



## Programme Gestion du Patrimoine Sol GESSOL

### Pratiques pastorales et qualité microbiologique des eaux :

rôle des facteurs édaphiques et hydrométéorologiques  
dans la survie et le transfert à l'échelle bassin versant, de  
populations de bactéries fécales bovines.

*Rapport final*



Université Claude Bernard Lyon 1



Ecole Nationale Vétérinaire  
de Lyon



## Intitulé.

**Pratiques pastorales et qualité microbiologique des eaux : rôle des facteurs édaphiques et hydrométéorologiques dans la survie et le transfert à l'échelle bassin versant, de populations de bactéries fécales bovines.**

## Mots clés

Bassin versant, *E. coli*, Pastoralisme, Sols, Transfert, Qualité des eaux, Bassin versant

## Axe de Gessol

Ce projet se rattache à l'AXE 2 « pratiques agricoles et qualité des eaux »

## Résumé

Le projet « Pastor » traite de **la survie et de la dynamique du transfert de contaminants microbiens des sols aux eaux de surface**. L'objet d'étude spécifique est la contamination microbiologique des eaux par le pâturage, en zone de montagne (alpage). Le modèle biologique est *E. coli*, indicateur classique de contamination fécale de l'eau.

La demande sociétale concernant la qualité microbiologique des eaux est récurrente, notamment et paradoxalement, dans les Alpes du Nord, région considérée comme un « château d'eau » et portant une forte image d'eau pure. En fait, le milieu montagnard est propice au développement de contaminations microbiennes qui perturbent les fonctions de ses aquifères comme ressource en eaux potables (question rendue cruciale localement par le développement du tourisme), en eaux à usages agro- alimentaires (risque pour les fabrications fermières) ou comme support d'activités récréatives (sports d'eaux vives). Les pollutions sont en partie dépendantes des pratiques pastorales. Un point préoccupant est la présence chez les bovins (porteurs sains) de souches d'*E.coli* potentiellement pathogènes pour l'homme et dont la dissémination liée au parcours des troupeaux est envisagée. La maîtrise de la qualité des eaux en zone de pâturage est aussi posée de façon plus générale dans le cadre de la réflexion en cours sur les systèmes d'exploitation durable des ressources fourragères prairiales.

Les recherches réalisées dans « Pastor » portent sur :

1) la dynamique et l'évolution des structures génétiques des populations de *E. coli*, y compris les souches pathogènes STEC, lorsque celles-ci sont soumises aux conditions et contraintes de l'environnement montagnard ; il s'agit de caractériser les lieux des stockages consécutifs à l'apport de déjections par les bovins, les survies et les évolutions éventuelles de *E. coli* ; la comparaison avec la dynamique de bactéries telluriques types, les *Pseudomonas* fluorescents, permet de mieux typer les stratégies adaptatives de *E coli*;

2) la nature et le fonctionnement des zones contributives aux contaminations fécales des eaux de surface du bassin versant pâturé; ceci consiste à déterminer l'intensité des transferts vers les eaux à partir des divers types de stocks pour établir un lien entre variabilité des teneurs et flux de contaminants à l'exutoire, fonctionnement pastoral et états hydrologiques du bassin.

Les résultats obtenus mettent en évidence des fonctionnements inattendus. En premier lieu, il existe un stockage à long terme d'*E.coli* dans les premiers centimètres organiques de la surface des divers sols sous pâturage, avec des effectifs constants quels que soient, la saison, la proximité d'une bouse, l'intensité du pâturage ou le contexte bioclimatique. Cette dynamique correspond à celle d'une population naturalisée; elle est expliquée par référence au concept de capacité d'accueil. Notre bactérie tellurique

type présente une dynamique totalement différente marquée par une forte variabilité représentative de stratégies opportunistes.

Plus en profondeur, la présence durable de populations naturalisées ne s'observe que dans les situations de sols particuliers, peu drainants (confinés) et riches en matière organique. Dans le cas des sols drainants, les effectifs bactériens sont fugaces ; ils semblent résulter de transferts advectifs et dispersifs ; les temps de résidence sont faibles ; les populations répondent à des contrôles biotiques et abiotiques.

Les déjections constituent d'autres lieux de stockage. Elles sont susceptibles d'inclure des pathogènes porteurs de facteurs de toxicité (*E.coli* O157:H7). La survie des *E. coli* y est limitée surtout par la dispersion physique et biologique des bouses; elle dépend de ce fait de l'intensité de la dessiccation et se maintient sous la couverture neigeuse.

Les variations de la structure génétique des populations d'*E.coli* dans les différents stocks du bassin versant résultent de dynamiques adaptatives. Les populations naturalisées de la rhizosphère de surface ou des milieux confinés s'avèrent spécifiques et très différentes de celles des dépôts fécaux. Ces dernières présentent, à l'inverse des précédentes, un fort degré de similarité avec les populations isolées du rectum des bovins ou retrouvées en profondeur dans les sols drainants. Les stocks diffèrent aussi en terme de propriétés et notamment de susceptibilité vis-à-vis de l'extraction par les écoulements, ruissellement ou infiltration. Les déjections récentes sont les stocks les plus extractibles. La dessiccation des bouses se traduit pas une baisse de ce potentiel de contamination des eaux, alors que la teneur en *E. coli* reste équivalente. Les stocks d'*E.coli* naturalisées des sols, bien qu'assez élevés, sont eux aussi peu mobilisables par le ruissellement. Ces propriétés sont discutées en terme d'état physique des matériaux et de relations bactéries/supports.

La spécialisation et la naturalisation des populations dans le sol requierent probablement 1) une inoculation continue de cellules bactériennes, 2) la présence de microsites refuges qui protègent ces dernières de la pression prédatrice, 3) l'apport régulier et continu de substrats organiques, proches des composés fécaux de l'environnement primaire du tube digestif et 4) un laps de temps suffisant pour que les populations ainsi protégées et alimentées puissent acquérir ou exprimer un métabolisme adaptatif. Ces conditions sont facilement réunies dans le cas de prairies pâturées où la bouse est un facteur de co-introduction chronique de bactéries et de substrats protecteurs. Ceci distingue les apports par le pâturage, des apports par épandage de lisier ou fumier.

« Pastor » comprend aussi une analyse du fonctionnement du bassin versant pâturé comme système de transfert des contaminants fécaux et une modélisation de ces flux bactériens. Les connaissances acquises concernent les régimes d'exportation à l'exutoire, les facteurs de transfert et les zones contributives. Elles servent de base pour discuter les actions possibles en vue d'une protection des ressources en eau, en zone pâturée.

Le travail de modélisation prend en compte 1) la forte hétérogénéité qui marque les systèmes pâturés extensifs en ce qui concerne la répartition dans l'espace et dans le temps des déjections animales et des potentiels de contamination associés 2) les flux d'eau ; sous prairie, du fait d'une forte perméabilité des horizons de surface des sols, le ruissellement superficiel est généré par la saturation des sols de bas fond 3) le devenir des bactéries fécales durant leur transport entre bouses et réseau hydrographique, avec la définition de fonctions relatives (i) aux stocks de bactéries mobilisables en relation avec le vieillissement et le remaniement des dépôts fécaux, (ii) à leur mise en suspension dans les lames d'eau en mouvement et (iii) à leur rétention / mortalité durant leur trajet jusqu'aux milieux aquatiques récepteurs.

Toutes ces fonctions sont paramétrables et évaluées dans nos conditions à partir d'un jeu d'observations relatif : (i) à la distribution des bouses dans l'espace selon le faciès de végétation (ii) à l'évaluation, sous pluies simulées, des stocks de bactéries potentiellement mobilisables pour les états typiques d'évolution des dépôts fécaux; (iii) à l'humidité des sols et au débit du bassin et à leurs modélisations par l'hydrologie des sources variables ; (iv) à la mesure des flux bactériens à l'exutoire du bassin versant pour différentes conditions d'état du bassin versant (troupeaux et hydrométéorologie).

Le traitement des données montre que le milieu étudié présente un très fort potentiel tampon vis-à-vis des pollutions microbiologiques de l'eau puisque c'est une part infime et momentanée, de quelques ‰ à quelques % du stock total de bactéries fécales des bouses, qui est transférée à l'exutoire. Les écoulements de surface lors des crues estivales représentent le mécanisme dominant de contamination des eaux à l'exutoire. La présence de bouses fraîches est déterminante, ce qui explique les évolutions rapides des niveaux de contamination des eaux de surface, avec l'arrivée ou le départ des troupeaux. En étiage et en fonte des neiges, les teneurs restent faibles en tous points du bassin, exutoire compris.

Les secteurs contributifs actifs, critiques en terme de contamination, sont restreints et localisés au niveau des zones de production de ruissellement, c'est-à-dire dans l'environnement immédiat des berges des cours d'eau ou les fonds de talwegs où se concentrent les écoulements latéraux et la pression pastorale. Les sols drainants alimentant des nappes profondes (complexes alluviaux à forte porosité de constitution) sont à l'origine de pics d'exportations post crues, mais de faible ampleur comparativement à ce qui est généré par le ruissellement des versants. Dans notre contexte, les apports directs dans le réseau semblent négligeables. La signature génétique des bactéries retrouvées à l'exutoire est en général celle de populations ayant une structure proche de celles des déjections récentes, situation révélatrice de courtes durées de passage dans le bassin versant et ses zones contributives. Le fonctionnement global du système de transfert à l'échelle du bassin versant se traduit donc par une spécialisation des populations d'*E.coli* stockées avec, d'une part des populations naturalisées, peu mobilisables par les flux d'eau, à transfert lent voire nul et d'autre part, une population primaire, non ou peu modifiée par son passage dans l'environnement, caractérisée par des cheminements courts et rapides et finalement impliquée dans la contamination des ressources en eau.

Les conséquences opérationnelles de « Pastor » concernent la prévention des pollutions fécales des eaux de surface et l'utilisation d'*E.coli* comme indicateur. Des approfondissements sur la détection dans les aquifères récepteurs nous semblent nécessaires pour améliorer les systèmes de surveillance et d'alerte (valeur indicatrice d'*E coli*, détections des divers types de pics de teneurs non tous liés à des changements de débits). La connaissance des zones actives fournit des indications sur les bonnes pratiques en matière d'aménagement des circuits de pâturage, d'équipement des points d'abreuvement et des zones de franchissement des cours d'eau, ainsi que sur la mise en place de fils d'éviction localisée des troupeaux. Il s'agit pour l'essentiel de mesures lourdes à mettre en œuvre qui font ressortir le caractère paradoxal des pollutions microbiologiques diffuses: une proportion très réduite de contaminants transmise aux aquifères, ayant des conséquences très lourdes tant en terme de santé humaine et animale, et dont la maîtrise (partielle) suppose des moyens humains et financiers relativement élevés.

## **Abstract**

The « Pastor » project deals with **survival and dissemination microbial contaminants from soil to surface water**. It focuses on microbial contamination of water by *E. coli* (indicator of fecal contamination) in alpine meadows in relation to dairy grazing.

Society demand in terms of water microbial quality is important, including in northern French Alps, a water reservoir region. Indeed, microbial contamination is a key issue in mountainous areas, with regards to water resources in aquifers (especially with development of tourism), water usage in the agrifood sector (risk for farm-based manufacturing), and recreational activities (whitewater sports). Pollutions are partly related to grazing practices. A worrying issue is the occurrence of cattle symptom-free carriers of *E. coli* strains potentially pathogenic to humans and whose dissemination by farm animals is possible. Water quality in grazed areas falls also into a larger debate on sustainable management of foraging resources in meadows.

Research carried out in « Pastor » deals with:

1) the dynamics and genetic structure of *E. coli* populations, including pathogenic STEC strains, when released in the mountainous environment; the objective is to characterize survival and storage compartments of *E. coli* in soil following release by cattle dejections, and to compare with population dynamics of typical soil inhabitants (the fluorescent *Pseudomonas* spp.) for appraisal of adaptive strategies in *E. coli*;

2) the identification and characterization of pasture areas contributing to fecal contamination of surface water in an alpine watershed; this was carried out by quantifying *E. coli* transfers from the different pasture areas to water, with the aim to link *E. coli* stocks and flux at the watershed outlet, pasture functioning, and hydrologic properties of the watershed.

This project gave unexpected results. First, long- term storage of *E. coli* takes place in the organic-rich first few cm of soil in the different pasture soils, with constant *E. coli* numbers regardless of season, proximity to cow pat, grazing intensity or bioclimatic situation. This points to the occurrence of a naturalized, stable soil population of *E. coli*. In contrast, the fluorescent *Pseudomonas* spp. displayed contrasted population levels in time, which corresponds to an opportunistic lifestyle.

Deeper in soil, the stable occurrence of naturalized *E. coli* populations takes place only in certain soil, which are poorly- drained and rich in organic matter. In well- drained soils, presence of *E. coli* below the surface horizon seems related to inputs from cow pat; *E. coli* numbers fluctuate in relation to advective and dispersive transfer events, with short residence times.

Cow pats represent another storage compartment for *E. coli*. Pathogenic *E. coli* strains (O157:H7) with virulence factors can be present. *E. coli* survival is mainly limited by physical and biological turnover of cow pats. It depends on desiccation but is stable under winter snow cover.

Variability in the genetic structure of *E. coli* populations in the different watershed compartments results from adaptive dynamics. The naturalized populations in the topsoil rhizosphere or in poorly-drained bulk subsoil are specific and distinct from those in cow pats. Only the latter display high similarity with populations from cattle rectal samples or those occurring in well- drained bulk subsoil. Cow pats contain high *E. coli* numbers, which diminish with pat decomposition. Stocks of naturalized *E. coli* populations in soil are relatively high, but seem to be little mobilized by water flux.

Specialization and naturalization of *E. coli* populations in soil probably require 1) continuous inoculation of bacteria, 2) the presence of favorable microsites, where *E. coli* is protected from predation, 3) steady inputs of organic substrates, and 4) sufficient time for adaptation of protected populations. These conditions are readily met in the case of grazed pastures, where cow pats regularly bring both bacteria and organic matter.

« Pastor » includes also an analysis of the functioning of the watershed in terms of transfer of fecal contaminants and modeling of bacterial flux. The information needed for modeling includes export regimes at the watershed outlet, transfer conditions within the watershed, and release potential of the various pasture units. The output of the model will be important for improved management of water resources in alpine meadows.

Modeling takes into account 1) the high heterogeneity of alpine meadows in terms of distribution in space and time of cow pats and contamination potential, 2) water flux; topsoil is very permeable in meadows, and run- off results from saturation of underlying soil layers especially in lower areas, 3) the fate of fecal bacteria during dissemination from pats to surface water. This needs to consider (i) bacterial stocks that can be disseminated in relation to aging and decomposition of cow pats, (ii) the transfer of pat pierces in suspension in run- off water, and (iii) bacterial retention / mortality during transfer to water.

These functions can be described quantitatively and estimated based on data related to: (i) the distribution of cow pats in the different pasture units, (ii) the estimation of bacterial stocks that are potentially transferred, (iii) soil water content and water flux, and (iv) measurement of bacterial flux at the watershed outlet.

Data analysis shows that alpine meadows display a high buffering capacity towards microbial pollution of water, because only a very small amount of cow pat *E. coli* (a few ‰ to % of total stock) actually ends up at the watershed outlet. Water run-off during summer spates is the main mechanism leading to water contamination. The presence of fresh pats is important, which explains why changes in contamination level of surface water are rapid, in relation to seasonal arrival and departure of cattle herd. During low water and snow melting, levels remain low everywhere in the watershed, including at the watershed outlet.

The areas contributing most to contamination are restricted to those where run-off takes place, that is near streams or in talweg bottom, where lateral movement of water and grazing pressure are higher. Water from well-drained soils can reach groundwater and accounts for *E. coli* export peaks after the spate, but these peaks are smaller than those due to run-off. Here, direct contamination of surface water seems negligible. The genetic signature of bacteria found at the watershed outlet is generally close to that of populations in fresh cow pats, indicating a short transit time in the watershed. The overall functioning of the transfer system in the watershed leads thus to specialization of *E. coli* populations. On one hand, naturalized populations are transferred little by water flux, and on the other hand, a fraction of cow pat populations is quickly transferred to surface water.

The practical significance of « Pastor » concerns prevention of fecal pollution of water and the relevance of *E. coli* as indicator of fecal contamination. Further assessment of the groundwater compartment is needed to improve our understanding of *E. coli* ecology especially with regards to the outlet peaks unrelated to spates. The knowledge of contamination- active zones is important for management of grazing circuits, cattle drinking areas and stream crossing areas, as well as fencing of risk areas. These containment measures are rather costly to implement. However, despite the fact that a very small proportion of microbial pollutants reach surface water, they may have very significant consequences in terms of animal and human health.

