



RAPPORT D'AVANCEMENT 2023

**ACTION 1.1 – SOURCES ET FLUX DE PATHOGÈNES DANS
LES REJETS PLUVIAUX**

RAPPEL DU CONTEXTE ET DES OBJECTIFS

Durant ces dernières décennies la qualité des eaux de surface s'est généralement améliorée en Europe, grâce à l'application de la réglementation 91/271/CEE, à l'amélioration des performances de traitement des stations d'épuration (STEU) et des réseaux d'assainissement (Borja et al., 2020). Toutefois, en Ile-de-France, les rivières telles que la Marne reçoivent encore un grand nombre de rejets d'origines très diverses (rejets de stations de traitement des eaux usées, rejets de temps de pluie, ruissellement sur les surfaces contaminées, rejets des bateaux, déjections d'animaux...). Ces sources contribuent à une pollution microbiologique importante des eaux de surface, qui peut impacter l'utilisation de cette ressource en eau pour les activités récréatives. Ainsi se baigner dans une eau polluée par des contaminations fécales comporte le risque de s'exposer à des infections entériques, respiratoires et dermiques, incluant les origines zoonotiques (Ashbolt et al., 2010). Pour une estimation complète des risques microbiologiques liés à l'utilisation des eaux de surface pour la baignade, il est nécessaire d'évaluer les concentrations en pathogènes en plus des bactéries indicatrices de contamination fécale réglementaires (BIF), à la fois dans les sources de contamination (rejets) et dans les eaux de surface. D'après des études récentes, les virus entériques (surtout les *Adenovirus*, *Rotavirus* et *Norovirus*), les *Campylobacter* spp., les *Cryptosporidium* et les *Giardia* sont des agents étiologiques d'intérêt majeur pour les nageurs (Haile et al., 1999; Mons et al., 2009; Prevost et al., 2015; Eregno et al., 2016). De plus, l'émergence ces dernières années de bactéries multirésistantes aux antibiotiques (notamment dans les rejets hospitaliers) représente un enjeu majeur pour l'Organisation Mondiale de la Santé. Cependant la variabilité spatiale et temporelle de la qualité microbiologique des eaux urbaines et des rejets reste mal connue du fait de la diversité des sources de pollution et de la variabilité des conditions hydro-météorologiques. Ce manque de connaissance de la distribution et la concentration des divers pathogènes présents dans les milieux aquatiques et dans les sources de contamination rend difficile la maîtrise des contaminations et la gestion des sites de baignade.

Dans le cadre du programme OPUR, un travail de caractérisation microbiologique des rejets de station de traitement des eaux usées (STEU) avait été entamé lors des deux précédentes phases, que ce soit pour les virus entériques, les mycobactéries, *Campylobacter jejuni* ou les salmonelles (Radomski et al., 2011, Lucas et al., 2014). Cependant, les données sur la qualité microbiologique des eaux circulant dans les réseaux d'assainissement pluviaux par de temps de pluie et temps sec en région parisienne restent pour l'instant éparées, en particulier pour les concentrations en pathogènes dans les rejets urbains de temps de pluie.

Le but du thème R1.1 est, de caractériser la contribution des différents types de sources diffuses et ponctuelles de pathogènes d'origine hydrique et de bactéries résistantes aux antibiotiques afin de mieux évaluer et prédire les risques d'exposition. Ceci nécessite d'acquérir de la connaissance sur les niveaux et la nature de la contamination dans différents types de rejets de temps de pluie. Dans le cadre du thème R1.1, l'étude a été menée sur la période 2020-2023 afin de caractériser la contribution des différents types de sources diffuses et ponctuelles de pathogènes d'origine hydrique à la contamination de la Marne. Les ouvrages d'assainissement étudiés ont été choisis pour représenter des situations contrastées en terme de bassin versant d'apport en eaux usées et eaux pluviales: allant des eaux usées en entrée et sortie de STEU, à des réseaux d'assainissement

séparatifs. Ce projet, porté par le LEESU, associe le laboratoire Biologie Recherche d'Eau de Paris et le laboratoire M2C (Université de Rouen). Il s'appuie sur une collaboration scientifique et technique étroite avec différents gestionnaires du Conseil Départemental de la Seine-Saint-Denis, du Conseil Départemental du Val de Marne, et du Syndicat Intercommunal d'Assainissement de Marne-la-Vallée (SIAM).

Le projet porte sur un ensemble de pathogènes viraux et bactériens, des gènes de résistance aux antibiotiques, les indicateurs de contamination fécale réglementaires et des indicateurs viraux et bactériens plus spécifiques de sources fécales humaines et animales. Différents sites de prélèvement sont échantillonnés : entrée et sortie de la STEU de Saint Thibault-des-Vignes, rejet du Centre Urbain (Noisy-le-Grand), bassin de rétention des eaux pluviales de Sucy-en-Brie, ru de la Lande (Champigny-Marne). Des rejets de temps sec et de temps de pluie ont été échantillonnés.

Les résultats permettront :

- i) d'avoir une meilleure compréhension de la dynamique et de la distribution de différents pathogènes bactériens et viraux dans les rejets de temps de pluie et les eaux de ruissellement
- ii) d'avoir une meilleure compréhension des gènes de résistances aux antibiotiques dans les rejets de temps de pluie et les eaux de ruissellement
- iii) de mieux connaître l'origine des sources de contamination dans les eaux de surface
- iv) d'identifier par modélisation statistique des facteurs physico-chimiques liés à la qualité microbiologique des rejets qui pourraient servir de proxy pour le suivi de la qualité des rejets.

MATERIEL ET METHODES

Echantillonnage

L'entrée et la sortie de la station de traitement des eaux usées de Saint Thibault-des Vignes (SIAM), ont été échantillonnées par préleveur automatique (échantillons moyens intégrés sur 24h) sur une période allant du 29 juin au 4 octobre 2021. Pour les effluents des réseaux pluviaux les échantillons ont été collectés par préleveur automatique : échantillon moyen de 24 h en temps sec, et échantillon moyen à l'évènement pour le temps de pluie (déclenchement au seuil). Les réseaux pluviaux concernés étaient le Centre Urbain à Noisy-le-Grand (rue Baron Louis, du 3 mai au 9 septembre 2022), l'entrée du bassin de rétention des eaux pluviales de Sucy-en-Brie (du 18 septembre au 7 novembre 2022), le ru de la Lande à Champigny-sur-Marne (rue de la Plage, du 24 mai au 1^{er} juillet 2023). Pour chaque site, 4 échantillons de temps sec et 4 à 5 échantillons de temps de pluie ont été prélevés. Les échantillons ont été stockés à 4°C jusqu'au laboratoire. Pour la mesure des virus, 10 L d'échantillons ont été concentrés selon Wurtzer et al. (2014), pour la mesure des bactéries par biologie moléculaire 1 L d'échantillon a été centrifugé selon Roguet et al. (2016). Pour caractériser la matière organique par fluorescence, 20 mL ont été filtrés sur membrane GF/F et stockés à 4°C jusqu'à la mesure selon Goffin et al. (2018).

Paramètres mesurés

Les paramètres physico-chimiques suivants ont été mesurés : conductivité spécifique ($\mu\text{S.cm}^{-1}$), ammonium (mg N.mL^{-1}), ammoniacque (mg N.mL^{-1}), nitrates (mg N.mL^{-1}) par sondes ISY, et la turbidité par néphélométrie (NTU) à l'aide d'un turbidimètre HACH. Pour les échantillons de la STEU, les nitrites, nitrates, l'ammonium, l'azote Kjeldhal, les phosphates totaux, la DBO5 et la DCO ont également été analysés par le laboratoire du SIAM selon les normes AFNOR.

