THE IIIII DGIQUES
PERIODES DE PATURAGE SUR LE BASSIN VERSANT	134
FIGURE 80: EVOLUTION DE LA DENSITE DE E. COLI CULTIVABLES (UFC/CM ²) DANS LES BIOFILMS SUR LES DIFFERENTS SUPPORTS EN FONCTION (A) DE L'AGE DES BIOFILMS(B) DU NOMBRE D'EVENEMENTS POTENTIELS DE CONTAMINATION AUQUEL LES BIOFILMS ONT ETE EXPOSES () SUPPORT 1, () SUPPOR	rt 2, ()
SUPPORT 3 : LES BARRES VERTICALES REPRESENTENT L'ECART TYPE.	134
FIGURE 81: STRUCTURE DES POPULATIONS DE E. COLI CULTIVABLES EN FONCTION DE L'USAGE DU BASSIN VERSANT AVEC POUR LE PHYLOGROUPE A, POUR LE PHYLOGROUPE B1, POUR LE PHYLOGROUPE D, POUR LE PHYLOGROUPE E, POUR LE	че B2,
PHYLOGROUPE F, POUR LES ESCHERICHIA CLADES ET POUR LES E. ALBERTII, ; (*) STRUCTURE D	ES
POPULATION SIGNIFICATIVEMENT SEMBLABLE (VALEUR P= $0,07$); (**) STRUCTURE DES POPULATION	S
SIGNIFICATIVEMENT SEMBLABLE (VALEUR P =0,25).	136
FIGURE 82: QUANTIFICATION DE E. COLI DANS LES BIOFILMS DU SUPPORT 2 ET DE L'INTEGRON CLINIQUE D	Æ
CLASSE I DANS LES BIOFILMS ET LES SOUCHES DE L. COLI CIRCULANT DANS L'EAU. () LES BARRES J.	AUNES
REPRESENTENT L'ABONDANCE RELATIVE DE L'OLL DANS LA COMMUNAUTE BACTERIENNE TOTALE SEQUENCEE DES DIQUEUMS, LA QUANTIEICATION DE \mathbf{E} , COLLET DE L'INTECDON DE CLASSE 1 A ETE DE	ALICEE
SEQUENCEE DES BIOFILMS. LA QUANTIFICATION DE E. COLI ET DE L'INTEGRON DE CLASSE I À ETE RE DAD OPCE SUD L'ADN EXTRAIT DES BIOFILMS. DANS L'EAU DE SOUDCE LE GENE INTÉL A ETE DECHE	ALISEE
PAR QI CR SUR E ADIN EXTRAIT DES BIOFILMIS. D'ANS E EAU DE SOURCE LE GENE INTEL À ETE RECHE D'ANS LES SOURCHES DE F. COLLICIU TIVABLES DAD PCR NA · DESUI TAT NON ACOUIS	136
FIGURE 83: DES BACTERIES PATHOGENES OPPORTINISTES SONT NATURELI EMENT PRESENTES DANS	150
L'ENVIRONNEMENT AQUATIQUE ET CERTAINES ONT LA CAPACITE DE PERSISTER SUR DE LONGUES PER	RIODES
et de se multiplier dans des biofilms. Modifie d'apres Wingender et Flemming, 2011	138
FIGURE 84: HISTOGRAMME REPRESENTANT LA COMPOSITION DES COMMUNAUTES BACTERIENNES IDENTIFI	IEES EN
BIOFILM DANS CE TRAVAIL ET CELLES IDENTIFIEES DANS DES ENVIRONNEMENTS SOUTERRAINS. LA	
COMMUNAUTE BACTERIENNE IDENTIFIEE DANS LES BIOFILMS DU KARST DE NORVILLE EST	
SIGNIFICATIVEMENT SEMBLABLE AUX COMMUNAUTES BACTERIENNES MOYENNES DE 18 GROTTES	140
FIGURE 85: REPRESENTATION SCHEMATIQUE DES PARAMETRES PRIS EN COMPTE PAR INDICE.	148
TABLEAU 1: DIRECTIVE EUROPEENNE 2006/7/CE POUR LA QUALITE MICROBIOLOGIQUE DES EAUX A USAG	E
RECREATIF	24
TABLEAU 2: DIRECTIVE EUROPEENNE 98/83/CE POUR LA QUALITE MICROBIOLOGIQUE DES EAUX A DESTIN DE LA CONSOMMATION HUMAINE (EAU DU ROBINET APRES TRAITEMENT) IMPOSANT UNE ABSENCE D'	ATION E. COLI
et d'enterocoques dans 100mL	24
TABLEAU 3: LES DIFFERENTES ETAPES DE LA DEMARCHE DE L'EVALUATION DU RISQUE EN MATIERE DE RIS SANITAIRE LIES AUX AGENTS PATHOGENES. D'APRES OMS, DIRECTIVE POUR LA QUALITE DE L'EAU D	QUE E
BOISSON, 4 ^{eme} EDITION.	
TABLEAU 4: LES 8 PATHOVARS DE E. COLI CIBLENT DIFFERENTS SITES D'INFECTIONS	30
TABLEAU 5 : STRUCTURE DES POPULATIONS DE E. COLI D'ANIMAUX D'ELEVAGE, DOMESTIQUES ET SAUVA	GES.
POURCENTAGE DE SOUCHES DE E. COLI IDENTIFIEES COMME APPARTENANT À CHAQUE PHYLOGROUPI	E
(IDENTIFICATION PAR LA METHODE CLERMONT (2013)) SUIVI DU NOMBRE DE SOUCHE N CORRESPONT ENTRE DADENTHESES. NA SIGNIEIE QUE LES CLADES N'ONT DAS ETE DECHEDCHES	JAN I 36
TABLEAU 6: CONCENTRATION EN E. COLUDANS LES CLADES IN ONT LAS ETE RECHERCHES.	
TABLEAU 7: LES CAMPAGNES DE PRELEVEMENT REALISEES DE FEVRIER 2007 A DECEMBRE 2017 ONT PERM	11S DE
CONSTITUER UNE COLLECTION DE 1079 SOUCHES DE E. COLI. LES CAMPAGNES DE PRELEVEMENT	
SURLIGNEES EN BLEU ONT ETE REALISEES ANTERIEUREMENT A CES TRAVAUX PAR M. RATAJCZAK ET	E.
LAROCHE	78
TABLEAU 8: REPONSE HYDROLOGIQUE A LA SOURCE APRES UN EVENEMENT PLUVIEUX DE 10 MM.	88