## **PARTICIPANTS au PROJET**

**UMR CARRTEL INRA/Université de Savoie**  
**INRA - Station d'Hydrobiologie Lacustre**  
Equipe Bassin versant  
74203 THONON- LES- BAINS CEDEX  
Tél. 04. 50. 26. 78. 01 - Fax 04. 50. 26. 07. 60

**DORIOZ J.M. (responsable scientifique)**  
[dorioz@thonon.inra.fr](mailto:dorioz@thonon.inra.fr)

**TREVISAN D. (IR INRA, responsable de la partie bassin versant)**  
[trevisan@thonon.inra.fr](mailto:trevisan@thonon.inra.fr)

**QUETIN Ph. (IE INRA)**  
[quetin@thonon.inra.fr](mailto:quetin@thonon.inra.fr)

**GOURDON M. H. (CDD)**  
[gourdon@thonon.inra.fr](mailto:gourdon@thonon.inra.fr)

**LAZZAROTTO J. <sup>(1)</sup> (AI) (chimie des eaux)**  
[lazzarotto@thonon.inra.fr](mailto:lazzarotto@thonon.inra.fr)

**Université de Savoie - CISM**  
Laboratoire des sols  
73376 Le Bourget du Lac Cedex  
Tel : 04 79 75 88 62 Fax : 04 79 75 88 80

**POULENARD J. (MC Université de Savoie)**  
[Jerome.Poulenard@univ-savoie.fr](mailto:Jerome.Poulenard@univ-savoie.fr)

**FAIVRE P. (Pr Université de Savoie)**  
[Pierre.Faivre@univ-savoie.fr](mailto:Pierre.Faivre@univ-savoie.fr)

**UMR Sol- Agronomie- Spatialisation**  
**INRA Rennes**  
65 rue de Saint- Brieuc CS 84215  
35042 Rennes Cedex (France)  
tel : 02 23 48 52 28

**MEROT Ph. (DR INRA)**  
[merot@roazhon.inra.fr](mailto:merot@roazhon.inra.fr)

**UMR CNRS 5557, Ecologie microbienne Lyon**  
**Université Claude Bernard - CNRS**  
Ecologie Microbienne,, Lyon 1.  
Campus de la Doua, bâtiment Gregor Mendel, 16 rue Dubois,  
69622 Villeurbanne Cedex

**PRIGENT COMBARET C. (CR CNRS, responsable pour la partie Ecologie Microbienne)**

Téléphone 04 72 44 58 89; Fax : 04 72 43 12 23,  
[prigent@biomserv.univ-lyon1.fr](mailto:prigent@biomserv.univ-lyon1.fr)

**JOCTEUR MONROZIER L. (CR CNRS),**  
[lucile.jocteur-monrozier@univ-lyon1.fr](mailto:lucile.jocteur-monrozier@univ-lyon1.fr)

**MOËNNE LOCOZ Y., (Pr. Université Lyon 1)**  
[moenne@biomserv.univ-lyon1.fr](mailto:moenne@biomserv.univ-lyon1.fr)

**POIRIER Marie Andrée, (TCE CNRS),**  
[poirier@biomserv.univ-lyon1.fr](mailto:poirier@biomserv.univ-lyon1.fr)

**ECOLE VETERINAIRE DE LYON**  
1, Avenue Bourgelat- BP 83, 69280 Marcy L'Etoile.  
Tel +33(0)4 78 87 25 53, Fax +33(0)4 78 87 25 54

**Pr. VERNOZY- ROZAND C,**  
DVM, Expert au Comité Microbiologie de l'AFSSA  
Responsable de l'Unité de Microbiologie Alimentaire et Prévisionnelle  
[c.vernozy@mail.vet-lyon.fr](mailto:c.vernozy@mail.vet-lyon.fr)

## **Doctorants**

**S. TEXIER** (Université de Savoie- INRA), *co- direction Prigent- Combaret – Trévisan.*  
(Prof P Faivre).

**B. FREMAUX**, (Ecole Vétérinaire de Lyon, Université Lyon 1). *Participation au projet PASTOR sur le suivi des populations d'E.coli pathogènes.*  
(Prof C Vernozzy- Rozand)



# 1. INTRODUCTION

L'ambition scientifique générale du projet « Pastor » est d'apporter des connaissances concernant le transfert et le comportement dans les sols et les eaux, de contaminants bactériens introduits par l'élevage. Dans ce cadre, notre objectif est de **comprendre la survie et de modéliser la dynamique de transfert des sols aux eaux, d'un contaminant type, *Escherichia coli* (*E. coli*), apporté par des troupeaux pâturant un bassin versant** de montagne.

Notre objet d'étude global est donc la contamination des eaux de surface du fait du pâturage c'est-à-dire les **relations milieux - sols - pratiques pastorales - qualité microbiologique des eaux**. Le niveau de synthèse choisi pour la conceptualisation et la modélisation des connaissances est le niveau bassin versant, ce qui permet d'envisager des développements opérationnels relatifs à la maîtrise des pollutions diffuses dues à l'élevage.

Les questions et enjeux scientifiques qui sous-tendent cette thématique de recherche sont de divers ordres. Ils se rapportent tout d'abord à la problématique de **l'introduction de micro-organismes dans l'environnement et en particulier dans le sol** et en second lieu à **celle des transferts diffus des contaminants dans les bassins versants**.

L'introduction de micro-organismes peut résulter de 2 actions différentes : 1) l'apport de souches microbiennes telluriques, sélectionnées pour leurs effets bénéfiques sur les plantes ; on parle alors d'inoculation, 2) l'apport de micro-organismes lié à l'usage, en milieu agricole, de matériaux d'origine biologique contenant des populations d'organismes issus, soit directement de résidus animaux, soit du traitement biologique de ces matériaux préalablement à leur dépôt sur sol ; il s'agit alors de « contamination », cas à l'étude dans ce projet.

Quel que soit le mode d'introduction on s'interroge sur la survie et la dispersion des populations introduites - ici des microorganismes fécaux- dans l'environnement: quels sont les taux de survie ? Y a-t-il colonisation du milieu et donc reprise de la multiplication cellulaire ? Quels contrôles physiques et biologiques se mettent en place ? Quel est l'état physiologique des bactéries « contaminantes » par rapport à celui de bactéries telluriques indigènes ? Quelles propriétés du milieu récepteur, en l'occurrence du sol, influencent le comportement des contaminants ? Quels sont les lieux de « stockage » préférentiels et en conséquence, quelle est la répartition de ces organismes dans l'environnement ? Quelle est la labilité de ces stocks et comment cette propriété est-elle distribuée dans l'espace et le temps ?

Quelques caractéristiques générales de la dynamique des populations microbiennes introduites sont bien connues :

1) l'existence d'une co-introduction simultanée d'un milieu auquel les populations introduites sont adaptées, est un élément favorable à la survie qui évite une compétition immédiate et directe avec les micro-organismes indigènes et retarde la mise en oeuvre de mécanismes d'adaptation au milieu tellurique<sup>1</sup>. La contamination via les déjections animales est un cas type: certains micro-organismes saprophytes ne peuvent survivre qu'en milieu riche<sup>2</sup>;

---

<sup>1</sup> KIVISAAR M., 2003. Stationary phase mutagenesis: mechanisms that accelerate adaptation of microbial populations under environmental stress. [Review]. *Environmental Microbiology*. 5(10): 814- 827.

<sup>2</sup> JENSEN, G. B., HANSEN, B. M., EILENBERG J., MAHILLON J., 2003. The hidden lifestyles of *Bacillus cereus* and relatives. *Environmental Microbiology*. 5(8): 631- 640.

2) les sols présentent une capacité d'hébergement (« capacité biotique ») qui régit l'optimum de densité microbienne dans un volume (ou une masse) donné de sol<sup>3</sup> ; l'inoculation à un niveau supérieur à cette capacité biotique limite la survie des populations introduites ; à l'inverse une densité trop faible ne permet pas le maintien de la population introduite.

Ces connaissances, souvent acquises à l'échelle de l'échantillon de sol ou de la parcelle, sont difficiles à extrapoler à l'échelle où se posent les problèmes relatifs à la gestion de la qualité microbiologique de l'eau, c'est à dire pour des mailles de territoire plus vastes correspondant à des bassins hydrologiques complexes. De ce fait les données disponibles dans la bibliographie représentent souvent plus des éléments de réflexion importants pour bâtir des hypothèses de travail, que des réponses abouties.

Dans le projet « Pastor », la prise en compte de cette dimension spatiale des phénomènes de contamination est un souci constant. En conséquence, les questions scientifiques traitées dans ce projet se réfèrent aussi à la thématique générale du **transfert diffus de polluants dans les bassins versants**<sup>4,5</sup>. Il s'agit, dans ce contexte, de comprendre les mécanismes qui régissent les transferts sols- aquifères de ces colloïdes biologiques que sont les bactéries fécales: quels écoulements sont impliqués ? Quels en sont les facteurs de contrôle? Comment se traduisent- ils à l'exutoire en terme de variabilité de la contamination des eaux ? Comment distinguer les sources critiques de contamination ? etc... Par ailleurs, en lien avec la nécessaire adaptation que suppose la persistance dans l'environnement d'une population entérique, on s'interroge aussi sur la sélection de souches spécifiques pendant les phases de stockage et sur la possibilité qui en résulterait de différencier, à l'exutoire, la contamination par des bactéries récemment entrantes et la contamination par les bactéries ayant séjournées dans le sol.

Toutes ces questions complémentaires se rapportent au fonctionnement du bassin versant comme un système de transformation et de transfert d'un signal de pollution particulier ; les bactéries fécales. Peu d'études abordent la contamination microbiologique des eaux sous cet angle. Le concept de « système de transfert », utilisé pour rendre compte et comparer la dynamique de divers polluants des eaux à travers les structures des bassins versants, pourrait, une fois adapté, constituer un cadre utile pour formaliser et organiser l'information acquise<sup>6</sup>.

Bien évidemment le projet d'étudier la dynamique de contaminants fécaux en zone pastorale de montagne et à l'échelle bassin versant répond aussi à des **enjeux sociétaux**. Les contaminations microbiologiques des eaux sont une problématique mondiale pour la santé humaine<sup>7</sup>. Dans le contexte particulier de la montagne alpine, les problèmes créés par la contamination microbiologique de l'eau sont d'une ampleur particulière. Dans les Alpes du Nord, la contamination microbiologique des eaux de surface est d'ailleurs le principal problème

---

<sup>3</sup> DEJONGHE W., BOON N., SEGHERS D., TOP E. M. and VERSTRAETE W., 2001. Bioaugmentation of soils by increasing microbial richness: missing links. *Environmental Microbiology* 3 (10) : 649- 657.

<sup>4</sup> Dupray G et P Servais, 1999- Bilan des sources de contamination fécale et premiers essais de modélisation ; Rapport Piren- Seine , Paris 14p -

<sup>5</sup> Campbell et al, 2004. Input- output budgets of inorganic nitrogen for 24 forestwatersheds in N.E USA a review *Water Air Soil Pollution Springer*, New York, NY, 151:373- 396, (2004).

<sup>6</sup> WANG D., DORIOZ J. M., TREVISAN D., BRAUN D. C., WINDHAUSEN L. J., VANSTEELANT J. Y., 2003. Using a landscape approach to interpret diffuse phosphorus pollution and assist with water quality management in the basin of Lake Champlain (Vermont) and Lac Léman (France) In T. O. Manley and P. L. Manley (eds.) *Lake Champlain in the New Millennium* (tentative title). *Water Science and Application*. Vol. 2. American Geophysical Union.

<sup>7</sup> EGLI T., KOSTLER W., MEILE L., 2002. Pathogenic microbes in water and food: changes and challenges. *FEM microbiology reviews* 26 : 11- 112.

de pollution des eaux relevé par les utilisateurs<sup>8</sup>. Les pollutions fécales perturbent certains usages de l'eau, en premier lieu l'eau potable. A titre d'exemple, les services sanitaires de Haute Savoie, estiment que près de 30% des unités de distribution de l'eau potable ont des taux de conformité médiocres (entre 50% et 80% d'analyses conformes), alors que 24 % sont de mauvaise qualité (moins de 50% d'analyses conformes)<sup>9</sup>. La question de la qualité de l'eau potable est d'autant plus cruciale que la montagne s'urbanise, que le tourisme hivernal se développe et qu'une partie des réserves est mobilisée pour la neige de culture (cette demande ne peut que s'amplifier<sup>10</sup>). D'autres activités sont également dépendantes de la qualité microbiologique de l'eau, notamment les usages agro- alimentaires (alimentation des troupeaux, risque pour les fabrications fromagères fermières) ou les usages récréatifs (baignade, sports d'eaux vives). La mauvaise situation sanitaire actuelle des eaux n'est évidemment pas en accord avec l'image largement répandue de l'eau pure des montagnes ; elle n'est pas non plus compatible avec les fonctions portées par cet espace, celle de château d'eau de l'Europe, celle d'une politique agricole basée sur la haute qualité des produits<sup>11</sup>.

En montagne, il existe tout un ensemble de propriétés hydrogéologiques (couverture sol discontinu et milieux fissurés) peu favorables à la filtration des micro- organismes. Ceci explique l'ampleur des contaminations microbiennes observées. Du fait des pentes, les aquifères sont en outre fortement et rapidement connectés entre eux. C'est le cas en particulier au niveau des **têtes de bassins** : ces territoires fragiles qui supportent une forte activité pastorale et sont en général les lieux de production de la ressource en eau potable, ont une importance particulière pour les problèmes associés aux contaminations. Un point préoccupant est la présence chez les bovins (porteurs sains) de souches d'*E.coli* potentiellement pathogènes pour l'homme telles que les *E.coli* productrices de shigatoxines (désignées sous le terme de STEC pour *Shiga toxin-producing E.coli*). La dissémination de cette souche en relation avec les parcours des troupeaux n'a jamais été envisagée, alors qu'elle a déjà fait l'objet d'investigations dans les cas d'apports ponctuels de fumure organique en conditions contrôlées<sup>12,13</sup>.

Face aux constats mettant en avant les risques de dégradation des ressources alpines en eau du fait d'activités agricoles, des recherche- développement sur des **sites pilotes de montagne** ont été mis en place par le « GIS Alpes du Nord » (structure associant des Instituts de Recherche et le Développement agricole, [http : //www. alpes- du- nord. com/gis/index. html](http://www.alpes-du-nord.com/gis/index.html)). En raison d'attentes spécifiques, les travaux ont porté sur la caractérisation de la charge contaminante des effluents d'élevage<sup>14</sup>, l'incidence des épandages d'engrais de ferme<sup>15</sup> et les risques liés aux

---

<sup>8</sup> BALIAN E., 1995. Problèmes de Qualité des eaux en montagne. GIS Alpes du Nord, Chambéry, 30p + annexes.

<sup>9</sup> DDASS 74, 1998. Les eaux de distribution publique en Haute Savoie. Qualité microbiologique. Etat du 1 janvier 1998. Plaquette Ministère de l'emploi et de la solidarité. Préfecture de Haute Savoie.

<sup>10</sup> E. DUGLEUX, A. L. ROUX, 2002. Impact de la production de neige de culture sur la ressource en eau. In L'eau en Montagne. Gestion intégrée des Hauts Bassins versants. Megève, 4,5,6 septembre 2002.

<sup>11</sup> FLEURY P et al., 1999. Activité agricole et qualité de l'environnement dans les Alpes du Nord. In " recherche, Agriculture et développement régional ", convention INRA Rhône- Alpes. 26 octobre 1999, Lyon, INRA éditions, Paris: 79- 108.

<sup>12</sup> BOLTON DJ, BYRNE CM, SHERIDAN JJ, MCDOWELL DA, BLAIR IS. (1999) The survival characteristics of a non- toxigenic strain of *Escherichia coli* O157:H7. *J Appl Microbiol.* 86(3):407- 11.

<sup>13</sup> JIANG X, MORGAN J, DOYLE MP, 2002. Fate of *Escherichia coli* O157:H7 in manure- amended soil. *Appl Environ Microbiol.* 68 (5): 2605- 9.

<sup>14</sup> GONNOR F., 2000. Gestion des risques de contamination bactériologique par les effluents d'élevage dans le P. N. R. du Vercors. Mem. Dess, Espace Rural et Environnement, Univ. Dijon, 48p + annexes.

<sup>15</sup> TREVISAN, D., J. Y. VANSTEELANT, J. M. DORIOZ, 2002. Survival and leaching of fecal microorganisms after slurry spreading on mountain hay meadows : consequences for the management of water contamination risk. *Water research*, 36 : 275- 283.