La concentration en *E. coli* et en entérocoques intestinaux (exprimée en nombre le plus probable NPP /100ml) a été déterminée dans les 8 h suivant la collecte des échantillons par ensemencement sur les microplaques MUG/EC et MUD/SF (BioRad) selon la méthode de référence NF EN ISO 9308-3 pour *E. coli* et NF EN ISO 7899-1 pour les entérocoques intestinaux (EI), tout en adaptant les dilutions selon les sites pour optimiser les limites de détection. Le calcul de la concentration en NPP/100 ml dans un intervalle de confiance de 95% a été réalisé à l'aide d'une feuille de calcul Excel® publiée par Jarvis et al. (2010).

Les acides nucléiques des virus ont été extraits selon Wurtzer et al. (2014). Les indicateurs viraux spécifiques de sources humaines (Phages à ARN F spécifiques de groupe 2, PMMoV et CrAssphages) ont été mesurés par PCR quantitative en temps réel (qPCR et RT-qPCR), respectivement selon Ogorzaly et Gantzer (2006), Haramoto et al. (2013) et Stachler et al. (2017). Les entérovirus, les adénovirus (groupes A, B, C, D, E, F et G), les rotavirus A et les norovirus de groupes I et II ont été mesurés selon Prevost et al. (2015). La méthode d'amplification de gènes viraux quantifie des virus à la capside intègre selon la méthode de Prévost et al. (2016) utilisant un intercalant. Les ADN bactériens ont été extraits selon Roguet et al. (2016). Le gène de l'ARNr 16S des Bacteroides indicateurs de sources humaines (HF183, selon Haugland et al., 2010), canines (marqueur génétique BacCan, selon Kildare et al., 2007), aviaires (marqueur Gull2 *Catelicoccus marimammalium* selon Ryu et al., 2012 et marqueur CGOF1 pour les oies bernaches selon Frenaux et al., 2010) ont été quantifiés par qPCR. Les *Campylobacter jejuni*, et *C. lari* ont été quantifiés par qPCR selon Vondrakova et al., 2014). Les bactéries totales ont été quantifiées selon le protocole de Liu et al. (2012) par qPCR. Les résultats sont exprimés en unité de génome (ug) par litre.

La mesure de la matière organique par spectroscopie fluorescente (FDOM) a été réalisée sur les échantillons filtrés par le spectrofluorimètre Jasco FP-8300 (Japan) à 20 °C. Les spectres d'émission ont été acquis avec des intervalles de 5 nm à des longueurs d'onde d'excitation entre 240 et 450 nm, et à des intervalles de 2 nm à des longueurs d'onde d'émission entre 250 et 600 nm (selon Goffin et al., 2018). Les spectres obtenus sont analysés avec le logiciel Matlab® R2013b software (Mathworks, Natick MA, USA).

Analyses statistiques

Le traitement des données a été réalisé à l'aide du logiciel R (R Core Team, 2020). Les modèles linéaires ont été validés en vérifiant la distribution des variables à expliquer et des résidus, leur homoscedasticité, et l'indépendance des résidus. Les tests post-hoc pour vérifier la différence entre les sites étaient corrigés selon Holm-Bonferroni. Les variables à expliquer n'ayant pas une distribution normale ont été transformées avec une procédure boxcox (bibliothèque MASS). Pour l'analyse hiérarchique les données ont été centrées et réduites, la bibliothèque Hmisc a été utilisée.

PRINCIPAUX RESULTATS

Caractéristiques des campagnes

Les campagnes de temps sec étaient précédées d'au moins 3 jours consécutifs de temps sec. Les événements pluvieux échantillonnés étaient comparables pour les 4 sites avec une hauteur moyenne sur 24h de $11,3 \pm 6,7$ mm, allant de 3,6 mm à 28,2 mm (N=20), ce qui offre un gradient de pluviométrie. La conductivité moyenne des rejets par temps sec des réseaux pluviaux échantillonnés était de $1138 \pm 157 \mu\text{S} \cdot \text{cm}^{-1}$, ce qui est relativement élevé et comparable à la conductivité de temps sec en entrée de la STEU ($1420 \pm 114 \mu\text{S} \cdot \text{cm}^{-1}$). De plus, les concentrations élevées en ion ammonium, en BIF et en pathogènes concourent à penser que ces rejets de temps sec étaient chargés en eaux usées non traitées (figure 1, figure 2). Celles-ci peuvent provenir de raccordements illicites, de mauvais branchements, de fuites par des conduites cassées ou de joints défectueux.

Par temps de pluie, un phénomène de dilution est attendu. En effet, la conductivité des rejets pluviaux était diminuée par 2 ($599 \pm 771 \mu\text{S} \cdot \text{cm}^{-1}$, et celle en entrée de la STEU présentait également une légère diminution ($1101 \pm 114 \mu\text{S} \cdot \text{cm}^{-1}$). Par temps de pluie, les réseaux pluviaux transportent une contamination fécale liée à des dépassements de seuil des reprises de temps sec, des surverses des bassins de rétention situés en amont sur le réseau d'assainissement et au ruissellement de surface qui peut véhiculer des pollutions fécales d'origine animale (Soller et al., 2015 ; Federigi et al., 2019). Les débits élevés dans les canalisations contribuent également à la remobilisation de sédiments et biofilms, ce qui entraîne une contamination élevée des rejets de temps de pluie (Krometis et al., 2010 ; Sidhy et al. 2012). Le pic de pollution est généralement situé juste avant ou pendant le pic de débit de l'hydrographe (Ahmed et al., 2019).

Compte tenu que des sources mixtes de contamination sont attendues dans un rejet pluvial, les rejets de temps de pluie et ceux de temps sec devraient présenter des profils de contamination différents (Ahmed et al., 2019). L'analyse hiérarchique des profils physico-chimiques et microbiologiques des échantillons collectés tend à confirmer cette hypothèse (figure 1). En effet, les rejets de temps de pluie des réseaux pluviaux semblaient relativement similaires entre eux alors que les échantillons de rejet de temps sec des réseaux pluviaux avaient tendance à se regrouper avec les eaux usées traitées rejetées par la STEU (figure 1). Par ailleurs, les eaux usées brutes en entrée de la STEU de St-Thibault-des-Vignes par temps sec et temps de pluie et certains échantillons du ru de la Lande par temps sec étaient relativement similaires (figure 1). Cette analyse sera toutefois à confirmer en ajoutant les données complètes de FDOM.