TABLEAU 9 : PARMIS LES 9 INDICE TESTES DONT LES PARAMETRES K ET $XD - i$ different, les IndiCE A	LET D
PRESENTENT LES MEILLEURS COEFFICIENTS DE CORRELATION AVEC LA CONCENTRATION EN E. COLI I	ЭE
L'EAU DE LA PERTE	88
TABLEAU 10 : Les gammes d'IndiCE de 2013 a 2017 sont semblables avec une moyenne de 3,03 e	XCEPTE
POUR L'ANNEE 2015 EXCEPTIONNELLEMENT SECHE	90
TABLEAU 11: TABLEAU REPRESENTANT LA PROPORTION RELATIVE DES GENRES BACTERIENS IDENTIFIES DA	ANS AU
MOINS 5 CAMPAGNES DE PRELEVEMENT DE BIOFILMS SUR $11.($) genres representant entre 1 et	5% DE
LA COMMUNAUTE BACTERIENNE IDENTIFIEE, ($\)$ entre 5 et 10% et ($\)$ plus de 10%	130
TABLEAU 12: AMORCES UTILISEES POUR LES PCR.	164
TABLEAU 13: COMPOSITION DES MIXS UTILISES POUR LES PCR.	166
TABLEAU 14: CONDITIONS D'AMPLIFICATION UTILISEES POUR LES PCR	166