épandages agricoles de boues de station d'épuration<sup>16</sup>. La portée générale de cet ensemble de références techniques est cependant réduite du fait de l'absence de connaissances scientifiques intégratrices abordant globalement le devenir des microorganismes fécaux dans l'environnement. De telles connaissances permettraient de développer des outils d'évaluation des relations pratiques d'élevage- qualité des eaux, point clé des réflexions en cours sur la durabilité des systèmes d'utilisation agricole des territoires de montagne. Au delà du cas alpin, c'est l'ensemble des surfaces pour lesquelles l'extensification du pâturage est pressentie comme une alternative adaptée aux enjeux territoriaux et environnementaux, qui serait concerné<sup>17</sup>. Nous proposons de contribuer à ces réflexions en développant des études sur des objets modèles conjuguant diversité des conditions de milieux et relative unité d'utilisation agricole: les unités pastorales de type alpage.

## 2. OBJECTIFS DETAILLES

Notre projet s'inscrit dans les enjeux scientifiques et opérationnels évoqués précédemment sans pour autant les reprendre tous en détail. Notre objectif est d'apporter des connaissances et des références sur trois volets complémentaires.

Déterminer et caractériser les **lieux de stockage, la survie et l'état des *E.coli*** dispersés par les activités pastorales sur les divers types de sols du territoire étudié. Une comparaison avec la dynamique de bactéries telluriques types, les *Pseudomonas* fluorescents est effectuée. La détermination du potentiel de survie dans les divers sols de sous- populations d'*E.coli* potentiellement pathogènes (STEC), complète le diagnostic sur les réservoirs environnementaux pour ces micro- organismes indicateurs et/ou à risque.

Comprendre la **dynamique des *E.coli* à l'échelle sols et bassin versant** afin d'établir un **modèle** reliant le fonctionnement du système de transfert (hydrologie, dispersion pastorale, stockages) avec la variabilité de la qualité microbiologique des eaux à l'exutoire. La modélisation ouvre la possibilité de tester le poids des divers facteurs, d'identifier ainsi les pratiques à risques, les zones et époques critiques. L'étude des régimes d'exportation d'eau et de matières du bassin versant fournit d'autres informations sur le comportement saisonnier du système étudié.

Evaluer dans quelle mesure leur **introduction dans l'environnement peut représenter un stress pour les bactéries fécales**, aboutissant à sélection de certaines populations adaptées et/ou à la modification de leur état physiologique. Il s'agit de déterminer si les (sous) populations d'*E.coli* présentes dans les sols des différentes sous- unités pastorales sont semblables ou non à celles des bouses et à celles de l'eau à l'exutoire, investigations qui pourraient permettre de trouver une « signature » identifiant les origines de la contamination de l'eau. Notre objectif est dans cet optique de comparer la structure génétique des populations d'*E. coli* dans les différents compartiments du bassin versant, dans les bouses (entrées), les sols des différentes unités pastorales étudiées et l'eau à l'exutoire du bassin versant (sorties), afin de contribuer à identifier les sources potentielles de contamination de l'eau à l'exutoire. Il s'agit aussi de mettre au point des outils d'analyse de l'état physiologique des communautés bactériennes, qui permettent

---

<sup>16</sup> VANSTEELANT J. Y, 2004. Evaluation des risques de contamination microbiologiques liés aux épandages de matières organiques sur prairie de montagne, Thèse Doc. Univ. Savoie, Chambéry, 171p.

<sup>17</sup> DURU M., B. HUBERT, 2003. Management of grazing systems : from decision and biophysical models to principles for action. *Agronomie*, 23 : 689- 703.

d'analyser et suivre la réponse des populations bactériennes aux changements des conditions environnementales.

**Intégrer les connaissances** théoriques acquises par le projet dans un cadre plus opérationnel à destination des gestionnaires de l'eau et des exploitations agricoles, c'est-à-dire à l'échelle bassin versant. L'objectif est de faciliter le **développement de concepts et d'indicateurs** utilisables pour une gestion de l'espace pastoral adaptée aux enjeux de la qualité des eaux. Ceci suppose de replacer l'ensemble des informations obtenues dans une perspective d'analyse globale du système, c'est-à-dire dans le contexte des relations milieux- végétations- troupeaux.

Pour traiter ces objectifs, **Pastor** s'intéresse à un " modèle naturel " constitué par un bassin versant (environ 200 ha, 1500- 2000 m, étage subalpin) occupé par une seule unité pastorale installée dans ce vallon depuis plusieurs centaines d'années (alpage laitier de Bise, situé dans les pré- alpes calcaires du Chablais, avec près de 100 unités de gros bétail –UGB- ). La conceptualisation et la formalisation du fonctionnement de ce territoire en tant que **système de transfert de contaminants fécaux** orienteront les travaux de synthèse et en assureront une portée générale et opérationnelle.

### 3. ETAT DES CONNAISSANCES

Diverses informations sont disponibles dans la littérature concernant la contamination des eaux de surface en relation avec le fonctionnement hydrologique et agricole des sols. Une analyse succincte de ces références permet un premier cadrage relatif aux divers objets d'étude qui structurent cette problématique, aussi bien en ce qui concerne les dynamiques globales de l'environnement pastoral que les processus qui y prennent place, en l'occurrence le comportement des microorganismes dans les sols.

#### 3.1. L'agrosystème pastoral: un « objet » agronomique bien connu.

Les alpages sont des unités pastorales d'altitude situés en général à l'étage subalpin c'est à dire dans un contexte à fortes contraintes climatiques. La pratique du pastoralisme est séculaire; elle s'effectue dans des milieux herbacés très diversifiés et associés à une large gamme de sols<sup>18</sup>.

Les alpages sont des agroécosystèmes. Les recherches antérieures décrivent le fonctionnement global de ce système. Les interactions sols- végétations- troupeaux s'avèrent toujours structurantes au plan agronomique et écologique. La disponibilité et l'appétence de l'herbe orientent le parcours des troupeaux et les choix des bergers. Elles dépendent de la topographie (accessibilité, phénologie et topoclimat) et des sols. En retour, l'intensité et le mode de pâturage modifient profondément le fonctionnement et la dynamique du couvert végétal à moyen et court terme (exemple: refus dus aux déjections). A long terme, ce sont les propriétés biologiques des sols (cycles de N et C, dynamique du P) et parfois leurs propriétés physiques (porosité) qui évoluent **Erreur ! Signet non défini.**

Selon la position dans l'alpage, le rôle des diverses interactions et la hiérarchie des facteurs changent. Ainsi, l'état calcique ou acide du sol a un rôle crucial à la périphérie des alpages en

---

<sup>18</sup> Van OORT F., et DORIOZ J. M., 1991. Approche agropédologique des zones pastorales sur calchistes sédimentaires (Beaufortain- Alpes du Nord). 1 Caractères de l'altération, propriétés hydriques et porales associées. *Agronomie*, 11, p. 293- 303.

contrôlant l'absence ou la présence d'espèces clés vis à vis de l'appétence du fourrage pour les animaux. Les facteurs clés sont différents à proximité des bâtiments: dans des conditions d'enrichissement généralisé des sols par les déjections, la phénologie et la vitesse de déneigement apparaissent souvent comme les facteurs déterminants pour l'état des végétations et leur utilisation par les animaux<sup>19</sup>. Cette diversité et les gradients spatiaux qui en résultent, déterminent un nombre limité de « **faciès pastoraux** », unités agroécologiques caractérisées par une végétation type (composition, productivité, phénologie), un sol type et traduisant un équilibre sur le moyen terme (quelques années), entre mode de fréquentation par les animaux (intensité relative du prélèvement et des restitutions, piétinement) et un état trophique du sol (S/T, C/N...). Les travaux antérieurs fournissent les références nécessaires à la différenciation de ces faciès sur le terrain. Leurs dynamiques d'évolution sont également connues. Fait important pour les choix méthodologiques de Pastor, sauf changement drastique de pratique, les types de végétation et l'état des sols sont stabilisés à l'échelle de 4 à 3 ans. Enfin, on dispose de typologies des sols, des associations végétales et des pratiques<sup>20,21</sup>.

L'ensemble des données agronomiques sur les alpages est actuellement pleinement valorisé dans le cadre de la caractérisation des terroirs et de la biodiversité (travaux du GIS Alpes du Nord). Comparativement, les connaissances sur les relations entre pratiques pastorales et qualité des eaux dans ces milieux situés en tête de bassin versant, sont très fragmentaires et insuffisantes pour des applications concrètes.

### **3.2. Le bassin versant: un cadre conceptuel classique pour l'étude de la pollution diffuse.**

L'étude des pollutions hydriques à l'échelle d'un vaste territoire se heurte à deux difficultés: 1) la variabilité spatiale (des mécanismes, des états, des apports); 2) l'émergence de processus nouveaux lors des changements d'échelle (interactions, couplages - découplages entre polluants, érosion des berges, effet du transport...). Les difficultés à extrapoler sur de grands espaces, les informations recueillies à l'échelle du système plante- sol, expliquent le succès de l'approche bassin versant en matière de recherche et de mesure de la pollution, notamment de pollution diffuse agricole<sup>22,23,24</sup>.

L'**approche bassin versant** consiste à enregistrer à l'exutoire des signaux qui résultent d'une intégration spatiale des processus et qui peuvent être traduits en bilans ou en typologie de fonctionnement reliant, état du bassin, entrées et exportations. En terme de recherche sur les processus élémentaires, le bassin versant constitue aussi un cadre précieux qui permet de

---

<sup>19</sup> DORIOZ J. M., et J. P. PARTY., 1987. Dynamique écologique et typologie de territoires pastoraux des Alpes du Nord. *Acta Oecol.* 8: 257- 280.

<sup>20</sup> LEGROS J. - P., PARTY J. - P., DORIOZ J. M., 1987 - Répartition des milieux calcaires, calciques et acidifiés en haute montagne calcaire humide - conséquences agronomiques et écologiques. *Doc. cartogr. Ecol.*, 30, p. 137- 157.

<sup>21</sup> TREVISAN D, DORIOZ J. M., 1995. Couverture pédologique et surfaces fourragères de montagne. Guide simplifié d'observation du profil de sol. GIS Alpes du Nord, 25 p.

<sup>22</sup> LEITE L. A., 1990. Réflexions sur l'utilité des modèles mathématiques dans la gestion de la pollution diffuse d'origine agricole. Thèse doctorat, Ecole Nationale des Ponts et Chaussées, 342 p + annexes.

<sup>23</sup> GRIL J.- J., DORIOZ J.- M., 2002 – Des bassins versants de recherches aux bassins opérationnels : quels bassins versants pour connaître et maîtriser les pollutions diffuses ? *Ingénieries*, 39 p. 3- 16. (843)

<sup>24</sup> AQUAE 2004. Effets de la gestion des bassins versants sur les transferts particuliers et dissous et sur la qualité biologique des eaux de surface en zone d'élevage action structurante Inra – cemagref « aquae » : Rapport Coord. Dorioz J.M. et Ombredanne D. 28 p.

replacer toute étude de processus dans un contexte macroscopique représentatif vis-à-vis des impacts sur les milieux aquatiques et des durées de transferts<sup>25</sup>.

En écologie, depuis les travaux de Likkens (1975- 80) sur les écosystèmes forestiers, le bassin versant sert d'observatoire pour l'étude des fonctionnements biogéochimiques. Sur la base de bilans et d'études des relations concentrations - débits, on détecte et évalue, à partir du signal à l'exutoire, des perturbations dues aux pratiques culturales forestières, aux phénomènes globaux comme les « pluies acides », à l'intensification de l'agriculture ou encore au réchauffement climatique<sup>26,27</sup>. Le bassin versant peut aussi servir de dispositif expérimental pour tester des aménagements ou des nouvelles pratiques<sup>28</sup>. Enfin, c'est une échelle privilégiée pour l'action contre la pollution des eaux, ce qui permet une bonne résonance entre recherche et gestion<sup>29</sup>.

Pour les hydrologues, le bassin versant est un « système ouvert, non linéaire, non stationnaire » qui opère une transformation de la pluie (signal d'entrée) en un débit (signal de sortie) et dont les composants sont organisés en « cascade ». Les hydrologues portent une attention de plus en plus grande à la géométrie du système, à la distribution spatiale des phénomènes et notamment aux « **zones contributives** » qui représentent les zones qui, au sein d'un bassin, contrôlent les processus hydrologiques. Dans les bassins forestiers et de prairies, lorsque les contaminants sont transférés par des flux de ruissellement de surface, ces zones contributives correspondent le plus souvent à des zones saturées, dont le fonctionnement et l'extension sont analysés avec des concepts relatifs à l'hydrologie des sources variables<sup>30</sup>. Différents modèles s'y rapportent, tels TOPMODEL qui intègre des propriétés morphométriques des bassins<sup>31</sup>, ou encore TNT<sup>32</sup> et SMDR<sup>33</sup> qui proposent une approche distribuée du problème, où l'espace est discrétisé et le comportement de chaque maille élémentaire analysé pour rendre compte de l'évolution des nappes et des flux d'eau qui traversent la couverture pédologique.

Dans ce contexte théorique et opérationnel, les représentations de l'objet bassin versant en tant que « **système de transfert** » de la pollution considèrent souvent le bassin comme un ensemble qui produit, consomme, transforme, stocke, en bref « métabolise » avant de transférer, en différé, à l'exutoire<sup>34</sup>. Ce schéma, qui propose une représentation du bassin versant comme un ensemble de compartiments fonctionnels, varie dans le détail selon la substance étudiée et les échelles de travail. Les processus hydrologiques qui gouvernent les transferts dépendent de

---

25 JORDAN MEILLE L., DORIOZ J. M., WANG D., 1998. Analysis of the export of diffuse phosphorus from a small rural watershed. *Agronomie*, 18: 5- 26

26 Idem 23

27 Hornung M., Reynolds B., 1995 The effects of natural and anthropogenic environmental changes on ecosystem processes at the catchment scale, *Trends Ecol. Evol.* 10 (1995) 443- 449.

28 MEALS D. W., and D. C. BRAUN, 2006. Demonstration of methods to reduce E. coli runoff from dairy manure application sites. *J. Environ. Qual.* 35: 1088- 1100.

29 DORIOZ J. M., TREVISAN D., 2001. Transfert de phosphore des bassins versants agricoles vers les eaux de surface : l'expérience du bassin lémanique et sa portée générale. *Agrosol* vol 12 n°2 IRDA Québec p. 85- 97.

30 MEROT P., 1998. Agriculture intensive et qualité des eaux. Collection Sciences Update, INRA Ed, Paris, 297p.

31 Durand P, Gascuel- Odoux C. et Cordier M.O., 2002. Paramétrisation de hydrological models : a review and lessons learned from studies of an agricultural catchment (Naizin, France). *Agronomie* 22, 217- 228. (0.566).

32 BAUJOUAN V, DURAND P., RUIZ L., 2001. Modelling the effect of spatial distributino of agricultuel practices on nitrogen fluxes in rural catchments. *Ecological modelling* 137: 93- 105.

33 MARCHANT P. G., W. D. HIVELEY, T. S. STEENHUIS, 2006. Distributed hydrological modelling of total dissolved phosphorus transport in an agricultural landscape, part I: distributed runoff generation. *Hydol. Earth Syst. Sci.*, 10: 245- 261.

34 CASSELL A., KORT R. L, MEALS D. W., ASCHMAN S. G., ANDERSON D. P, ROSEN BH and DORIOZ J. M., 2002 Use of mass balance modelling to estimate phosphorus and bacteria dynamics in watersheds. *Water Sciences and Technology* vol 45, N°9 pp157- 168

certaines propriétés des substances transférées: ainsi les matières en suspension et polluants associés sont transportés par les écoulements de surface, les formes dissoutes sont surtout transportées via l'infiltration et l'écoulement des nappes, y compris en subsurface. Dans le cas du phosphore et des matières en suspension, le stock principal est situé dans les sols du bassin versant ; il évolue sous l'effet des pratiques et des usages et est à l'origine de toute une série de stockages secondaires au niveau des structures de connexion, telles que les fossés ou micro-dépressions.

Le transport de contaminants dans le réseau hydrographique permanent, peut donner lieu à d'autres stockages et à des transformations biologiques ou physico-chimiques qui s'opèrent par exemple au niveau des sédiments<sup>35,36</sup>. Les transformations ne se manifestent vraiment que si les durées de transport sont suffisantes. Les stockages dépendent fortement des caractéristiques du lit des rivières et de l'hydrologie. Ils sont faibles en régime torrentiel. Il existe également des processus qui modifient les substances dissoutes lors de leur transfert par les eaux souterraines; ils sont souvent plus difficiles à investiguer mais leur hétérogénéité et leur importance ne sont pas moins grandes.