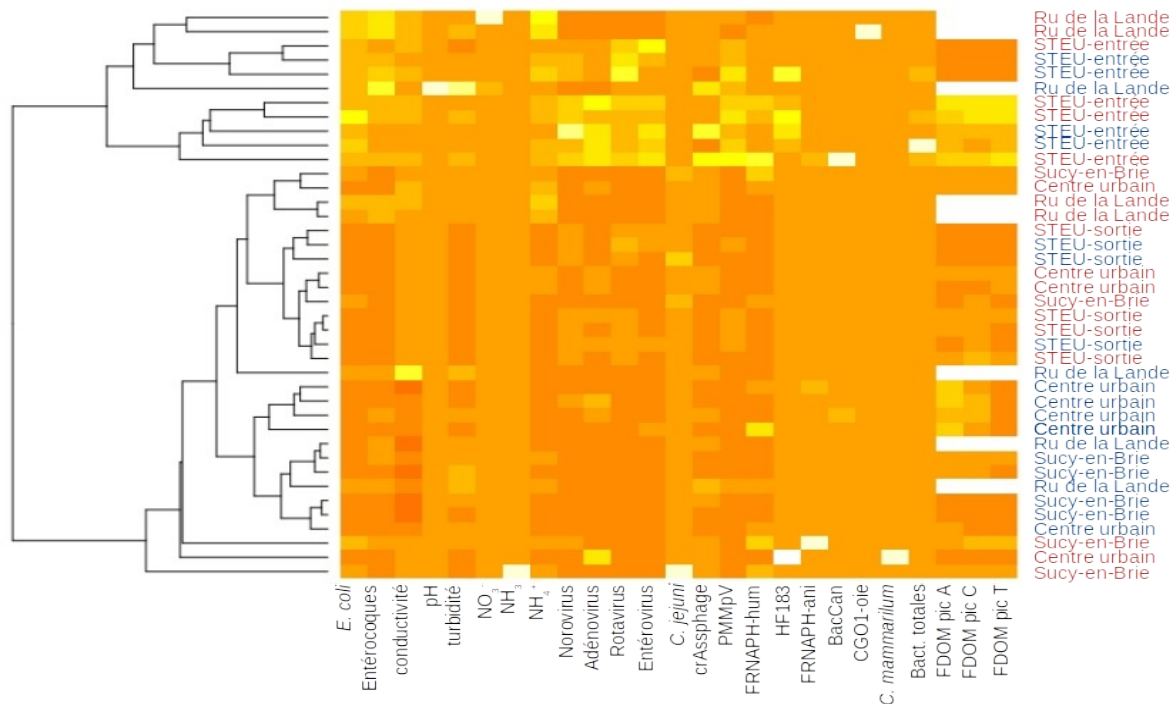


Figure 1. Analyse hiérarchique des caractéristiques physico-chimiques et microbiologiques des rejets échantillonnés par temps sec et temps de pluie (distance euclidienne, regroupement par la méthode de Ward). Bleu : temps de pluie, rouge : temps sec, FRNAPH-hum : phages ARN F humains G2 + G3, FRNAPH-ani : phages ARN F G1 + G4 spécifiques des animaux

Indicateurs de contamination fécale réglementaires

De fortes prévalences en BIF dans les rejets de temps de pluie sont généralement rapportées dans la littérature scientifique (e.g. Noble et al., 2006; Passerat et al., 2011 ; Sidhu et al., 2014). Toutefois une forte variabilité est attendue selon les caractéristiques du réseau d'assainissement et son état, les usages des sols. Dans les échantillons collectés dans le cadre d'OPUR, les concentrations en BIF différaient d'un rejet à l'autre (modèle linéaire, $p < 0,001$; figure 2a). Concernant les *E. coli*, leurs concentrations ne différaient pas significativement entre le rejet du ru de la Lande et les eaux usées brutes en entrée de la STEU et ceci quelles que soient les conditions météorologiques. Elles étaient significativement plus élevées comparées à celles des autres rejets (modèle linéaire, $p < 0,001$). Ainsi par temps sec, les concentrations en *E. coli* dans le rejet du ru de la Lande étaient de $7,16 \pm 0,16 \log_{10}$ de NPP.100 mL⁻¹ et de $7,23 \log_{10}$ de NPP.100 mL⁻¹ pour les eaux usées brutes (figure 2a).

Les concentrations en *E. coli* étaient toutes significativement différentes entre les rejets du Centre Urbain, de l'entrée du bassin de Sucy-en-Brie et de la STEU (test post-hoc, $p < 0,001$). Les eaux usées traitées rejetées par la STEU avaient les concentrations les plus faibles, avec $4,05 \pm 0,78 \log_{10}$ de NPP.100 mL⁻¹ en temps sec et $5,07 \pm 0,35 \log_{10}$ de NPP.100 mL⁻¹ en temps de pluie (figure 2a). Au bassin de Sucy-en-Brie, les concentrations en *E. coli* étaient significativement plus élevées qu'au

Centre Urbain (avec $6,83 \pm 0,19 \log_{10}$ de NPP.100 mL⁻¹ et $6,13 \pm 0,20 \log_{10}$ de NPP.100 mL⁻¹ respectivement en temps sec ; test post-hoc, $p < 0,001$), la différence étant moins marquée en temps de pluie (figure 2a). Concernant les entérocoques intestinaux (EI), les conclusions étaient similaires, certains rejets différant significativement entre eux (modèle linéaire, $p < 0,001$; figure 2b). La différence n'était pas significative entre le rejet du ru de la Lande et les eaux usées brutes (test post-hoc, $p > 0,05$), et les concentrations observées dans ces échantillons étaient significativement plus élevées que celles des autres rejets, quelle que soit la météorologie (test post-hoc, $p < 0,001$). Indépendamment des conditions météorologiques, les concentrations en EI ne différaient pas significativement entre le rejet du Centre Urbain et les eaux entrant dans le bassin de Sucy-en-Brie (test post-hoc, $p > 0,05$). Les eaux usées traitées rejetées par la STEU présentaient des concentrations en entérocoques intestinaux significativement plus faibles (test post-hoc, $p < 0,001$). Ces niveaux de contamination sont relativement élevés comparés à ceux rapportés dans littérature pour les effluents de temps sec, qui varient entre $7,6 \cdot 10^1$ à $5,3 \cdot 10^2$ *E. coli*.100 mL⁻¹ et $4,0 \cdot 10^1$ à $5,9 \cdot 10^2$ EI.100ml⁻¹ (Sidhu et al., 2012 ; Chong et al., 2013). Par temps de pluie, les valeurs mesurées dans notre étude se situent dans la fourchette haute des concentrations rapportées dans la littérature : $4,0 \cdot 10^1$ à $2,5 \cdot 10^7$ *E. coli*.100 mL⁻¹ et $1,1 \cdot 10^1$ à $1,8 \cdot 10^5$ EI.100 mL⁻¹ (Converse et al., 2011 ; Sidhu et al., 2012 ; Chong et al., 2013 ; Sidhu et al., 2013 ; Hatawqay et al. 2015 ; Paule-Mercado et al., 2016 ; Aryal et al., 2021).