Table des illustrations -

Table des illustrations -

Abstract

In order to assess environmental conditions leading to contamination of a rural karstic hydrosystem this study combine hydrogeology, and environmental microbiology. We focused on a well-characterized chalk karstic hydrosystem (Norville, France) vulnerable to microbiological pollution, of the French national observatory network on karst (INSU/CNRS). Temperature and hydrological time series (pluviometry, turbidity and electrical conductivity) over the past 5 years were analysed in order to correlate hydrological condition leading to run-off on the watershed and *E. coli* contamination of the hydrosystem. Fifteen sampling campaigns of water and biofilms were carried out in different hydrological conditions, on the surficial watershed (i.e. the upstream part of the system) and at the spring downstream. That has been used to determine periods more subject to soil bacteria leaching and input in the hydrosystem. Finally, relationships between abundance and genetic diversity (phylogroup distribution) of *E. coli* population in the hydrosystem waters, hydrological conditions and land use were investigated.

An hydrological indicator (IndiCE) based on the analysis of pluviometry, conductivity, turbidity and temperature time series has been constructed to assess the vulnerability of such karstic hydrosystem to *E. coli* contamination according to hydrological conditions. The role of karstic biofilm as pathogens reservoir and class 1 integrons, responsible of secondary contamination, has been studied recording *E. coli* occurrence in karstic biofilms sampled at Norville's spring. It has been showed in reactor *E. coli* capacity to form biofilms on chalk in oligotrophic conditions. In situ cultivable *E. coli* and class 1 integrons can integrate autochthonous biofilms transiently. *E. coli* population structure in biofilms is significantly the same than in spring water.

This thesis work allowed to a better understanding of *E. coli* contamination dynamic in water and biofilm of karstic hydrosystem.

Key words: karstic hydrosystem, sanitary risk, Escherichia coli, biofilms

Résumé

Dans le but de caractériser les conditions environnementales, hydrologiques et d'usage des sols, menant à la contamination d'un système karstique cette étude combine hydrogéologie et microbiologie environnementale. Les chroniques de température et d'hydrologie (pluviométrie, turbidité, conductivité) de l'hydrosystème karstique de Norville (SO Karst) des 5 dernières années ont été analysées pour trouver une corrélation entre les conditions hydrologiques menant au ruissellement sur le bassin versant et la contamination par *E. coli* de l'hydrosystème (eau et biofilms). Quinze campagnes de prélèvement d'eau à l'entrée (la perte) et la sortie (la source) du système et de biofilms ont été réalisées. La relation entre l'abondance et la diversité génétique (distribution des phylogroupes) des populations de *E. coli* circulant dans l'hydrosystème et les conditions hydrologiques et d'usage des sols a été étudiée.

Un indicateur de contamination des eaux par *E. coli* (IndiCE) basé sur l'enregistrement de la température et la pluviométrie et corrélé avec la contamination d'eau de surface et sous terraine par *E. coli* d'un hydrosystème karstique, simple d'utilisation est proposé. Le rôle de réservoir de pathogène des biofilms karstiques, responsable de contamination secondaire, a été étudié en suivant l'occurrence de *E. coli* et des intégrons de classe 1 dans des biofilms formés à la source de l'hydrosystème karstique de Norville. Il a été montré en chemostat la capacité de *E. coli* à former des biofilms sur la craie en condition oligotrophique. *In situ E. coli* et les integrons de classe 1 peuvent s'associer à des biofilms autochtones sous forme cultivable transitoirement.

L'ensemble de ces travaux de thèse a permis de mieux comprendre la dynamique de la contamination par *E. coli* des hydrosystèmes karstiques, dans l'eau et les biofilms.

Mots clefs: hydrosystème karstique, risque sanitaire, Escherichia coli, biofilms