Des concepts équivalents peuvent être en théorie appliqués au cas de la pollution par les **bactéries fécales**: la compréhension du transfert suppose alors d'identifier comment s'élaborent des stocks dans l'espace du bassin versant, quels sont les lieux privilégiés de stockage (en relation notamment avec les pratiques agricoles), de mettre en évidence les conditions de rétention, de considérer les connexions permises par l'état hydrique des sols et l'état des écosystèmes aquatiques transporteurs. Il est indispensable, à chaque étape, de prendre en compte la disparition des populations de bactéries contaminantes par compétition, mortalité et/ou prédation. Les bactéries fécales peuvent, à partir des sols, être mobilisées par infiltration ou ruissellement, selon les propriétés physiques du milieu (porosité, fissuration, comportement hydrologique). Les transferts verticaux sont accentués en présence de fissures et de fentes de retrait ou de sols caillouteux<sup>37</sup>. **D'une façon générale, le fonctionnement hydrique du sol est un déterminant clé pour l'intensité et les modalités des transferts des bactéries.** Les transferts sont plus rapides et sur de plus grandes distances, lorsque les écoulements sont de nature gravitaire<sup>38</sup>. A l'échelle du bassin versant, des possibilités de stockage des bactéries fécales à moyen terme existent, certes dans les sols (voir ci-après) mais aussi dans les sédiments fins<sup>39</sup> quand l'hydrologie permet leur rétention.

L'approche bassin versant commence à être appliquée pour l'étude et la modélisation de la contamination fécale des eaux de surface. Les bactéries fécales sont souvent assimilées à des suspensions en raison de leurs propriétés colloïdales et leur aptitude à l'adsorption sur les

---

<sup>35</sup> WANG D., DORIOZ J. M., TREVISAN D., BRAUN D. C., WINDHAUSEN L. J., VANSTEELANT J. Y., 2003. Using a landscape approach to interpret diffuse phosphorus pollution and assist with water quality management in the basin of Lake Champlain (Vermont) and Lac Léman (France) In T. O. Manley and P. L. Manley (eds.) Lake Champlain in the New Millennium (tentative title). Water Science and Application. Vol. 2. American Geophysical Union.

<sup>36</sup> KAY D., Mc DONALD A., 1980. Reduction of coliform bacteria in two upland water supply reservoirs. The significance of distance decay relationships. Water research, 14: 305- 18.

<sup>37</sup> DICKINSON RA, 1991. Problems with using existing transport models to describe microbial transport in porous media. In modelling the environmental fate of microorganisms, C. J. Hurst Ed, Am. Soc. for Microbiol, Washington.:21- 47.

<sup>38</sup> SMITH M. S., THOMAS G. W., WHITE R. E., RITONGA D., 1985. Transport of Escherichia coli through intact and disturbed soil columns. J. Env. Qual. 14:1, 87- 91.

<sup>39</sup> KAY D., Mc DONALD A., 1980. Reduction of coliform bacteria in two upland water supply reservoirs. The significance of distance decay relationships. Water research, 14: 305- 18.



particules du sol<sup>40</sup>. Les investigations partent souvent de fonctions empiriques reliant les teneurs moyennes des eaux et le mode d'occupation des sols, considérant qu'en tout point d'une unité d'occupation des sols il existe un stock homogène en termes d'effectif bactérien, de potentiel de mobilité et d'aptitude à la survie<sup>41,42,43</sup>. Dans une perspective d'amélioration des modèles, des suivis plus fins et des interprétations plus détaillées sont nécessaires pour cadrer les zones actives et l'effet des pratiques (effets des épandages, effets de l'accès des animaux au réseau hydrographique<sup>44</sup>). La tâche est particulièrement ardue dans le contexte fortement hétérogène des prairies pâturées et à notre connaissance, peu de travaux incluent la dynamique et le couplage des processus de stockage et de transfert, en relation avec le calendrier pastoral, la conduite des troupeaux et le comportement animal. La prise en compte de ces phénomènes et des logiques de distribution spatiale, nous semble être **un enjeu scientifique clé** dans l'objectif de progrès conceptuels et appliqués.

### 3.3. Comportement des bactéries fécales dans l'environnement.

Les facteurs susceptibles de contrôler la survie et le transfert des bactéries fécales dans et à partir des sols, ont fait l'objet d'études expérimentales de laboratoire ou de suivis de plein champ<sup>45,46</sup>. Ces approches donnent une première connaissance du comportement des bactéries fécales dans l'environnement. Les potentiels de survie s'avèrent très variables, en relation avec les facteurs biotiques et abiotiques du sol. La prédation par les protozoaires du sol et les interactions de compétition et d'antagonisme avec la microflore indigène du sol jouent un rôle déterminant dans le contrôle des niveaux des populations des bactéries fécales introduites<sup>47</sup>. Ces effets biotiques pourraient varier selon la granulométrie des sols et notamment s'atténuer dans les conditions argileuses<sup>48,49</sup>. D'une manière générale, les propriétés édaphiques influencent les survies qui varient selon la texture, la structure ou les conditions physico- chimiques du sol (en particulier le pH, la matière organique et l'aération). Enfin, les conditions bio- climatiques stationnelles sont également déterminantes, notamment le stress lié aux UV, à la dessiccation et à la température. Les travaux antérieurs montrent également que l'optimum de densité de *E.coli* se situe dans les premiers centimètres du sol, au niveau du mat racinaire. Après épandage, la survie au niveau de la biomasse végétale aérienne est très limitée.

---

<sup>40</sup> JAMIESON R., R. GORDON, D. JOY, H. LEE, 2004. Assessing microbial pollution of rural surface waters. A review of current watershed scale modelling approaches. *Agricultural Water Management* 70: 1- 17.

<sup>41</sup> FRASER R. H., P. K. BARTEN, D. A. K. PINNEY, 1998. Predicting stream pathogen loading from livestock using a geographical information system- based delivery model. *J. Environ. Qual.* 27: 935- 945.

<sup>42</sup> HAYDON, A., A. DELETIC, 2007. Sensitivity testing of a coupled Escherichia coli – Hydrologic catchment model. *J. Hydrol.* 338: 161- 173.

<sup>43</sup> TIAN Y. Q., P. GONG, J. D. RADKE, J. SCARBOROUGH, 2002. Spatial and temporal modelling of microbial contaminants on grazing farmlands. *J. Environ. Qual.* 31:860- 869.

<sup>44</sup> HUNTER C., MCDONALD A., 1991. Seasonal changes in the sanitary bacterial quality of water draining a small upland catchment in the yorkshire dales. *Water Research*, 25(4), 447- 453

<sup>45</sup> SMITH M. S., THOMAS G. W., WHITE R. E., RITONGA D., 1985. Transport of Escherichia coli through intact and disturbed soil columns. *J. Env. Qual.* 14:1, 87- 91.

<sup>46</sup> TREVISAN D., J. Y. VANSTEELANT, J. M. DORIOZ, 2002. Survival and leaching of fecal microorganisms after slurry spreading on mountain hay meadows : consequences for the management of water contamination risk. *Water research*, 36 : 275- 283.

<sup>47</sup> MARINO R. P., GANNON J. J., 1991. Survival of fecal coliforms and fecal streptococci in storm drain sediment. *Wat. Res.* 25:1089- 1098

<sup>48</sup> ENGLAND L. S., H. LEE, AND J. T. TREVORS. 2003. Bacterial survival in soil: effect of clays and protozoa. *Soil Biol. Biochem.* 25:525- 531.

<sup>49</sup> GERBA C. P., BITTON G., 1994. Microbial pollutants : their survival and transport pattern to groundwater. In *Groundwater pollution microbiology*, Krieger publishing compagny, Malabar, Florida: 65- 85.

Des conclusions équivalentes peuvent être tirées des études sur le comportement de la souche pathogène *E. coli* O157 : H7. Les facteurs tels que la température, le degré d'humidité, la flore de compétition ou le ratio sol/fumure semblent jouer un rôle dans la survie du pathogène dans le sol<sup>50</sup>. Ainsi, *E. coli* O157 : H7 est capable de persister durablement dans les sols (jusqu'à 231 jours dans des sols sous prairies<sup>51</sup>). La survie est prolongée dans les sols argileux ou riches en matière organique<sup>52</sup>. Pour autant, l'apport de fumier ne favorise pas systématiquement la survie des entérobactéries, notamment lorsque les sols sont déjà riches en éléments nutritifs<sup>53</sup>. L'application intensive de fumier au sol peut au contraire se traduire par une forte inactivation de *E. coli* du fait de l'augmentation des densités des flores prédatrices, antagonistes et compétitives<sup>54</sup>. Ces mêmes auteurs montrent que le gel, même sur de longues périodes, permet de conserver la viabilité d'*E. coli* O157:H7.

Les pratiques de fertilisation agricole semblent donc avoir une incidence forte sur le devenir des micro-organismes fécaux, soit indirectement par leurs effets sur la biomasse végétale ou sur les propriétés structurales, physico-chimiques et biologiques des sols (matière organique, nutriments), soit plus directement, en relation avec la distribution, l'épaisseur et la nature des amas organiques à la surface des sols. L'état physique de ces derniers, notamment leur plasticité, épaisseur... est déterminant dans la survie des bactéries fécales à la surface des sols<sup>55</sup>. Un certain nombre de travaux rapprochent d'ailleurs l'état physique des bouses (en relation avec leur vieillissement) et survie des bactéries fécales<sup>56,57</sup>. A notre connaissance, les investigations doivent être poursuivies pour mieux caractériser le comportement des populations de bactéries fécales au sein et au voisinage des bouses, et les modalités d'introduction des bactéries dans les sols ou les eaux, à partir de celles-ci.

### **3.3.1. Etat des micro-organismes fécaux dans le sol.**

La densité de bactéries dans un échantillon est généralement déterminée par des méthodes de culture sur milieu synthétique; il s'agit de géloses nutritives comportant ou non des éléments "électifs" (qui permettent d'enrichir les bactéries cultivables en populations qui présentent un intérêt particulier). Les résultats sont exprimés en « UFC » pour unités formant colonies. L'évolution du nombre de micro-organismes ainsi déterminé en fonction du temps, permet d'exprimer un taux de survie. Cependant, à ce jour, on ne dispose pas de numération totalement fiable, car les UFC varient considérablement selon l'état physiologique dans lequel se trouvent les bactéries ciblées et selon le groupe nutritionnel auquel elles appartiennent. Il existe en fait des **bactéries viables non cultivables** (« VBNC »); cette notion est rarement prise en compte dans la démarche de suivi des bactéries introduites dans l'environnement sol. Le développement de

---

<sup>50</sup> FREMAUX B., PRIGENT- COMBARET C., VERNIZY- ROZAND C. Long- term survival of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in cattle effluents and environment: an updated review Vet. Microbiol., in press

<sup>51</sup> JIANG X., MORGAN J., DOYLE, M. P., 2002. Fate of *Escherichia coli* O157:H7 in manure- amended soil. Appl. Environ. Microbiol. 68: 2605- 2609.

<sup>52</sup> FENLON D. R., OGDEN I. D., VINTEN A. SVOBODA I., 2000. The fate of *Escherichia coli* and *E. coli* O157 in cattle slurry after application to land. Symp. Ser. Soc. Appl. Microbiol. 88: 149S- 156S.

<sup>53</sup> GAGLIARDI J. V., KARNS J. S., 2002. Persistence of *Escherichia coli* O157:H7 in soil and on plant roots. Environ. Microbiol. 4: 89- 96.

<sup>54</sup> JIANG X., MORGAN J., DOYLE, M. P., 2002. Fate of *Escherichia coli* O157:H7 in manure- amended soil. Appl. Environ. Microbiol. 68: 2605- 2609.

<sup>55</sup> VANSTEELANT J. Y., 2004. Evaluation des risques de contamination microbiologiques liés aux épandages de matières organiques sur prairie de montagne, Thèse Doc. Univ. Savoie, Chambéry, 171p.

<sup>56</sup> KRESS, M., G. F. GIFFORD, 1984. Fecal coliform release from cattle fecal deposits. Water Resour. Bull. 20: 61- 66.

<sup>57</sup> SINTON L. W., BRAITHWAITE R. B., HALL C. H., MACKENZIE M. L., 2007. Survival of indicator bacteria in bovine feces on pasture, App. Environ. Microbiol., 73(24): 7917- 7925.

**méthodes enzymatiques** permettant la détection de bactéries non cultivables<sup>58,59,60</sup> représente une alternative encore peu employée bien qu'adaptée à l'énumération des bactéries fécales dans les milieux riches en particules. Il est également possible d'apprécier le nombre total de bactéries viables grâce aux méthodes moléculaires de type **MPN- PCR** (nombre le plus probable). Le nombre de cellules viables de la population d'intérêt est estimé indépendamment de la cultivabilité, en réalisant des dilutions successives de l'échantillon, ceci jusqu'à l'obtention d'une dilution à partir de laquelle il n'existe plus d'amplification d'une séquence caractéristique de la population cible<sup>61</sup>.

Les raisons pour lesquelles la cultivabilité ne constitue pas un support totalement fiable pour évaluer le taux de survie de micro- organismes ne sont encore que partiellement connues. Dans les conditions naturelles, les bactéries doivent en effet s'adapter constamment à des changements de disponibilité en éléments nutritifs ou à des conditions de stress (chocs osmotique, oxydatif ou thermique, exposition aux rayonnements ultraviolets). Après une exposition à des conditions de stress, la croissance bactérienne est fortement réduite voire stoppée avec, le cas échéant, entrée des cellules en phase de dormance. A l'heure actuelle, mise à part la prise en compte de l'état VBNC, il n'existe pas de méthode permettant d'évaluer d'une façon plus fine l'**état physiologique** (état de division ou dormance) dans lequel se trouvent les populations microbiennes dans les sols. Mais avec le développement des techniques moléculaires, des pistes de travail semblent prometteuses. Il existe en effet une possibilité d'apprécier cet état physiologique à partir du suivi du niveau d'expression de gènes indicateurs soit d'un état de division ou au contraire d'un état stationnaire. Ainsi les gènes *rpoZ*, *fis* et *ftsZ* sont des marqueurs plus fortement exprimés en phase exponentielle de croissance tandis que les gènes *rpoS*, *rnf* et *dps* sont plus exprimés en phase stationnaire. Le gène *rpoZ* code la sous- unité  $\omega$  de l'ARN polymérase ; sa transcription est maximale lors de l'entrée des cellules en phase exponentielle de croissance et nulle en phase stationnaire<sup>62</sup>. Le gène *fis* code une protéine de liaison à l'ADN impliquée dans la coordination de la synthèse des ARN ribosomiaux avec la croissance bactérienne<sup>63</sup>. Il présente un niveau d'expression transitoire en phase exponentielle de croissance<sup>64</sup>. Le gène *ftsZ* code une protéine impliquée dans la formation du septum au cours de la division cellulaire. La transcription de ce gène est restreinte à la phase de division des cellules<sup>65</sup> et, au cours du cycle de division, est maximale lors de la réplication de l'ADN<sup>66,67</sup>. Le

---

<sup>58</sup> FIKSDAL L., M. POMMEPUY, M. P. CAPRAIS, I. MIDTTUN, 1994. Monitoring of fecal pollution in coastal waters by use of rapid enzymatic techniques. *App. Env. Microbiol.*, 60 :5, 1581- 1584.

<sup>59</sup> GEORGE I., M. PETIT, P. SERVAIS, 2000. Use of enzymatic methods for rapid enumeration of coliforms in freshwaters. *J. Applied Microbiol.*, 88 : 404- 413.

<sup>60</sup> GEORGE I., P. CROP, P. SERVAIS, 2001. Use of B- D- galactosidase and B- D- glucuronidase activities for quantitative detection of total and fecal coliforms in wastewaters, *Can. J. Microbiol.*, 47 : 670- 675.

<sup>61</sup> RECORBET G, PICARD C, NORMAND P, SIMONET P., 1993. Kinetics of the persistence of chromosomal DNA from genetically engineered *Escherichia coli* introduced into soil. *Appl Environ Microbiol.* 59: 4289- 94

<sup>62</sup> TRAVERS A., MUSKHELISHVILI G., 2005. DNA supercoiling—a global transcriptional regulator for enterobacterial growth? *Nat. Rev. Microbiol.* 3: 157- 169.

<sup>63</sup> NILSSON L., VERBEEK H., VIJGENBOOM E., VAN DRUNEN C., VANET A., BOSCH L., 1992. FIS-dependent trans activation of stable RNA operons of *Escherichia coli* under various growth conditions. *J. Bacteriol.* 174: 921- 929.

<sup>64</sup> MALLIK P., PRATT T. S., BEACH M. B., BRADLEY M. D., UNDAMATLA J., OSUNA R., 2004. Growth phase- dependent regulation and stringent control of *fis* are conserved processes in enteric bacteria and involve a single promoter (*fis P*) in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 186: 122- 135.