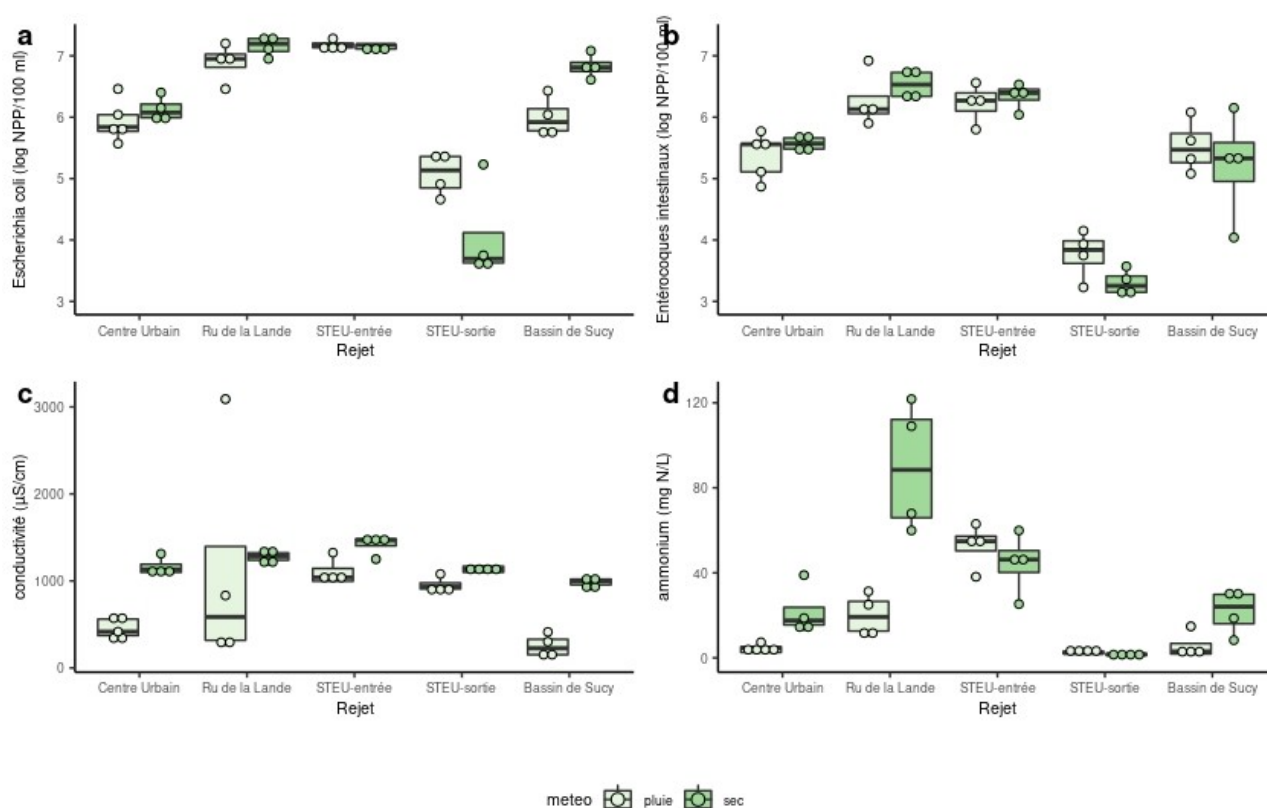


Figure 2. Comparaison des concentrations en *E. coli* (a), en entérocoques intestinaux (b), la conductivité (c) et les concentrations en ammonium (d) par temps sec et par temps de pluie pour les différents rejets

Quel que soit le rejet, les conductivités étaient significativement plus faibles par temps de pluie, il y a donc bien eu une dilution par les apports de temps de pluie (modèle linéaire, $p = 0,003$, figure 2c). Les concentrations en ions ammonium témoignaient aussi de la dilution des eaux usées dans les rejets des réseaux pluviaux par temps pluie (figure 2d). Concernant les BIF, les résultats sont plus complexes, sans doute liés aux sources mixtes en temps de pluie incluant les eaux usées non-traitées mais également les sources animales et la remobilisation des dépôts (Ahmed et al., 2019). Ainsi, les concentrations en EI n'étaient pas significativement différentes entre le temps sec et le temps de pluie, par contre pour le bassin de Sucy-en-Brie et les rejets de la STEU les concentrations en *E. coli* différaient significativement selon les conditions météorologiques (modèle linéaire, $p = 0,027$,

figure 2a). Sidhu et al. (2012) rapportent également des concentrations en BIF significativement plus élevées en temps de pluie qu'en temps sec dans les rejets de réseaux pluviaux.

Pathogènes viraux et bactériens

Bien que connaître les concentrations en pathogènes d'origine hydrique dans les rejets de temps de pluie soit une information nécessaire pour évaluer les risques liés à l'utilisation des eaux de surface, ce type de données reste rare dans la littérature scientifique. Dans les quelques études où les pathogènes sont mesurés dans les eaux de rejets pluviaux, les résultats sont le plus souvent rapportés en occurrence (Ahmed et al., 2019). Ceci est notamment dû à la difficulté à échantillonner les rejets pluviaux et aux limites techniques quant à la quantification des pathogènes. Le jeu de données obtenu dans le cadre de l'action R1.1 apporte donc des renseignements précieux pour établir les concentrations en pathogènes circulant dans le réseaux pluviaux dans différentes conditions de débit.

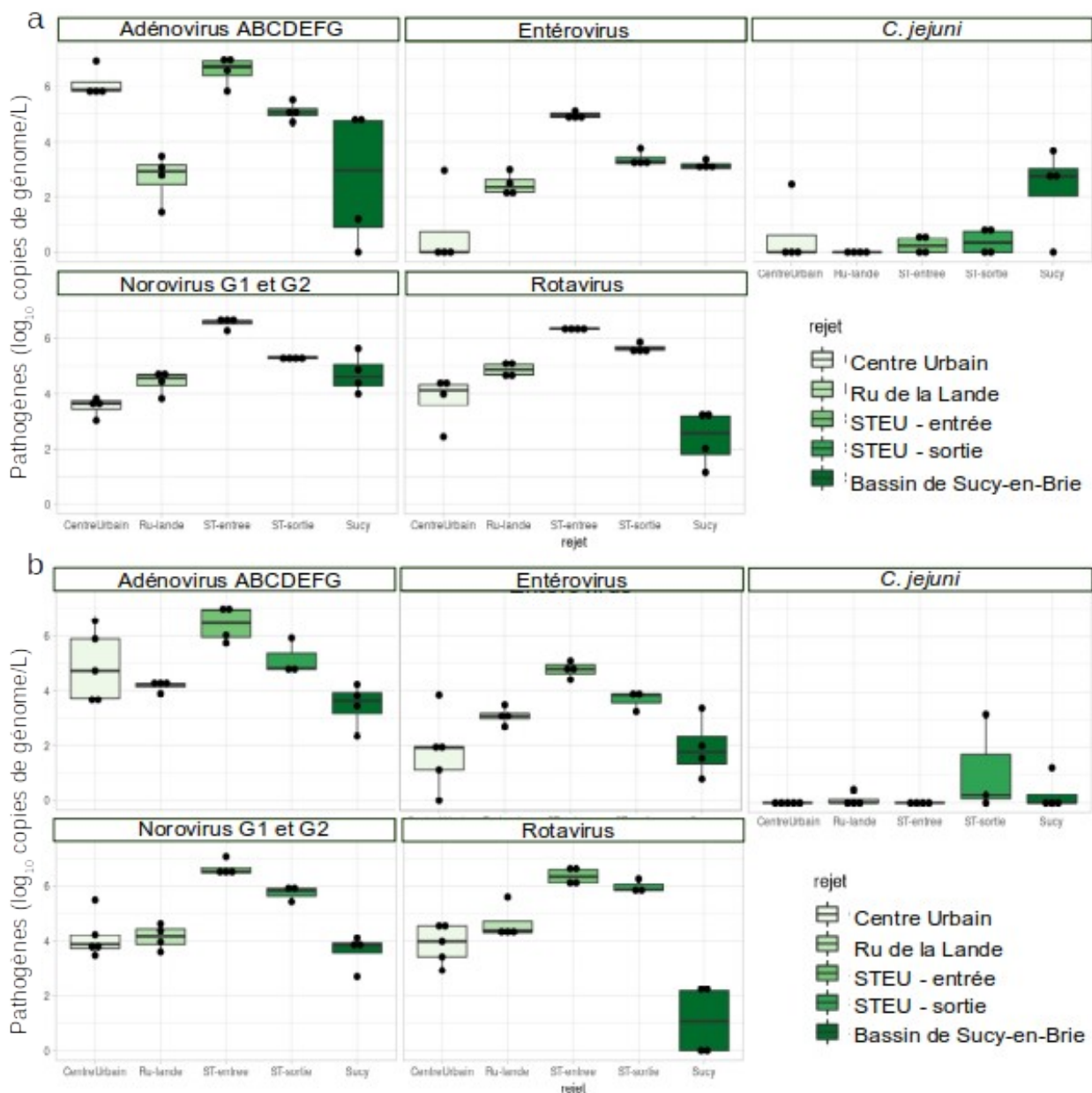


Figure 3. Concentrations en virus entériques et *Campylobacter jejuni* dans les rejets par temps sec (a) et par temps de pluie (b)