<sup>65</sup> DEWAR S. J., KAGAN- ZUR V., BEGG K. J., DONACHIE W. D., 1989. Transcriptional regulation of cell division genes in *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* 3 : 1371- 1377

<sup>66</sup> GARRIDO T., SA'NCHEZ M., PALACIOS P., ALDEA M., VINCENTE M., 1993. Transcription of *ftsZ* oscillates during the cell cycle of *Escherichia coli*. *EMBO J.* 12: 3957- 3965.

<sup>67</sup> ZHOU P., HELMSTETTER C. E., 1994. Relationship between *ftsZ* gene expression and chromosome replication in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 176: 6100- 6106.

gène *ropS* code un facteur sigma qui s'associe à l'ARN polymérase pour permettre la transcription de gènes cibles lors de l'entrée des cellules bactériennes en phase stationnaire de croissance ou en réponse à des stress environnementaux<sup>68,69</sup>. En phase stationnaire, le nombre d'ARN messagers *rpoS* est plus important du fait de l'augmentation de la demi-vie des transcrits *rpoS*<sup>70</sup> (pour revue<sup>71</sup>). Le gène *rmf* code le facteur de modulation des ribosomes qui participe à la dimérisation des ribosomes 70S en une forme ribosomale 100S inactive. Son niveau de transcription est inversement proportionnel au taux de croissance; il est maximal en phase stationnaire<sup>72</sup>. Enfin le gène *dps* code une protéine de liaison à l'ADN dont elle protège l'intégrité en conditions de stress, sa transcription est induite en phase stationnaire et lors d'états de carence<sup>73,74</sup>.

A notre connaissance, aucune donnée n'est disponible dans la littérature en ce qui concerne les variations des niveaux d'expression de ces marqueurs in situ. La mise au point d'une méthode utilisant ce traçage moléculaire serait donc une avancée dans le contexte des études de la contamination des sols et des eaux.

### **3.3.2. Structure génétique des populations dans l'environnement.**

Différentes études mettent en évidence la structure complexe des populations d'*E.coli* dans les matières fécales et dans l'environnement<sup>75,76,77</sup>. La structure génétique des populations d'*E.coli* varie en fonction de l'espèce animale hôte, de son âge, de son régime alimentaire ou de son origine géographique<sup>Erreur ! Signet non défini.,78</sup>. L'introduction de matières fécales dans le sol ou l'eau peut conduire à la sélection de certaines sous-populations d'*E.coli* adaptées à la croissance dans des milieux plus oligotrophes que les matières fécales.

L'étude de la typologie du peuplement microbien est un outil incontournable pour caractériser un apport, un milieu, un stade fonctionnel. Parmi les déterminants de cette typologie

<sup>68</sup> RAO N. N., KORNBERG A., 1996. Inorganic polyphosphate supports resistance and survival of stationary-phase *Escherichia coli*. *J Bacteriol.* 178: 1394- 400.

<sup>69</sup> DESNUES B., CUNY C., GREGORI G., DUKAN S., AGUILANIU H., NYSTROM T., 2003. Differential oxidative damage and expression of stress defence regulons in culturable and non-culturable *Escherichia coli* cells. *EMBO Rep.* 4: 400- 404.

<sup>70</sup> ZGURSKAYA H. I., KEYHAN M., MATIN A., 1997. The sigma S level in starving *Escherichia coli* cells increases solely as a result of its increased stability, despite decreased synthesis. *Mol. Microbiol.* 24: 643- 651.

<sup>71</sup> HENGGE- ARONIS R., 2002. Signal transduction and regulatory mechanisms involved in control of the sigma(S) (*RpoS*) subunit of RNA polymerase. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 66: 373- 395.

<sup>72</sup> Makinoshima H., Nishimura A., Ishihama A., 2002. Fractionation of *Escherichia coli* cell populations at different stages during growth transition to stationary phase. *Mol. Microbiol.* 43: 269- 279.

<sup>73</sup> SHIMADA T, MAKINOSHIMA H., OGAWA Y., MIKI T., MAEDA M., ISHIHAMA A., 2004. Classification and strength measurement of stationary-phase promoters by use of a newly developed promoter cloning vector. *J. Bacteriol.* 186: 7112- 7122.

<sup>74</sup> Makinoshima H., Nishimura A., Ishihama A., 2002. Fractionation of *Escherichia coli* cell populations at different stages during growth transition to stationary phase. *Mol. Microbiol.* 43: 269- 279.

<sup>75</sup> Johnson, L. K., M. B. Brown, E. A. Carruthers, J. A. Ferguson, P. E. Dombek & M. J. Sadowsky, 2004. Sample size, library composition, and genotypic diversity among natural populations of *Escherichia coli* from different animals influence accuracy of determining sources of fecal pollution. *Appl. Environ. Microbiol.* **70**: 4478- 4485.

<sup>76</sup> Ishii, S., W. B. Ksoll, R. E. Hicks & M. J. Sadowsky, 2006. Presence and growth of naturalized *Escherichia coli* in temperate soils from Lake Superior Watersheds. *Appl. Environ. Microbiol.* **72**: 612- 621.

<sup>77</sup> Byappanahalli, M. N., R. L. Whitman, D.A. Shively, M. J. Sadowsky & S. Ishii, 2006. Population structure, persistence, and seasonality of autochthonous *Escherichia coli* in temperate, coastal forest soil from a Great Lakes watershed. *Environmental Microbiology* **8**: 504- 513

<sup>78</sup> Yang, H.- H., R. T. Vinopal, D. Grasso & B. F. Smets, 2004. High diversity among environmental *Escherichia coli* isolates from a bovine feedlot. *Appl. Environ. Microbiol.* **70**: 1528- 1536.

figure d'abord la structure du peuplement microbien qui est généralement décrite via des éléments conservés du génome bactérien ou fongique, gènes ou intergènes ribosomiques (IGS) à valeur "taxonomique": 16S chez les bactéries (ou IGS 16S- 23S) et 18S chez les champignons. Les comparaisons de profils DGGE (électrophorèse sur gel en gradient dénaturant), ou A- RISA (analyse du polymorphisme de l'intergène 16S- 23S) sont à l'heure actuelle des méthodes adaptées à l'évaluation des perturbations apportées au peuplement bactérien.

Les profils obtenus représentent plus des « empreintes moléculaires » qu'une typologie exacte sous tendue par une répartition connue, même partiellement, des taxons. Il est cependant possible de comparer la typologie de groupes fonctionnels ou des populations bactériennes cibles lorsque les empreintes génétiques sont réalisées sur des gènes de fonctions (tels que le gène *phl* pour les bactéries productrices de phloroglucinols) ou des gènes spécifiques de certains taxons (tels que le gène *uidA* pour les *E.coli*). La DGGE *uidA* est une technique qui a été validée par différents groupes, pour l'étude des populations d'*E. coli* dans de l'eau ou des sédiments. A notre connaissance, son application au suivi de la structure des populations d'*E. coli* dans le sol n'a jamais été validée. Son application à l'étude des populations entériques dans les différents compartiments bouses (entrées)/sol (stockages)/eau (sorties) du bassin versant devrait permettre de différencier des origines de contaminations à l'exutoire et d'évaluer les zones du bassin qui contribuent le plus à la contamination des eaux.

#### **4. CADRE CONCEPTUEL: modèles biologiques, système étudié, hypothèses et démarche de travail**

Le tour d'horizon réalisé dans le chapitre précédent souligne d'une part, la grande diversité des objets d'étude, des échelles et des concepts utilisables pour les recherches sur la contamination fécale des eaux et d'autre part, le potentiel d'innovation lié aux outils moléculaires actuellement disponibles. Dans un tel contexte, la mise au point d'une démarche cohérente d'ensemble est une étape clé de notre projet. Il s'agit notamment d'articuler des stratégies de recherche et de suivis relevant de disciplines différentes : sciences du sol, écologie microbienne, hydrologie et écologie pastorale. En conséquence, dès la conception du projet, nous définissons avec soin des choix méthodologiques communs, partant de points de vue partagés sur les objets d'étude complémentaires. Ces choix et représentations, confrontés à la réalité du terrain et aux réponses inattendues, ont évolué lors de l'étude; ils méritent donc d'être ré-explicités. Il s'agit du choix:

1) relatif aux **modèles biologiques** : *E.coli* est au centre de ce projet; sa dynamique est comparée dans la mesure du possible à celle de *Pseudomonas* fluorescents et à celle des souches de *E. coli* STEC ;

2) de représentations conceptuelles du « **système étudié** » construites progressivement aux différents niveaux où sont organisées les investigations et/ou les synthèses: niveau élémentaire de la rhizosphère, système sol- végétation à l'échelle station et niveau intégrateur du bassin versant;

3) d'une démarche prenant en compte au mieux la **diversité spatiale et temporelle**, biophysique et agronomique, inhérente au cadre montagnard et au système pastoral, ce qui suppose de définir la variabilité et les typologies de paramètres locaux (végétation, comportement animal, écoulements...);

4) d'intégrer la **modélisation** dans notre démarche, pour rendre compte des couplages entre hydrologie, agronomie et microbiologie, mais aussi pour analyser les transferts à l'échelle bassin versant et tester ainsi certaines hypothèses sur les zones actives du système.

#### 4.1. Modèles biologiques

Dans ce travail, nous avons choisi d'étudier deux populations bactériennes différentes : la première en tant qu'indicateur de contamination fécale, la seconde en tant que population tellurique de référence.

Les coliformes fécaux ou thermotolérants sont les principaux indicateurs de contamination fécale utilisés en Europe. Ils correspondent à un sous- groupe des coliformes capables de fermenter le lactose à 44°C. Ce groupe bactérien comprend certaines espèces des genres *Citrobacter*, *Enterobacter*, et *Klebsiella* ainsi que l'espèce *E. coli*. Cette dernière représente 80 à 90% des coliformes thermotolérants généralement détectés dans l'eau. Bien que la présence de coliformes fécaux témoigne la plupart du temps de la présence de contamination fécale, tous les coliformes fécaux ne sont pas d'origine fécale<sup>79</sup>. *E. coli* est considérée classiquement comme l'une des rares espèces de ce groupe, présente de façon spécifique dans le tractus intestinal des animaux à sang chaud, fortement excrétée dans les matières fécales (environ 10<sup>7</sup> par gramme de matière sèche chez les bovins) et semblant ne survivre que de façon transitoire dans l'environnement. Ces caractéristiques font d'*E. coli* un **indicateur idéal de contamination fécale** (Edberg et al, 2000). Il est de fait classiquement utilisé pour le contrôle de la qualité microbiologique de l'eau (norme AFNOR NF T 90- 414) et des aliments<sup>80</sup>.

De plus, même si la majorité des souches d'*E.coli* sont commensales, certaines sont à l'origine de diverses pathologies intestinales et extra- intestinales<sup>81</sup> ce qui fait également d'*E. coli* un indicateur d'un risque sanitaire potentiel. Les ***E. coli* pathogènes** de l'intestin sont subdivisés en six groupes différents parmi lesquels : entérohémorragiques (EHEC), entérotoxigènes (ETEC), entéroinvasifs (EIEC), entérotoxigènes (EPEC), entéroaggrégatifs (EAEC) et à adhérence diffuse (DAEC). Les EHEC sont considérés comme l'un des plus importants groupes de pathogènes responsables de toxico-infections alimentaires. Ils sont à l'origine de pathologies plus ou moins sévères, en fonction de l'état de santé du patient et de son âge, allant d'une diarrhée peu hémorragique à des colites hémorragiques ou des syndromes hémolytiques et urémiques (SHU) chez l'enfant. Les EHEC possèdent différents gènes de virulence dont les gènes *stx* codant les shigatoxines. L'ensemble des bactéries possédant au moins un gène *stx* représente le groupe des STEC pour Shigatoxin- Producing *E. coli*. *E. coli* O157 : H7 est le principal sérotype à l'origine de pathologies chez l'homme. Les bovins sont porteurs sains en STEC avec des prévalences pouvant être supérieures à 70% des animaux testés<sup>82</sup>. Depuis ces 10 dernières années, l'environnement est de plus en plus incriminé dans les épidémies à EHEC<sup>83</sup>. Les épidémies d'origine hydrique sont généralement associées à la

---

<sup>79</sup> Foppen, J. W. A. & J. F. Schijven, 2006. Evaluation of data from the literature on the transport and survival of *Escherichia coli* and thermotolerant coliforms in aquifers under saturated conditions. *Water Res.* 40: 401- 426.

<sup>80</sup> Vernozy- Rozand C., Roze S., 2003. Bilan des connaissances relatives aux *Escherichia coli* producteurs de Shigatoxines (STEC). Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments. (A.F.S.S.A.). Maisons- Alfort. FRA.Pages 220p.

<sup>81</sup> (Orskov et al., 1992) Orskov, F. & I. Orskov, 1992. *Escherichia coli* serotyping and disease in man and animals. *Can. J. Microbiol.* 38: 699-704.

<sup>82</sup> Cerqueira, A.M., Guth, B.E., Joaquim, R.M., and Andrade, J.R., 1999. High occurrence of Shiga toxinproducing *Escherichia coli* (STEC) in healthy cattle in Rio de Janeiro State, Brazil. *Vet Microbiol* 70: 111- 121.

<sup>83</sup> Strachan, N.J., Dunn, G.M., and Ogden, I.D., 2002. Quantitative risk assessment of human infection from *Escherichia coli* O157 associated with recreational use of animal pasture. *Int J Food Microbiol* 75: 39- 51.

consommation d'eau de boisson (provenant de puits, de sources privées ou de réseaux de distribution d'eau non traitée) ou à l'ingestion accidentelle d'eau lors de baignades (dans des étendues d'eau naturelle en raison de la sensibilité d' *E. coli* à la chloration).

Les effectifs en *E. coli* dans les sols et l'eau sont comparés à ceux d'une population hétérotrophe tellurique témoin: les ***Pseudomonas* spp. fluorescents** producteurs d'antibiotiques tels que les phloroglucinols. Il s'agit de populations dominantes dans la rhizosphère des graminées et adaptées à ce biotope. Elles sont capables de contrôler par compétition et par antagonisme la communauté microbienne rhizosphérique et de lutter contre des phytopathogènes majeurs (tels que *Gaeumannomyces tritici* responsable du piétin échaudage du blé, *Fusarium oxysporum* responsable de fusariose, etc) améliorant ainsi l'état sanitaire des plantes. Le 2,4-diacétylphloroglucinol (DAPG) est une molécule antifongique produite par une large diversité de *Pseudomonas* fluorescents. Cette molécule possède également des propriétés antibiotiques vis-à-vis d'entérobactéries telles que *Pectobacterium carotovorum*<sup>84</sup>. Les *Pseudomonas* spp. fluorescents producteurs de DAPG nous servent donc à la fois comme populations rhizosphériques référentes mais également comme populations potentiellement capables de réguler les populations d'*E. coli* dans les sols.

## **4.2. Le système étudié, représentations et compartimentation.**

### **4.2.1. La rhizosphère, un niveau élémentaire.**

La rhizosphère correspond à la partie du sol sous l'influence directe des racines vivantes. Il s'agit souvent d'une couche de sol de l'ordre de 1 mm d'épaisseur autour des racines. L'importance quantitative des systèmes racinaires (et donc de la rhizosphère) varie selon les caractéristiques pédoclimatiques et celles de la communauté végétale, avec des densités racinaires jusqu'à 100- 200 cm de racines par cm<sup>3</sup> de sol dans des sols de prairie<sup>85</sup>.

Dans la rhizosphère, la plante libère une partie des photosynthétats sous la forme de rhizodépôts organiques<sup>86</sup>, et la disponibilité de ces nutriments conduit à une stimulation des microorganismes associés à la plante, ce qui va se concrétiser par une augmentation des effectifs (atteignant de l'ordre de 10<sup>8-9</sup> bactéries par g) et des niveaux d'activité physiologique<sup>87</sup>. Selon le mode de libération des rhizodépôts dans le sol, on distingue les exsudats (au sens actuel du terme) ou diffusats (composés de faible dimension, solubles ou gazeux, libérés par transport passif), les sécrétions (composés activement transportés hors des cellules racinaires), les lysats (composés libérés lors de la lyse des cellules de l'épiderme voire du cortex, et des cellules exfoliées, qui sont détachées de la coiffe racinaire), et le mucigel (polysaccharides végétaux, auxquels se rajoutent des polysaccharides microbiens)<sup>86</sup>. D'un point de vue quantitatif, les rhizodépôts représentent 15- 20% du carbone organique net issu de la photosynthèse, c'est-à-dire de l'ordre de 50% du carbone organique véhiculé vers les parties racinaires<sup>86</sup>. Les rhizodépôts organiques comprennent (i) des substrats simples, à savoir un très grand nombre d'acides aminés, d'acides organiques, de sucres, d'acides gras, de stérols, de dérivés d'acides

---

<sup>84</sup> Cronin, D., Y. Moënné- Loccoz, A. Fenton, C. Dunne, D. N. Dowling & F. O'Gara, (1997) Ecological interaction of a biocontrol *Pseudomonas fluorescens* strain producing 2,4- diacetylphloroglucinol with the soft rot potato pathogen *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica*. *FEMS Microbiol. Ecol.* **23**: 95- 106.

<sup>85</sup> Callot G., Chamayou H., Maertens C., Salsac L. 1982. Mieux comprendre les interactions sol- racine. Incidences sur la nutrition minérale. INRA, Paris, 325 p.

<sup>86</sup> Nguyen C. 2003. Rhizodeposition of organic C by plants : mechanisms and controls. *Agronomie* 23 : 375- 396.

<sup>87</sup> Garbeva P, J. A. van Veen, and J. D. van Elsas. 2004. Microbial diversity in soil : Selection of microbial populations by plant and soil type and implications for disease suppressiveness. *Annual Review of Phytopathology* 42 : 243- 270.

nucléiques, etc., (ii) des polymères insolubles (cellulose, etc.), (iii) des vitamines et autres facteurs de croissance (biotine, inositol, thiamine, etc.), (iv) des phytohormones (auxines, cytokinines, etc.), (v) des protéines enzymatiques (amylases, phosphatases, protéases, etc.), (vi) des toxines (par exemple des calystégines) et des composés de défense (comme des phytoalexines, etc.), et (vii) des signaux susceptibles d'agir sur les microorganismes, comme des chimioattractants (sucres, acides organiques, etc.) et des inducteurs de transcription (par exemple des flavonoïdes), etc.<sup>88</sup> ..

Pour certains pathogènes de l'homme ou l'animal, ces propriétés trophiques sont un facteur favorable à la survie, et la rhizosphère de certaines plantes pourrait correspondre à un réservoir environnemental pour ces pathogènes<sup>89</sup>. D'autres caractéristiques de la rhizosphère sont favorables à la survie de certains pathogènes. Il s'agit en effet d'un milieu tamponné, en raison de la présence du sol (phase solide poreuse) et du mucigel racinaire (couche gélatineuse à la surface de la racine et composée de polysaccharides végétaux et microbiens). Le mucigel facilite également l'adhésion entre racine, particules de sol et microorganismes.

Par contre, d'autres propriétés de la rhizosphère sont susceptibles de limiter les capacités de survie des pathogènes de l'homme ou de l'animal, à commencer par des propriétés directement liées au fonctionnement de la racine. Cela inclut (i) la libération de toxines et autres composés antimicrobiens par les racines<sup>90</sup>, (ii) l'appauvrissement en nutriments minéraux liée à la nutrition de la plante (absorption racinaire)<sup>85</sup>, (iii) l'acidification racinaire de la rhizosphère<sup>91</sup>, et (iv) les phénomènes de respiration racinaire (et microbienne), qui conduisent à une diminution de la concentration en oxygène. De plus, certaines des populations rhizosphériques produisent elles- aussi des composés antimicrobiens<sup>92</sup>, comme par exemple le 2,4- diacétylphloroglucinol de nombreux *Pseudomonas* fluorescents (antagonisme)<sup>93</sup>. Les microorganismes rhizosphériques exercent également des phénomènes de compétition en ce qui concerne les rhizodépôts. Enfin, la porosité racinaire est généralement favorable aux activités de prédation par les protozoaires<sup>94</sup>.

#### **4.2.2. Le système étudié à l'échelle stationnelle: mécanismes et interactions**

La contamination débute à l'échelle stationnelle. La **station** est une unité sol- végétation- pratiques (déjections). Nous fixons à cette unité d'étude les frontières suivantes: biomasse aérienne végétale et sous sol ou horizon B (limite de la zone racinaire dense).

Les **entrées** dans le sous- système ainsi défini (figure 1), résultent d'apports d'*E. coli* sur le sol et sa végétation sous forme de bouses qui équivalent à des apports très localisés et très concentrés ( $10^7$  *E.coli*  $g^{-1}$ ) associés à un « milieu » riche auquel les micro- organismes introduits sont adaptés. Cette « co- introduction » est un élément favorable à la survie en milieu

<sup>88</sup> Bais HP, TL Weir, LG Perry, S Gilroy, JM Vivanco. 2006. The role of root exudates in rhizosphere interactions with plants and other organisms. Annu. Rev. Plant Biol. 57 : 233- 266.

<sup>89</sup> Berg G., Eberl L., Hartmann A. 2005. The rhizosphere as a reservoir for opportunistic human pathogenic bacteria. Environmental Microbiology 7 (11) 1673–1685.

<sup>90</sup> Miché L, S Belkin, R Rozen, J Balandreau. 2003. Rice seedling whole exudates and extracted alkylresorcinols induce stress- response in *Escherichia coli* biosensors. Environmental Microbiology 5 : 403- 411.

<sup>91</sup> Hinsinger P, C Plassard, C Tang, B Jaillard. 2003. Origins of root- mediated pH changes in the rhizosphere and their responses to environmental constraints : A review. Plant and Soil 248 : 43- 59.

<sup>92</sup> Gilbert GS, JL Parke, MK Clayton, J Handelsman. 1993. Effects of an introduced bacterium on bacterial communities on roots. Ecology 74 : 840- 854.

<sup>93</sup> Raaijmakers, J. M., Paulitz, T. C., Alabouvette, C., Steinberg, C., Moëgne- Loccoz, Y. 2008. The rhizosphere : a playground and battlefield for soilborne pathogens and beneficial microorganisms. Plant and Soil (sous presse).

<sup>94</sup> Bonkowski, M. 2004. Protozoa and plant growth : the microbial loop in soil revisited. New Phytologist 162 : 617- 631.



tellurique<sup>95,96</sup>. Notons que l'existence d'un bruit de fond dû à la faune sauvage doit également être pris en compte.

Il existe rapidement une dispersion à partir de la bouse et vers la végétation et les sols voisins et sous- jacents, sous l'effet de divers agents, pluie, écoulements, activité biologique (insectes coprophages...). Les sols présentent une capacité d'hébergement (capacité biotique) qui régit l'optimum de densité microbienne dans un volume donné de sol<sup>97</sup>. Il se constitue ainsi des **stocks**<sup>98</sup> de *E.coli* dont la dynamique dépend des facteurs biotiques et abiotiques qui contrôlent le transfert, la survie et l'état des populations fécales ainsi stockées.

Les **sorties** du système végétation sont dues à des **mortalités et à des transferts** verticaux et horizontaux par les écoulements dont l'existence dépend des propriétés des sols (porosité, état de saturation...). Dans le sol, les bactéries fécales, comme les telluriques, sont soumises à des stress auxquels elles peuvent s'adapter dans une certaine limite. Le défaut de nutriments carbonés, la dessiccation aussi bien que les stress oxydatifs et l'exposition aux rayonnements UV, induisent l'entrée en phase stationnaire. Les organismes fécaux devraient présenter des capacités d'adaptation plus limitées que les micro- organismes indigènes.

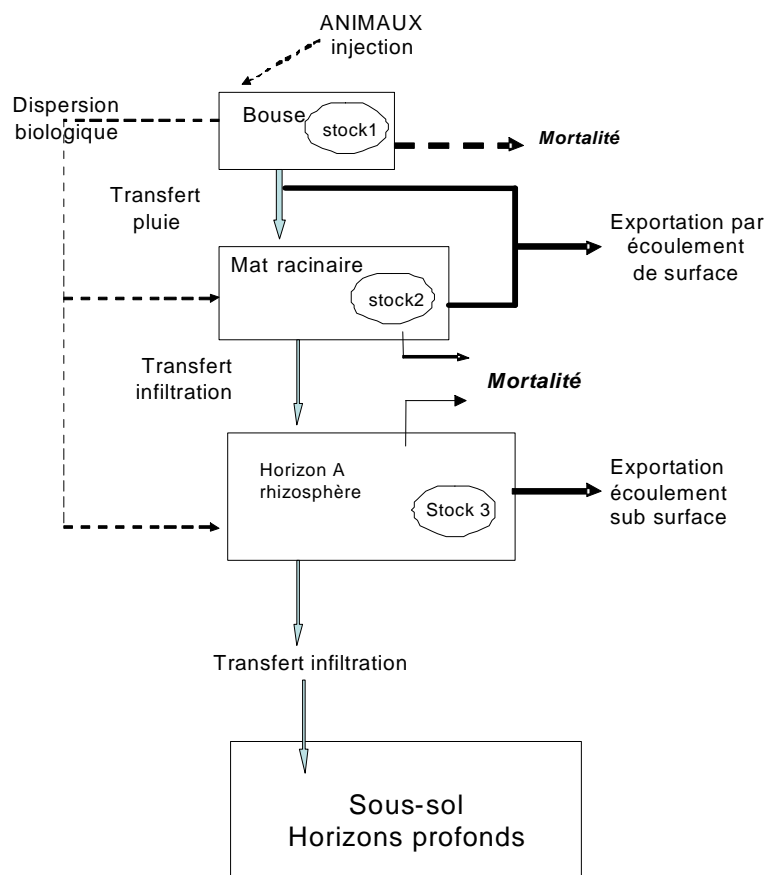


Figure 1. Le système étudié au niveau station.

<sup>95</sup> Kivisaar, M. 2003. Stationary phase mutagenesis: mechanisms that accelerate adaptation of microbial populations under environmental stress. [Review]. Environmental Microbiology. 5(10):814- 827.

<sup>96</sup> Jensen, G. B., Hansen, B. M., Eilenberg J., Mahillon, J. 2003 The hidden lifestyles of Bacillus cereus and relatives. Environmental Microbiology. 5(8):631- 640.

<sup>97</sup> DEJONGHE W., BOON N., SEGHERS D., TOP E. M. and VERSTRAETE W. 2001 Bioaugmentation of soils by increasing microbial richness: missing links. Environmental Microbiology 3 (10) 649- 657

<sup>98</sup> VANSTEELANT J. Y., 2004. Evaluation des risques de contamination microbiologiques liés aux épandages de matières organiques sur prairie de montagne, Thèse Doc. Univ. Savoie, Chambéry, 171p.

L'apport de bouses induit des modifications du milieu qui s'accompagne d'un feed back qui n'est peut être pas sans effet sur l'élaboration et la durée des stocks associés au sol, voire sur la capacité biotique de celui-ci. Les déjections provoquent un refus local et temporaire de pâturage, qui permet le développement de la biomasse aérienne végétale, et un effet trophique avec stimulation de la biomasse racinaire et de l'activité biologique du sol. Au total, les phénomènes impliqués dans l'élaboration et la dynamique des stocks de bactéries fécales à l'échelle station, sont contrôlés par la météorologie (pluie, température), des caractéristiques locales (type de sols, de végétation) et la place de la station dans le circuit de pâture.

#### **4.2.3. Le système étudié au niveau bassin versant.**

Pour comprendre la qualité des eaux et sa variabilité, les phénomènes et les structures doivent être identifiés non seulement à l'échelle station mais aussi à l'échelle bassin versant, échelle où nous cherchons à comprendre la qualité des eaux et sa variabilité. Or comme le montre nombre de travaux sur les transferts<sup>99</sup>, (1) les composantes locales ne sont pas facilement généralisables du fait de la variabilité des structures, (2) les effets locaux n'influent au niveau du bassin versant qu'à partir de certains seuils de densité, (3) la configuration des réseaux dans le bassin versant et leur localisation jouent un rôle déterminant, (4) les processus locaux ne sont pas linéairement propagés dans l'espace, mais souvent tamponnés ou parfois au contraire amplifiés à une échelle globale. Bref le bassin versant n'est pas qu'une somme de stations et nécessite donc une approche spécifique.

Dans le cas étudié, le bassin versant est un territoire où se superposent deux fonctionnements: celui du système pastoral qui détermine le déplacement des troupeaux et donc la dispersion et la répartition des polluants biologiques dans l'espace et dans le temps, et celui du bassin hydrologique qui collecte, stocke, transforme et transfère ces polluants, pour finalement les exporter à son exutoire.

Dans la mesure où l'objectif majeur du travail se rapporte à la qualité des eaux nous renonçons à approfondir les déterminismes socio- techniques du système pastoral. On considère donc qu'aux limites du système étudié (zone pastorale), **la circulation des troupeaux pilote les entrées et que la pluie et les écoulements pilotent les sorties** (figure 2).

---

<sup>99</sup> DORIOZ et OMBREDANNE, 2005. AQUAE : Action structurante INRA- CEMAGREF. Bassin versant et qualité biologique des cours d'eau, INRA- CEMARGE Ed

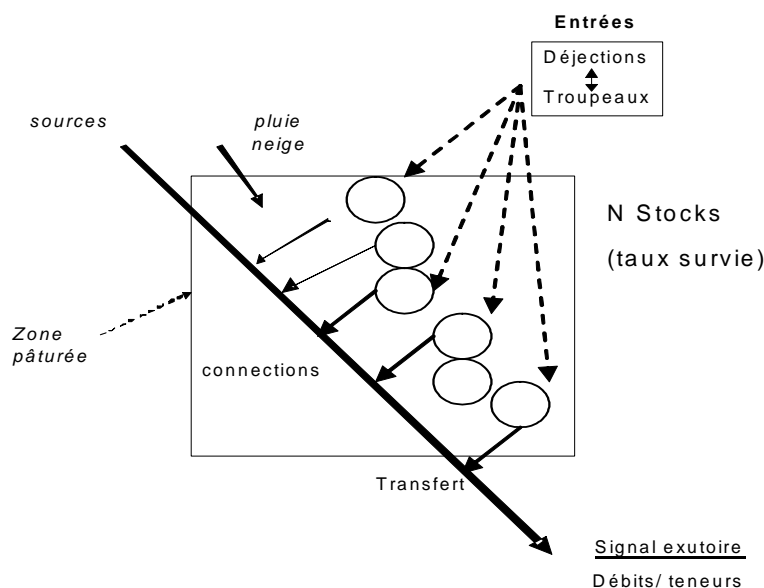


Figure 2. Le système étudié au niveau bassin versant.

La structure et l'organisation du bassin versant sont donc interprétées comme un ensemble de stocks de contaminants répartis dans un territoire et localisés au niveau de la couverture pédologique et du réseau hydrographique. Ces stocks sont susceptibles d'être plus ou moins mobilisés par les écoulements d'eau. Leurs dynamiques sont déterminées en partie à l'échelle stationnelle (figure 1). Le signal enregistré à l'exutoire (débit/ dénombrement) est le résultat de ces dynamiques et des interactions stocks- écoulements dans les zones hydrologiquement actives du bassin versant (zones actives et la connexion hydrologique). Le fonctionnement hydrique de la couverture pédologique conditionne l'époque, les lieux et les modalités du transfert sols- eaux (ruissellement/infiltration). La circulation du troupeau conditionne les apports directs aux ruisseaux. Ces deux ensembles de déterminisme sont très liés à l'évolution saisonnière et à la variabilité des paramètres météorologiques.

#### 4.2.4. Modélisation du bassin versant

La contamination des eaux à l'exutoire résulte du couplage entre deux fonctionnements complexes de nature très différente, celui du système pastoral (parcours des troupeaux, flux de déjections résultant et alimentant les stocks évoqués ci- dessus) et celui de l'hydrologie du bassin versant. La modélisation doit chercher à rendre compte de ces interactions.