Les pathogènes viraux étaient présents en fortes densités dans les rejets pluviaux, malgré le fait que la majeure partie de l'échantillonnage était effectuée hors période épidémique (Figure 3). Ainsi, en sortie de STEU dans 100 % des échantillons, les norovirus G1+G2 présentaient des concentrations entre 5,2 et 6,0 log₁₀ de cg.L⁻¹. Dans 100 % des rejets pluviaux (que ce soit en temps sec ou en temps de pluie), les norovirus G1+G2 étaient mesurés dans des concentrations allant de 2,7 à 5,6 log₁₀ de cg.L⁻¹. Les norovirus G2 représentaient en moyenne 81 % des norovirus mesurés. Les adénovirus ABCDEFG étaient présents dans des concentrations allant de 4,5 à 5,9 log₁₀ de cg.L⁻¹ dans les eaux usées rejetées par la STEU (quantifiés dans 100 % des échantillons), et de <LD à 6,9 log₁₀ de cg.L⁻¹ dans les rejets pluviaux de temps sec et de temps de pluie (4 % des échantillons étant en dessous de la limite de quantification). Les adénovirus F représentaient en moyenne 46 % des adénovirus ABCDEFG. Les rotavirus étaient quantifiés dans 92 % des échantillons de réseaux pluviaux, dans des concentrations allant de <LD à 5,6 log₁₀ de cg.L⁻¹. Ils étaient présents dans les rejets de STEU dans des concentrations variant de 5,6 à 5,9 log₁₀ de cg.L⁻¹. Enfin les entérovirus étaient quantifiés dans 88 % des échantillons de rejets pluviaux, allant de <LD à 3,8 log₁₀ de cg.L⁻¹ et dans 100 % des rejets de STEU, allant de 3,2 à 3,9 log₁₀ de cg.L⁻¹. Les *Campylobacter lari* n'ont pas été détectés dans 1 L d'échantillon. Les *C. jejuni* étaient surtout présents dans les rejets de temps sec du Bassin de Sucy-en-Brie (figure 3, 2,3±1,6 log₁₀ de cg.L⁻¹) et en sortie de la STEU en temps de pluie (figure 3, 1,2±1,8 log₁₀ de cg.L⁻¹). Ces concentrations sont plus élevées que celles rapportées pour les rejets de temps de pluie dans la littérature scientifique : 2,9 à 4,9 log₁₀ de cg.L⁻¹ pour les norovirus G1+G2, 1,2 à 3,9 log₁₀ de cg.L⁻¹ pour les adénovirus, 4,3 log₁₀ de cg.L⁻¹ pour les entérovirus, 1,5 à 1,9 log₁₀ de cg.L⁻¹ pour *C. jejuni* (d'après une compilation de Ahmed et al., 2019). Steele et al. (2018) rapportent des concentrations allant de 0 à 2 log₁₀ de cg.L⁻¹ pour *C. jejuni* dans 0 et 20 % des échantillons collectés dans deux ruisseaux urbains servant de réseau d'assainissement pour la collecte des eaux pluviales en Californie (USA), les *C. lari* étaient détecté dans 78 et 48 % des échantillons de ces deux ruisseaux. Ils ont également mesuré les norovirus G1+G2 dans 75 et 80 % des échantillons des deux ruisseaux, dans des concentrations allant de 1,5 à 3,3 log₁₀ de cg.L⁻¹; les entérovirus n'étaient pas détectés, et les adénovirus dans 10 et 20 % des échantillons des deux ruisseaux. Jiang et al. (2015) rapportent des concentrations en *Campylobacter* spp. entre 0 et 1,6 log₁₀ de cg.L⁻¹ et en adénovirus entre 1,5 et 3,9 log₁₀ de cg.L⁻¹ dans un réseau d'assainissement pluvial Californien.

Tableau 1. Modèles linéaires des concentrations en virus entériques en fonction de la météorologie et du type de rejet (n=40, ddl=5), l'interaction entre les conditions météorologiques et le type de rejets était non significative et retirée du modèle, tous les modèles ont été validés. Les rejets soulignés n'étaient pas significativement différents. CU : Centre urbain, ru-lande : ru de la Lande, Sucy : bassin de Sucy-en-Brie, entrée et sortie de STEU

Pathogène	R ² ajusté	p-valeur du modèle	P-valeur météorologie	P-valeur rejet	Différences significatives entre les rejets p<0.05
Norovirus G1+G2	0,84	<0,001	0,754	<0,001	entrée>sortie> <u>CU ru-lande Sucy</u>
Adénovirus ABCDEFG	0,59	<0,001	0,920	<0,001	entrée> <u>sortie CU>ru-lande Sucy</u>
Rotavirus A	0,90	<0,001	0,336	<0,001	entrée>sortie>ru-lande>CU>Sucy
Entérovirus	0,90	<0,001	0,396	<0,001	entrée> <u>sortie RU Sucy CU</u>

Chaque réseau d'assainissement est susceptible de présenter des signatures de pathogènes relativement différentes. Pour tous les virus entériques, les concentrations en entrée de STEU étaient significativement plus élevées que dans les autres rejets (Tableau 1), avec en entrée de STEU les concentrations en log₁₀ de cg.L⁻¹ suivantes : 6,6±0,2 norovirus G1+G2, 6,5±1,2 adénovirus ABCDEFG, 6,4±0,2 rotavirus et 4,9±0,2 entérovirus. Les concentrations étaient relativement similaires entre les rejets de réseau pluvial (Tableau 1). Les adénovirus étaient plus élevés dans le rejet du Centre Urbain (similaire au rejet de STEU), et les rotavirus dans le rejet du ru de la Lande (Tableau 1, figure 3), comparé aux autres rejets de réseau pluvial. Les Entérovirus étaient également plus élevés dans le ru de la Lande (similaire au rejet de STEU) que dans les

autres rejets pluviaux. Transférées aux eaux de surface, ces concentrations virales sont suffisamment élevées pour craindre un risque d'exposition (oreilles, yeux, peau, gastro-entérite) non négligeable.

Il n'y avait pas de différence significative de concentrations en virus entériques entre le temps sec et le temps de pluie pour tous les rejets (Tableau 1). Dans la littérature scientifique, il y a peu d'études sur les réseaux pluviaux qui comparent les concentrations microbiennes durant les événements pluvieux et lorsque le débit est faible en temps sec. De plus, elles se focalisent uniquement sur la composition des communautés bactériennes, les concentrations en BIF et en indicateurs de contamination d'origine humaine. L'analyse demanderait le calcul des flux de virus pour finaliser la comparaison temps sec vs temps de pluie et l'interprétation du risque d'exposition. Par exemple dans le cas du ru de la Lande, les débits de temps sec étaient de $0,004 \pm 0,005 \text{ m}^3 \cdot \text{s}^{-1}$, et pour les temps secs échantillonnés de $0,156 \pm 0,100 \text{ m}^3 \cdot \text{s}^{-1}$, comparés aux débits de la Marne sur les mêmes dates ($35,648 \pm 63,770 \text{ m}^3 \cdot \text{s}^{-1}$ en temps sec et $35,397 \pm 3,77 \text{ m}^3 \cdot \text{s}^{-1}$ en temps de pluie). Pour le rejet du ru de la Lande, le temps de pluie est susceptible d'impacter la charge en pathogènes de la rivière avec des flux en norovirus 47 fois plus élevés comparé au temps sec.