Le transfert des bactéries est plutôt lié au ruissellement de surface ou de sub- surface et les flux bactériens enregistrés aux exutoires des bassins versants sont amplifiés durant les périodes de crue<sup>100</sup>. Partant de cela, les modèles de contamination bactérienne reposent sur des fonctions relatives à la répartition des déjections dans l'espace, à la mobilisation des bactéries depuis les déjections vers les lames de ruissellement, au transport des organismes à la surface des sols et dans le réseau hydrographique, ainsi qu'à leur mortalité dans les différents compartiments et pendant leur transport. L'adaptation des modèles existants aux conditions des prairies pâturées en vue de la reconnaissance des périodes sensibles et des zones contributives, soulève un certain

<sup>100</sup> JAMIESON R., R. GORDON, D. JOY, H. LEE, 2004. Assessing microbial pollution of rural surface waters. A review of current watershed scale modelling approaches. *Agricultural Water Management* 70, 1- 17.

nombre de questions, du fait d'un nombre élevé de paramètres, de simplifications grossières sur la répartition des bouses et de bases conceptuelles controversées sur le déterminisme du ruissellement et le devenir des bactéries. Deux problèmes majeurs peuvent être en particulier relevés:

- le ruissellement est considéré comme résultant d'un refus d'infiltration hortonien de la pluie, ce qui est peu probable dans le contexte des prairies. Une approche basée sur l'hydrologie des *sources variables* nous semble plus appropriée dans ces contextes marqués par une forte perméabilité de la surface des sols ;

- certaines caractéristiques propre au système pastoral, à savoir la distribution et l'évolution des bouses, paramètres dont l'importance en terme de potentiel émissif de micro-organismes<sup>101</sup> est connue, ne sont pas explicitement pris en compte. Dans les modèles existants, les entrées de bactéries fécales sont généralement déterminées à partir du chargement animal et d'un taux moyen d'excrétion de bactéries par les animaux, ce qui conduit à considérer un stock de bactéries uniforme et homogène sur les surfaces pastorales. Cette simplification n'est pas satisfaisante car cela ne permet pas de prendre en considération la forte hétérogénéité de répartition des bouses dans l'espace et le temps. Cela ne permet pas non plus d'analyser le caractère ponctuel des dépôts et toute la diversité des interactions qui en découlent, notamment les conséquences entre les conditions stationnelles des dépôts et le remaniement et l'évolution des bouses, les occurrences entre dépôt et situations favorables au ruissellement ou encore la proximité bouses - réseau hydrographique. C'est donc tout un ensemble de d'éléments, découlant du comportement du troupeau et de ses relations avec le cadre biophysique du bassin, et déterminants vis- à- vis du transfert bactérien qui échappent en général à l'analyse.

### 4.3. Hypothèses de travail

#### 4.3.1. Hypothèses sur la survie de *E.coli* dans l'environnement

L'introduction dans l'environnement représente un stress pour une bactérie fécale. L'efficacité des processus de survie à maintenir une population de *E.coli* se mesure en durée de survie, paramètre qui devrait dépendre du type de milieu, notamment du type de sols. La **durée de survie** pourrait varier selon le niveau trophique du sol, sa teneur en matière organique, son régime hydrique et globalement selon le faciès pastoral considéré. Tout semble par ailleurs indiquer un rôle particulier de la rhizosphère et des antibiotoses et antagonismes biologiques qui s'y développent. Ces hypothèses prennent un sens particulier quand il s'agit de STEC. Enfin, en **comparant les dynamiques de populations fécales (*E. coli*) et telluriques (*Pseudomonas* ssp fluorescents)** on espère mieux comprendre les stratégies de survie des organismes fécaux.

#### 4.3.2. Hypothèses sur le fonctionnement global du système étudié

La première hypothèse est relative aux **stockages de *E.coli* dans les réservoirs environnementaux typiques du site étudié**. On considère que le système bassin versant étudié présente divers compartiments de stockage (aquifères, déjections, rhizosphère, sols...), chacun étant caractérisé par une durée de stockage, un taux de survie, un mode d'interaction avec les écoulements. Les injections directes de déjections dans le cours d'eau lors des accès du troupeau à la rivière représentent un stock éphémère de bactéries fécales, rapidement exportable. Les autres apports de *E.coli* sont associés à la couverture pédologique, soit en surface même du sol (bouses/amas organiques), soit à la matrice du sol et sont tous deux mobilisables à plus ou moins long terme, en fonction du régime hydrique.

---

<sup>101</sup> Kress, M., G. F. Gifford, 1984. Fecal coliform release from cattle fecal deposits. Water Resour. Bull. 20:61- 66.

La hauteur, les propriétés et la distribution de ces stocks déterminent la variabilité des teneurs et des flux de *E. coli* à l'exutoire. Par ailleurs, dans la mesure où la durée de stockage conditionne l'évolution physiologique des bactéries et le type de souches présentes, les variations de flux à l'exutoire devraient s'accompagner de variations relatives à la **structure du peuplement microbien**. Cette dernière permettrait donc de différencier les apports.

La deuxième hypothèse, complémentaire de la précédente, concerne le **fonctionnement du bassin versant comme système de transfert**. Nous faisons l'hypothèse que les exportations à l'exutoire sont en fait contrôlées par un petit nombre de facteurs- clés relatifs à l'état de **zones critiques** (état physique de leurs sols, de leurs stocks de contaminants et de connexions hydrologiques). La localisation de ces zones critiques, varie au cours du cycle saisonnier en fonction de l'évolution du bilan hydrique et du pâturage.

#### 4.4. Démarche

La recherche est réalisée selon une **démarche pluridisciplinaire** qui associe des investigations sur des dispositifs expérimentaux contrôlés relevant de la science du sol et de l'écologie microbienne et des enregistrements de variables sur des mailles de territoire plus vastes qui sont les objets habituels de l'hydrologie ou de l'agronomie. La démarche intègre la diversité des situations typiques du cadre montagnard où elle s'applique et ses contraintes concrètes. Concrètement la stratégie mise en œuvre combine des suivis, des caractérisations génétiques, des expérimentations, des modélisations.

**1. Les suivis** sont organisés à l'échelle annuelle et portent, sur divers compartiments du système étudié (fig 2), incluant chaque fois que nécessaire les entrées, les stockages et les transferts du contaminant. Ils prennent en compte, entrées, stockages et flux de transfert à divers niveaux d'organisation de celui-ci. Les enregistrements concernent des **variables d'entrées** (pratiques pastorales, déjections, état hydrologique des sols et du bassin, flux apportés par les sources), la dynamique des populations de *E.coli* stockées dans divers sols types (en caractérisant la présence de STEC) et les **sorties** hydrologiques aux exutoires du bassin principal et sous-bassins. Des informations complémentaires sont par ailleurs obtenues par l'analyse de l'évolution saisonnière des contaminations des eaux en absence des troupeaux. Des données sur la dynamique des *Pseudomonas* fluorescents telluriques sont disponibles pour comparaison.

**2. Les caractérisations génétiques** portent sur les structures des peuplements de *E coli* en divers points clés du système : déjections, exutoire principal et dans divers sols.

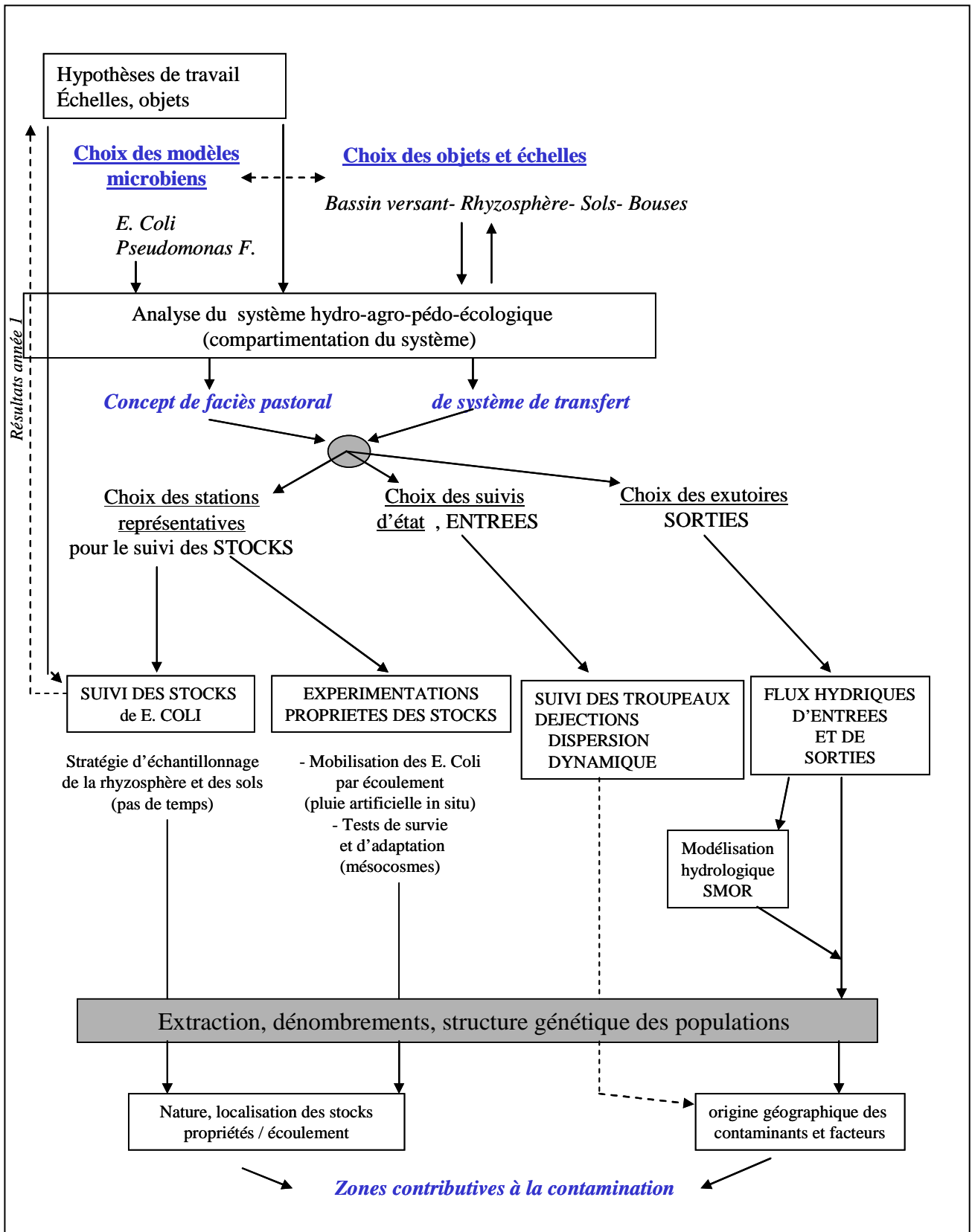
**3. Les expérimentations** hydro- pédologiques sont mises en place pour mieux identifier et paramétrer certains phénomènes relatifs à l'acquisition de la charge en *E.coli* des eaux; les dispositifs représentent une standardisation des conditions de contamination des sols et d'interactions sols- écoulements (ruissellement et pluies artificielles)

**4. La modélisation** porte sur le couplage entre dynamique pastorale et fonctionnement hydrologique du bassin. L'approche repose sur une discrétisation de l'espace, avec sur chacune des mailles élémentaires ainsi définies: (i) la caractérisation du fonctionnement du système bouse - sol en termes d'entées de bouses, de stockage et de sorties de bactéries ; son pilotage par les flux verticaux et latéraux d'eau ; (ii) l'évaluation des relations latérales entre mailles élémentaires, avec des échanges d'eau et de micro- organismes ; (iii) l'intégration de ces

échanges pour rendre compte dans l'espace et le temps des flux d'eau et de bactéries à l'échelle du bassin versant.

**L'organigramme de recherche** explicite la mise en œuvre et le couplage, dans un contexte pluridisciplinaire, de l'ensemble de ces approches (encart 1)

**L'interprétation et la synthèse générale** reposent sur une comparaison entre: 1) les exportations à l'exutoire (flux, concentrations, structure des populations pour les grands types de périodes hydrologiques ou « régime d'exportation »; 2) l'état du bassin et des stocks potentiellement mobilisables, en relation avec la distribution des zones hydrologiquement actives et de l'intensité de l'activité pastorale. La synthèse des informations consiste à élaborer un modèle conceptuel présentant le territoire étudié en tant que système de stockage et de transfert de polluants bactériens vers un exutoire des eaux de surface (couplages entre niveaux de contaminations à l'exutoire, événements météorologiques, répartition et évolution des stocks de bactéries fécales des sols, eux mêmes déterminés par les parcours du troupeau et les taux de mortalité bactérienne). Cette analyse permet d'envisager quelques premières réflexions opérationnelles générales relatives à la protection des eaux.



Encart 1. Organigramme des recherches.

## 5. MATERIEL et METHODES

### 5.1. Site d'étude : diagnostic du système biophysique et agronomique.

Le bassin versant étudié (170 ha) est l'un des deux vallons constituant l'alpage des Cornettes de Bise. Il est situé en Haute Savoie, dans le massif du Chablais (fig. 3). Son choix s'explique par la qualité des données antérieures sur les relations sols- végétations<sup>102,103</sup>, par sa bonne accessibilité estivale pour l'implantation des dispositifs de mesure et surtout par **l'absence, en amont, d'habitations et sources de contaminations domestiques.**

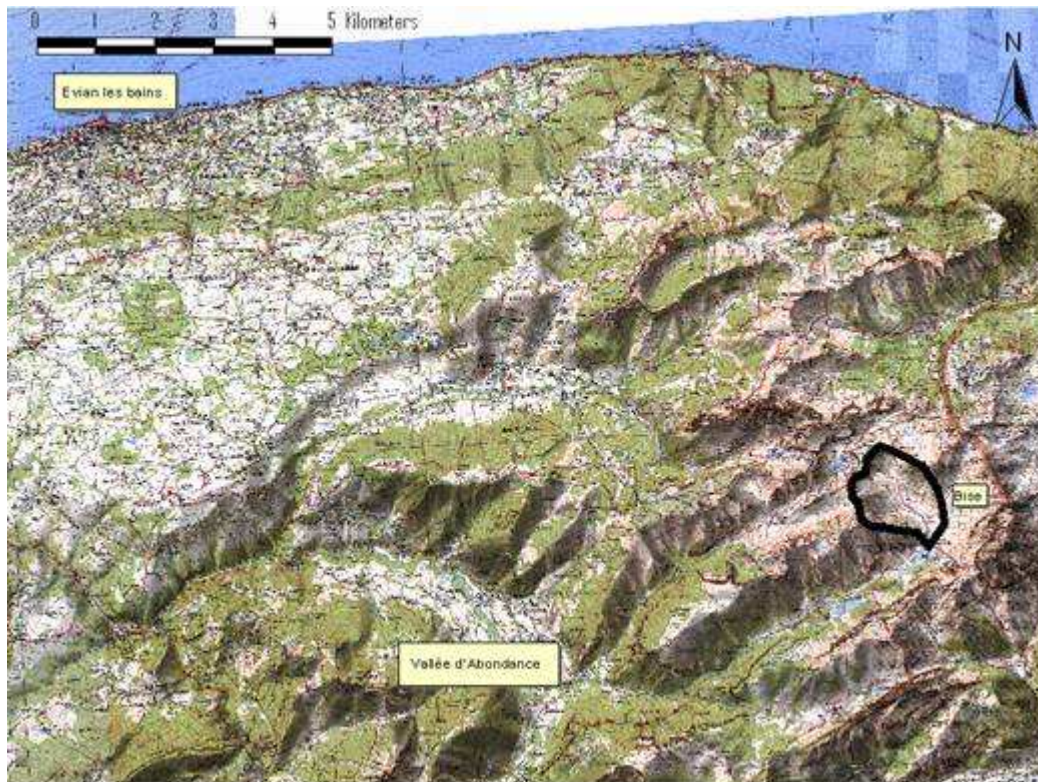


Figure 3. Bassin versant de Bise (d'après scan25 IGN).

#### 5.1.1. Climat

Le site est situé à l'**étage subalpin** avec une altitude moyenne de 1800 m. Le ruisseau présente un régime nival accusé (étiage hivernal, hautes eaux au printemps, crues en été). En considérant les gradients établis dans la région, on peut estimer la pluviométrie annuelle moyenne du site à environ 2000 mm au niveau de l'exutoire (1550m). En hiver le manteau neigeux atteint dans les vallons 1 à 2 m d'épaisseur. La fonte des neiges génère de forts débits (jusqu'à 200l/s à comparer avec le 10 l/s de l'étiage estival).

<sup>102</sup> DORIOZ J. M., 1987 - Dynamique écologique et typologie des territoires pastoraux des Alpes du Nord. 2. Analyse des facteurs de la valeur pastorale. *Acta Oecologica. Oecol. Applic.*, 8 (4), 283- 300.

<sup>103</sup> DORIOZ J. M., PARTY J. - P., 1987 - Dynamique écologique et typologie de territoire pastoraux des alpes du nord - Analyse de l'organisation agro- écologique d'un alpage de référence. *Acta Oecologica - Oecol. Applic.*, 8 (3), p. 257- 280.