Relation entre les indicateurs et les pathogènes

La figure 4 montre une relation positive significative entre les concentrations en BIF et la turbidité ou les concentrations en ammonium, à la fois par temps sec et par temps de pluie, tous rejets compris (test de significativité du coefficient de corrélation rho de Spearman, $n=20$, $p<0,001$). La relation positive entre les BIF et les matières en suspension est souvent rapportée dans la littérature concernant les rejets de temps de pluie (Stumpf et al., 2010). La turbidité et la concentration en ammonium pourraient donc se révéler être de bons proxy des BIF.

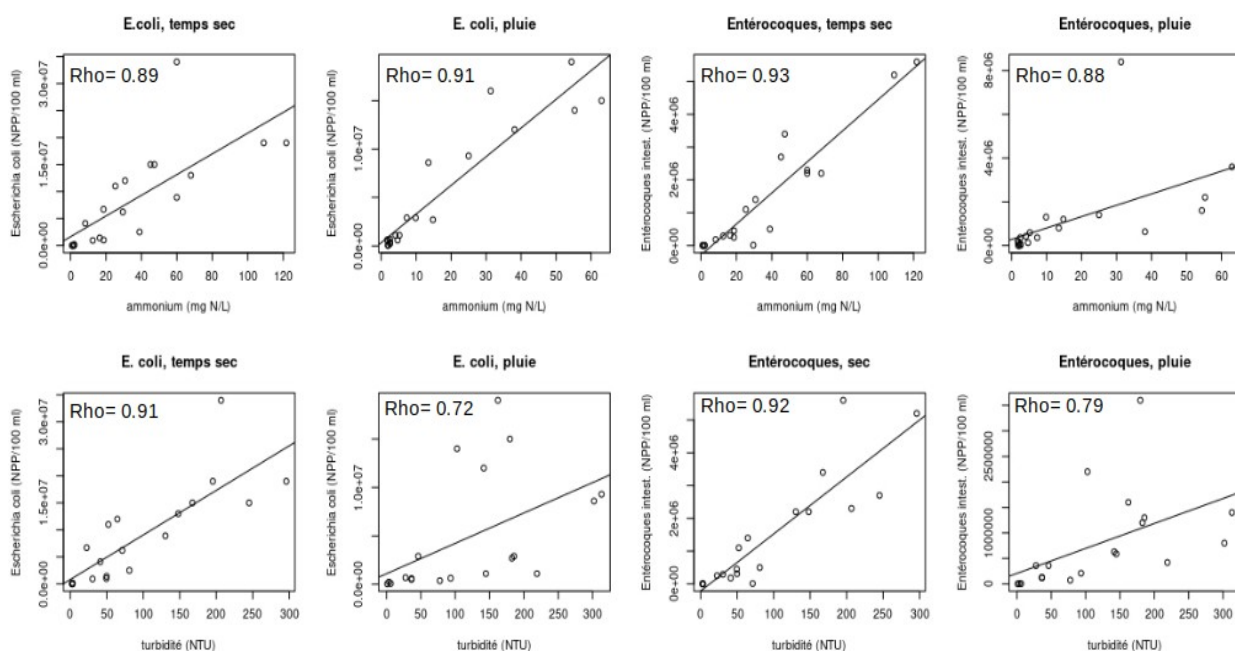


Figure 4. Corrélations significatives ($p<0,010$) entre les concentrations en BIF, la turbidité et la concentration en ammonium par temps sec, et par temps de pluie tous rejets compris

Les concentrations en BIF ne sont généralement pas corrélées avec la concentration ou la présence de pathogènes dans les rejets pluviaux (Ahmed et al., 2019), ce que confirme notre étude. En effet, il n'y avait aucune corrélation significative entre les concentrations en BIF et les concentrations en pathogènes quelle que soit la météorologie et le rejet. Les BIF sont de plus en plus considérées comme n'étant pas un indicateur approprié pour indiquer la présence de virus. Ce manque de corrélation n'est pas surprenant puisque les BIF peuvent avoir des sources multiples (humaines et animales) alors que les virus entériques humains sont généralement plus spécifiques des humains.

Toutefois les rotavirus A peuvent avoir le porc comme réservoir et une transmission zoonotique est également suspectée pour les norovirus (Wilhem et al., 2015). De plus les taux de décroissance des BIF et des virus entériques diffèrent dans les rejets pluviaux (Ahmed et al., 2024). Nos résultats soutiennent donc l'hypothèse que les BIF ne sont pas appropriés pour indiquer la présence de pathogènes viraux dans les rejets d'assainissement pluvial.

Les concentrations du marqueur humain PMMoV étaient significativement corrélées avec celles des *E. coli* par temps de pluie, les Norovirus en temps sec et temps de pluie (figure 5). Les concentrations en phages à ARN F spécifiques G2+G3 (préférence d'origine humaine) étaient corrélées avec les *E. coli* et les enterovirus par temps sec et temps de pluie (figure 5). Aucun autre marqueur humain n'était corrélé avec les pathogènes ou les BIF. -Wu et al (2023) rapportent des corrélations positives significatives entre les CrAssphages et les adénovirus, les norovirus, les entérovirus et les *Campylobacter* dans 139 échantillons d'eaux usées non traitées de 4 STEU, avec des rho de Spearman allant de 0,24 à 0,51. Les indicateurs viraux de contamination d'origine humaine sont généralement considérés comme présentant de meilleures corrélations avec les pathogènes viraux que les BIF.

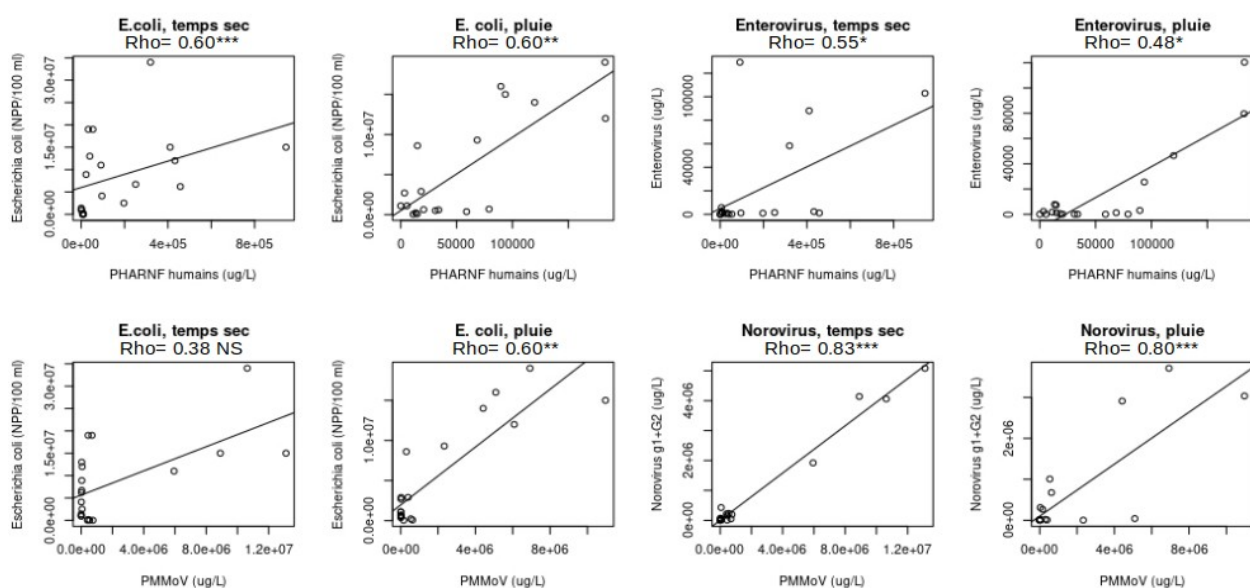


Figure 5. PMMoV par temps sec, et par temps de pluie tous rejets compris. La valeur et la significativité du rho de Spearman sont indiquées (* <0,050, **<0,010, ***<0,001)

Origine des contaminations

L'origine de la contamination est essentiellement humaine et canine sur les 3 réseaux d'assainissement pluvial, mais les contaminations aviaires bien que sporadiques ne sont pas absentes (Tableau 2). Il n'y avait pas de corrélation entre les concentrations des différents marqueurs humains, mais leur présence était toujours concomitante, sauf pour les phages à ARN F spécifiques de groupe 3 qui étaient présents en concentrations faibles (5963 ± 11416 NPP.100 mL⁻¹ quelle que soit la météorologie, dans 80 % des échantillons). La contamination microbienne dans les réseaux échantillonnés est donc mixte. Il n'est pas rare que l'eau circulant dans les réseaux séparatifs provenant des précipitations ruisselant sur les surfaces urbaines, du lavage des voiries et véhicules, des eaux claires, mais aussi d'eaux usées non traitées provenant de mauvais branchements ou de fuites du réseaux d'eaux usées (Li et al., 2023). Les fortes concentrations en marqueurs humains témoignent bien du fait que des eaux usées non traitées circulent dans tous les réseaux d'assainissement pluvial que nous avons échantillonnés. La présence de marqueurs humains par temps sec et temps de pluie est généralement ubiquitaire dans les rejets pluviaux en environnement urbains (Sidhu et al., 2012). La diversité des sources dans les réseaux pluviaux conduit également à une variabilité considérable de la qualité de l'eau et de sa quantité (Jian et al., 2015). Selon la revue scientifique de Ahmed et al. (2019), les CrAssphages sont rapportés dans les rejets pluviaux dans des concentrations allant de 2,9 à 7,6 log₁₀ de cg.L⁻¹ en temps de pluie et 3,5

\log_{10} de cg.L^{-1} en temps sec, ce qui est comparable à nos résultats avec des concentrations moyennes de $7,6 \pm 7,9 \log_{10}$ de cg.L^{-1} en temps de pluie et $7,5 \pm 7,4 \log_{10}$ de cg.L^{-1} en temps sec pour l'ensemble des rejets de réseau pluviaux. Le marqueur HF183 présente des concentrations entre 4,0 et 6,9 \log_{10} de cg.L^{-1} dans la littérature scientifiques, comparé aux rejets pluviaux que nous avons échantillonnés qui sont à des concentrations moyennes de $5,7 \pm 5,8 \log_{10}$ de cg.L^{-1} en temps de pluie et $5,8 \pm 5,7 \log_{10}$ de cg.L^{-1} en temps sec. Concernant les PMMoV, Ahmed et al. (2019) rapportent des concentrations allant de 1,3 à 4,6 \log_{10} de cg.L^{-1} , alors que dans les rejets pluviaux que nous avons échantillonnés les valeurs moyennes sont plus élevées avec $5,8 \pm 6,1 \log_{10}$ de cg.L^{-1} en temps de pluie et $5,1 \pm 5,3 \log_{10}$ de cg.L^{-1} en temps sec. Les concentration en phages à ARN F spécifiques que nous avons mesurés dans les rejets des réseaux pluviaux (G2+G3) présentaient des concentrations moyennes de $4,9 \pm 5,3 \log_{10}$ de cg.L^{-1} en temps de pluie et $5,2 \pm 5,3 \log_{10}$ de cg.L^{-1} en temps sec.

Tableau 2. Dépistage des sources de contaminations dans les eaux de surface de la Marne par temps sec et par temps de pluie. Fréquence des échantillons positifs pour chaque marqueur: vert foncé [100-75]%, vert claire [75-50] %, jaune [50 à 25]%, blanc [25-0]%

rejet	conditions	CrAssphage	PMMoV	PHARNF humains	HF183	Bac-Can	CGOF1	Gull2	PHARNF animaux
entrée de STEU	sec								
	pluie								
Sortie de STEU	sec								
	pluie								
Centre Urbain	sec								
	pluie								
Ru de la Lande	sec								
	pluie								
Bassin de Sucy-en-Brie	sec								
	pluie								

Conclusions

L'étude réalisée sur les réseaux séparatifs en comparaison avec la Station de traitement des eaux usées de Saint-Thibault des-Vignes a donc révélé que si la contamination des eaux rejetées en temps sec et temps de pluie était généralement équivalent à celle des eaux usées traitées par la STEU, elle pouvait parfois être plus élevée voire même être équivalente à celle des eaux usées non traitées. Toutefois la contribution de ces réseaux pluviaux à la pollution de la Marne devra être estimée en flux de pathogènes et d'indicateurs fécaux pour avoir une hiérarchisation des rejets. Les pathogènes sont présents dans des concentrations élevées, mais il serait nécessaire d'avoir une analyse de risque quantitative pour conclure quant au risque sanitaire lié à ces rejets. Enfin l'analyse des marqueurs spécifiques de source a révélé l'ubiquité des pollutions d'origine humaine dans les réseaux séparatifs liés à des apports en eau usées non traitées, et a confirmé également l'apport de sources animales (notamment canines) en temps sec comme en temps de pluie. Il est recommandé d'utiliser

plusieurs marqueurs à la fois pour renforcer les conclusions. Globalement, la contamination était particulièrement élevée au Centre Urbain mais cela pourrait être lié à un incident sur la reprise de temps sec. Lors de la phase OPUR 6, l'impact des travaux de réparation sur cette reprise sera évaluée. Le ru de la Lande présente aussi de fortes contaminations, et lors de la phase OPUR 6 l'efficacité de la station de dépollution des eaux pluviales qui est en construction, sera évaluée. Pour la fin de la phase OPUR 5, les relations entre les patterns de FDOM et les communautés bactériennes seront étudiés, ainsi que la caractérisation de quelques échantillons quant au gènes de résistance aux antibiotiques.

REFERENCES

- Ashbolt NJ, Mary Schoen ME, Soller JA, Roser DJ (2010). Predicting pathogen risks to aid beach management: The real value of quantitative microbial risk assessment (QMRA). *Water Res.* 44 : 4692-4703
- Bezirtzoglou C, Dekas K, Charvalos E (2011). Climate changes, environment and infection: Facts, scenarios and growing awareness from the public health community within Europe. *Anaerobe*, 17; 337-340.
- Coffey R, Bemham B, Krometis LA, et al. (2014). Assessing the effects of climate change on waterborne microorganisms: Implications for EU and US water policy. *Hum. Ecol. Risk Assess.* 20; 724-742.
- Eregno FE, Tryland I, Tjomsland T, et al. (2016). Quantitative microbial risk assessment combined with hydrodynamic modelling to estimate the public health risk associated with bathing after rainfall events. *Sci. Total Environ.* 548-549: 270-279
- European Union, 2006. Directive 2006/7/EC of The European Parliament and of the Council of 15 February 2006 concerning the management of bathing water quality and repealing Directive 76/160/EEC. *Off. J. Eur. Union L* L64, pp.37-51.
- Fewtrell L, Kay D (2015). Recreational Water and Infection: A Review of Recent Findings. *Curr Envir Health Rpt* 2:85-94
- Haile RW, Witte JS, Gold M, Cressey R, et al., (1999). The health effects of swimming in ocean water contaminated by storm drain runoff. *Epidemiology* 10, 355-363.
- Harder-Lauridsen NM, Gaardbo Kuhn K, et al. (2013). Gastrointestinal Illness among Triathletes Swimming in Non-Polluted versus Polluted Seawater Affected by Heavy Rainfall, Denmark, 2010-2011. *PlosOne* 8(11-e78371):1-8
- Hong Y, Li C, Lemaire BJ, Soullignac F, Scarati Martins JR, Roguet A, Lucas F, Vinçon-Leite B (2019). An Integrated Approach for Assessing the Impact of Urban Stormwater Discharge on the Fecal Contamination in a Recreational Lake Near Paris, in: Mannina, G. (Ed.), *New Trends in Urban Drainage Modelling*. Springer International Publishing, Cham, pp. 334-338.)
- Hong Y, Soullignac F, Roguet A, Li C, Lemaire BJ, Martins RS, Lucas F, Vinçon-Leite B (2020). Impact of *Escherichia coli* from stormwater drainage on recreational water quality: an integrated monitoring and modelling of urban catchment, pipes and lake. *Environ Sci Pollut Res.* 28, 2245-2259
- IPCC (2012). Managing the Risks of Extreme Events and Disasters to Advance Climate Change Adaptation. A Special Report of Working Groups I and II of the Intergovernmental Panel on Climate Change. CB Field. Cambridge, UK, and New York, NY, USA: Cambridge University Press: p 582.
- Liu CM, Aziz M, Kachur S, Hsuey PR, Huang YT, Keim P, Price LB (2012). BactQuant: An enhanced broad-coverage bacterial quantitative real-time PCR assay. *BMC Microbiol* 12, 56-69.
- Lucas FS, Thierial C, Gonçalves A, Servais P, Rocher V, Mouchel J-M (2014) Variation of raw wastewater microbiological quality in dry and wet weather conditions. *Environ. Sci. Pollut. R.* 21: 5318-5328.
- Mons C, Dumètre A, Gosselin S, Galliot C, Moulin L (2009). Monitoring of *Cryptosporidium* and *Giardia* river contamination in Paris area. *Water Res.* 43: 211-217

- Moulin L, Richard F, Stefania S, Goulet M, Gosselin S, Gonçalves A, Rocher V, Paffoni C, Dumètre A (2010). Contribution of treated wastewater to the microbiological quality of Seine River in Paris. *Water Res.* 44: 5222–5231
- Passerat J, Ouattara NK, Mouchel J-M, Vincent Rocher, Servais P (2011) Impact of an intense combined sewer overflow event on the microbiological water quality of the Seine River. *Water Research* 45:893–903.
- Prevost B., Lucas F.S., Goncalves A., Richard F., Moulin L. Wurtzer S. (2015). Large scale survey of enteric viruses in river and waste water underlines the health status of the local population. *Environment international* 79: 42-50. 2
- Radomski N, Betelli L, Moilleron R, Haenn S, Moulin L, Cambau E, Rocher V, Goncalves A, Lucas FS (2011). Mycobacterium behavior in wastewater treatment plant, a bacterial model distinct from *Escherichia coli* and Enterococci. *Environ Sci Technol.* 45 : 5380-6
- R Core Team (2020). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <https://www.R-project.org/>
- Roguet A, Therial C, Catherine A, Bressy A, Varrault G, Bouhdamane L, Tran V, Lemaire BJ, Vinçon-Leite B, Saad M, Moulin L, Lucas FS (2017). Importance of Local and Regional Scales in Shaping Mycobacterial Abundance in Freshwater Lakes. *Microb Ecol* 4:834-846
- Schetz FM, Schijven JF, de Roda Husman AM (2011). Exposure assessment for swimmers in bathing waters and swimming pools. *Water Research* 45:2392-2400
- Simpson JM, Santo Domingo JW, Reasoner DJ (2002). Microbial Source Tracking: State of the Science *Environ. Sci. Technol.*, 36: 5279–5288
- Wilhelm B, Waddell L, Greig J, Rajić A, Houde A, McEwen SA (2015). A scoping review of the evidence for public health risks of three emerging potentially zoonotic viruses: hepatitis E virus, norovirus, and rotavirus. *Preventive Veterinary Medicine*, 119(1-2), 61-79.

PLANNING JUSQU'EN 2024

1. Poursuite de la thèse de M. Naloufi (soutenance en 2024)
2. Caractérisation des communautés bactérienne par séquençage haut débit
3. Quantification de gènes de résistance aux antibiotiques dans une sélection d'échantillons
4. typologie des rejets

VALORISATION

- Naloufi M, Lucas FS, Souihi S, Servais P, Janne A, Wanderley Matos De Abreu T. Evaluating the Performance of Machine Learning Approaches to Predict the Microbial Quality of Surface Waters and to Optimize the Sampling Effort. *Water.* 2021; 13(18):2457. <https://doi.org/10.3390/w13182457>
- Présentation au congrès de l'Association Francophone d'Ecologie Microbienne en novembre 2021
- Présentation fin octobre 2021 au GT « Connaissance de la qualité microbiologique de la Seine et la Marne »
- Présentation invitée au webinaire « OneHealth » de la Société Française de Microbiologie en Novembre 2021
- Présentation orale et actes de colloque des JDHU du 17 -19 octobre à Lyon:
- Naloufi M, Therial C, Saad M, Bathily S., Partibane C, Delarbre M, Gillon-Ritz M, Lucas FS (2022). Variabilité méthodologique pour la mesure des indicateurs de contamination de l'eau de surface, acte de colloque des JDHU, 17-19 octobre 2022, Lyon, pp
- Présentation des résultats et émission de recommandations pour les procédures de nettoyage des équipements de prélèvement lors du GT "connaissance de la qualité microbiologique de la Seine et la Marne" (26 avril 2022) et lors du Café des Sciences d'OPUR (5 octobre 2022).

CONTRIBUTEURS

Françoise Lucas, LEESU, Université Paris-Est Créteil (UPEC), lucas@u-pec.fr

Sébastien Wurtzer, Recherche Biologie, Eau de Paris, sebastien.wurtzer@eaudeparis.fr

Mohamed Saad, LEESU, ENPC mohamed.saad@enpc.fr

Manel Naloufi, LEESU, UPEC ; Département de la Propreté et de l'eau, Ville de Paris, manel.naloufi@paris.fr

Claire Théréal, LEESU, UPEC, claire.therial@u-pec.fr

Natalia Angelotti, LEESU, ENPC, natalia.angelotti-de-ponte-rodrigues@enpc.fr

Brigitte Vinçon-Leite, LEESU, ENPC, b.vincon-leite@enpc.fr

Laurent Moulin, Recherche Biologie, Eau de Paris, laurent.moulin@eaudeparis.fr