### 5.1.2. Hydrogéologie

Le contexte hydrogéologique a fait l'objet d'une étude spécifique<sup>104</sup> dont il ressort :

- un décrochement de direction Nord- ouest/Sud Est partage la zone d'étude en deux compartiments (fig. 4) et crée un obstacle à l'écoulement d'un **aquifère karstique** d'un compartiment Est qui expliquerait l'origine de zones marécageuses de fond de vallon ; à partir de ces zones saturées, il se produit un écoulement permanent (supérieur à 10 l/s) toujours connecté à l'exutoire ;

- des formations de calcaire karstique arment les parties supérieures du bassin ; à leur base des sources et suintements produisent de **petits marais** « de haut de versant », conduisant là aussi à des écoulements permanents non négligeables (connectés périodiquement à l'exutoire);

- des formations superficielles formant un cône de déjection (5ha) tapissent le fond de vallon ; durant la période estivale les écoulements provenant des marais du haut de versant se perdent dans cette formation ; durant la fonte des neiges et lors des périodes de forte activité hydrologique de la saison estivale, ces écoulements ont un débit important (parfois supérieur à 100 l/s) ; ils traversent alors les formations superficielles en demeurant à leur surface, pour rejoindre l'exutoire du bassin ;

- la cartographie des pertes et des sources d'eau, ainsi qu'une première approche du déficit du bilan hydrologique montrent que le bassin topographique de l'ensemble du vallon de Bise ne correspond pas au bassin hydrologique, ce qui n'est pas surprenant dans un contexte fortement fragmenté et re- structuré par le tectonisme.

---

<sup>104</sup> DREVET J, 2004. Etude hydrogéologique du bassin versant de la montagne de Bise. Mem IUT Montagne, Univ Chambéry, 56p.

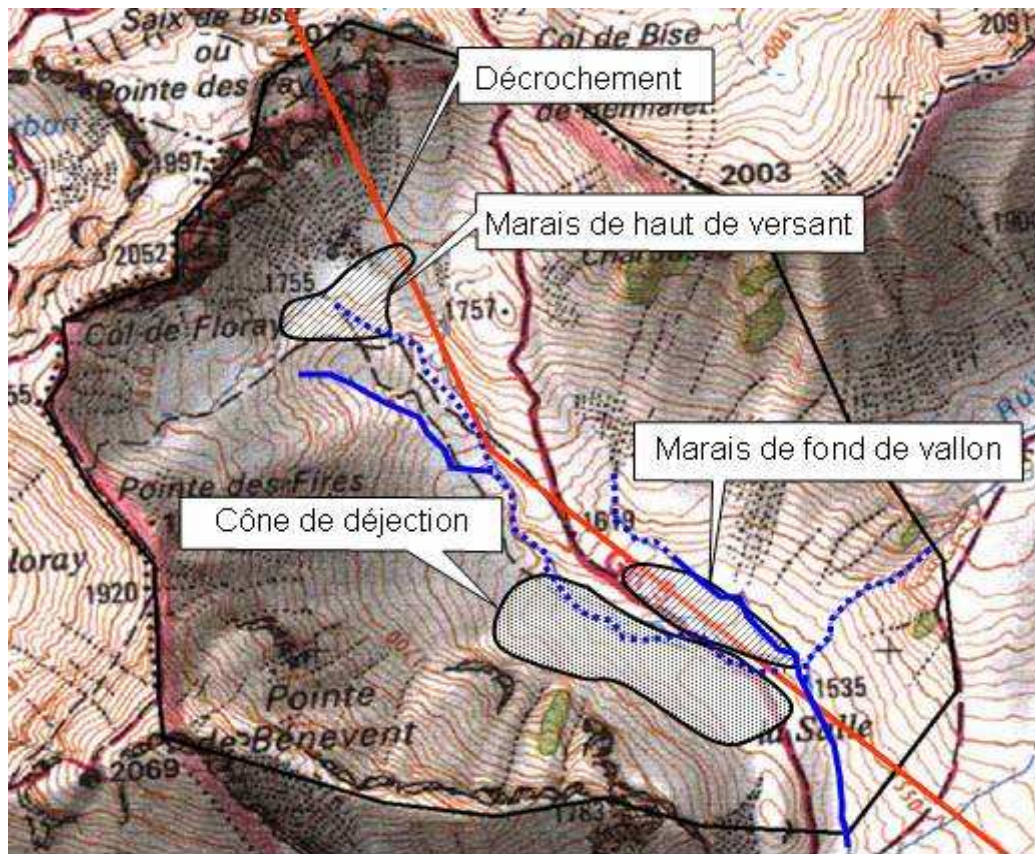


Figure 4. Décrochement, formations superficielles et écoulements temporaires (pointillés) ou permanents (trait continu); échelle 1/20 000.

### **5.1.3. Géomorphologie, pédologie**

Le secteur est présenté par Legros et al, 1987<sup>105</sup>. Les auteurs décrivent plusieurs unités agro- pédologiques, avec des références en termes de phytosociologie et de potentiel agropastoral. Partant de ces connaissances préalables et dans l'objectif de mieux rendre compte des modalités de transfert d'eau, nous avons cartographié le contour des unités pédologiques (figure 5).

#### **1) les replats morainiques et leur complexe de sols hydromorphes: (redoxisols et redoxysol pelosoliques )**

Les sols des complexes hydromorphes sont supportés par des moraines de fond, constituées d'éléments grossiers de taille variable, englobés dans une matrice limono- sableuse compacte. Les remaniements post glaciaires ont eu pour corollaire des redistributions dans l'espace des matériaux, avec notamment des accumulations de particules fines au niveau de dépressions sédimentaires (fig. 6). Dans ces creux, les teneurs en argiles sont très fortes, les taux de saturation et le pH élevés (tableau 1). Les sols présentent donc des **caractères pélosoliques** (avec des teneurs en argile qui dépassent les 50%) ; ils sont peu perméables (perméabilité saturée mesurée par infiltromètre à charge constante de 6 mm/h), peu évolués mais enrichis par des éléments minéraux provenant du pourtour de la dépression (fig. 7). Dans les conditions de fonte

<sup>105</sup> LEGROS J. - P., PARTY J. - P., DORIOZ J. M., 1987 - Répartition des milieux calcaires, calciques et acidifiés en haute montagne calcaire humide - conséquences agronomiques et écologiques. Doc. cartogr. Ecol., 30, p. 137-157.

de neige, l'ensemble est saturé et la nappe est de nature superficielle, s'écoulant latéralement. Durant la période estivale, l'hydromorphie est maintenue par imbibition capillaire, avec des caractères d'oxydo- réduction atténués. La tranche superficielle du sol demeure bien aérée en été et ceci permet l'installation d'une végétation non hygrophile. Toutefois, lors des averses estivales, la dépression se sature rapidement, avec écoulements hypodermiques latéraux, voire production de ruissellements de surface si la pluviométrie est forte. Les deux caractères (richesse exceptionnelle en argile et caractère redécéique avec des horizons Goe nous ont conduit à un rattachement de ces sols à la double référence Redoxisol- pelosol du référentiel de 1995.

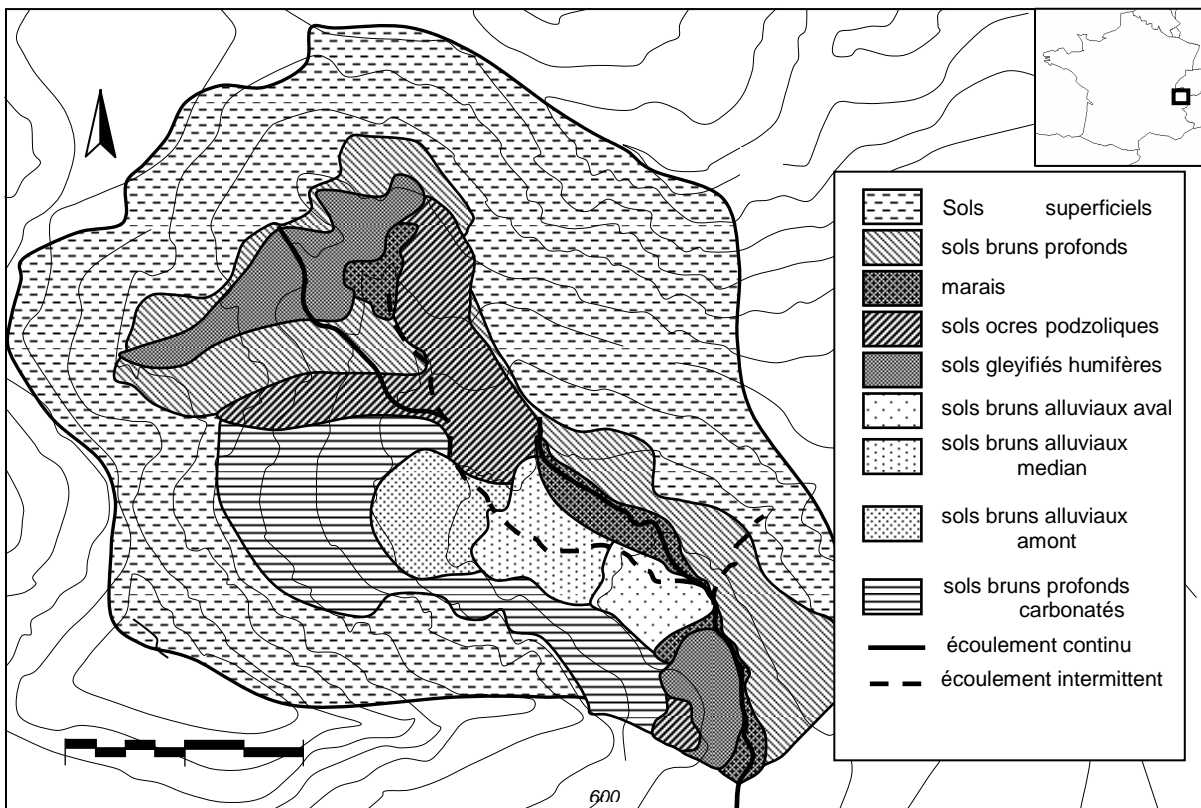


Figure 5. Contexte pédologique.

*Selon Baize, D., Girard JC., 1995 (Référentiel Pédologique. Techniques et Pratiques. INRA)*

- Sols superficiels : ensemble de sols peu épais appartenant aux LITHOSOLS, ORGANOSOLS, RENDOSOLS et RENDISOLS ;
- Sols bruns profonds : CALCISOLS et BRUNISOLS SATURES, colluviaux
- Marais : HISTOSOLS leptiques ;
- Sols ocres podzoliques : ALOCRISOLS ocreux ;
- Sols gleyifiés humifères argileux : Système de sols hydromorphes avec des REDUCTISOLS-PELOSOLIQUES ET DES REDOXISOLS STAGNIQUES REDUCTISOLS-PELOSOLS ;
- Sols bruns alluviaux : COLLUVIOSOLS , et FLUVIOSOLS, CALCISOLS FLUVIQUES et CUMULIQUES
- Sols bruns carbonatés : CALCOSOLS souvent pierreux ;

Ces creux pélosoliques doivent donc être considérés comme des « **milieux confinés** », l'eau en excès s'écoulant par débordements sur le pourtour de la cuvette. Dans les situations du pourtour de la cuvette, à quelques mètres, les conditions édaphiques diffèrent remarquablement : les sols ont des caractéristiques stagniques avec un comportement marqué par la présence d'une

nappe perchée, comme en témoigne un horizon blanchi (albique) dans la tranche superficielle et en profondeur un horizon oxydé de 10 à 20 cm marquant la transition avec l'altérite morainique.

La texture est limono- sableuse, le pH très bas, avec une élévation des teneurs en aluminium. Ces situations sont le siège d'un départ latéral intense de composés minéraux lors de la fonte des neiges et des fortes averses de la saison pastorale, ce qui conduit à l'acidification des profils de sol et l'exportation intense du fer<sup>106</sup>. Lors du ressuyage, le fer précipite, là où il est encore présent, c'est- à- dire à la base de l'horizon albique, dans la frange de transition avec l'altérite. Ces sols présentent donc des caractères stagniques avec « une saturation prolongée de surface »

	cone de déjection		replats morainiques		marais	nardaie			
	0- 5	5- 25	0- 5	5- 25 cm		0- 5	5-	0- 5	5-
	cm	cm	cm	Redoxi sol	Reduct isol	cm	25 cm	cm	25 cm
argile (%)	42.9	32.0	59.6	27.2	59.2	34.9	19.0	31.2	32.1
limon (%)	42.2	37.6	38.0	49.3	36.6	40.5	29.7	52.2	48.9
sable (%)	14.9	30.4	2.4	23.5	4.2	24.6	51.3	16.6	19.0
carbone orga (g kg- 1)	85.4	22.8	58.4	31.1	43.0	142	25.4	96.5	17.0
C : N	10.7	9.5	10.5	10.0	9.5	11.6	11.7	11.0	11.0
CEC (cmol+ kg- 1)	22.3	20.8	33.9	6.4	35.0	56.1	15.6	9.8	7.9
S/T (%)	98	100	100	81	100	100	100	44	11
Al3+ (cmol+ kg- 1)	0.16	0.02	0.03	1.46	0.03	0.07	0.03	1.11	7.62
pH	5.0	8.1	6.9	4.8	6.7	6.8	7.3	4.7	4.0

Tableau 1. Analyse physicochimique des sols.

notamment en période de fonte de neige mais également des niveaux plus profonds oxydés. Pour signifier ces deux critères nous rattacherons ces profils à une référence rédoxisol stagniques.

Dans ces situations de « replats » morainiques, les conditions de sol sont donc très tranchées avec une sous unité centrale confinée, marquée par l'hydromorphie et la réduction du fer et en périphérie des sols « **ouverts** » dont le fonctionnement est marqué par un intense écoulement de nappes perchées, c'est- à- dire par des flux d'eau qui les connectent rapidement à l'exutoire du bassin. Nous verrons que ces conditions édaphiques ont des conséquences importantes sur les flux de micro- organismes et la diversité de leurs populations.

<sup>106</sup> P. Duchaufour, 1984. Pédologie. Masson Ed., Paris, 220p.

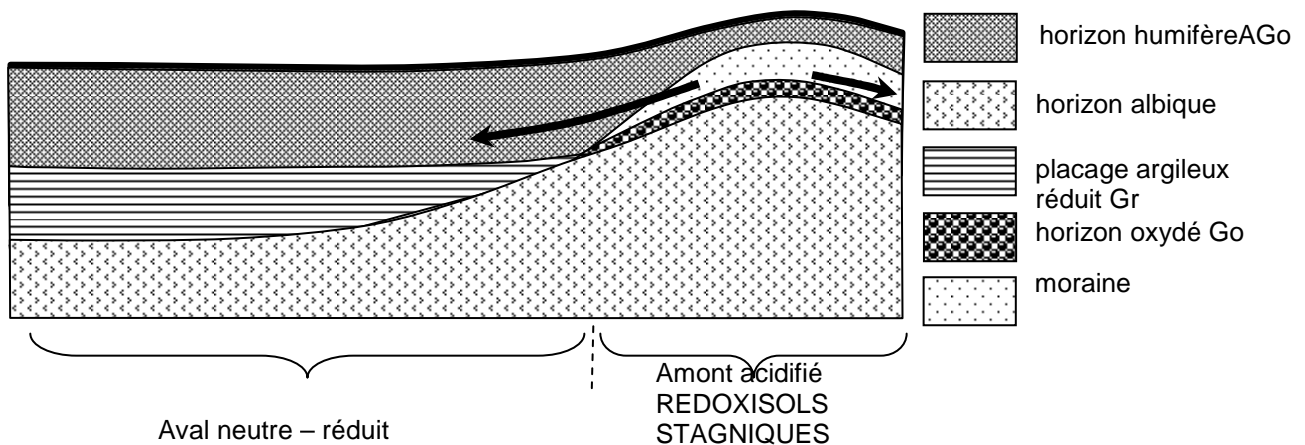


Figure 6. Sols sur replats morainiques, montrant l'agencement type de sols confinés et ouverts (le transect représente une séquence de 20 m).



Figure 7. Sols sur dépression morainique.

## 2) Colluvium de versant

Il s'agit de matériaux colluvionnaires fins (limon- argileux) tapissant les zones concaves de bas de pente et les fonds de talwegs. La profondeur du sol est importante, l'imprégnation de matière organique est élevée, le taux de cailloux est faible. Il n'y a pas de traces d'hydromorphie mais la couleur est brun terne, ce qui révèle une hydromorphie « diffuse » (figure 8). Ces sols sont dans la plupart des cas décarbonatés mais restent largement saturés par le calcium apporté par l'altération des blocs de calcaire mais également par les flux en solution depuis l'amont. Ces sols appartiennent pour l'essentiel aux références Brunisols saturés et Calcisols. Dans une partie du bassin, ces sols profonds demeurent carbonatés et seront rattachés aux Calcosols





Figure 8. Sol colluvial de pente.



Figure 9. Sol sur cône de déjection.

### 3) Versants schisteux et moraines sans amonts calcaires

Les sols situés sur les formations du lias et sur les moraines et qui ne bénéficient pas d'apport de bases des amonts calcaires, présentent une tendance à l'acidification. Ces sols sont largement désaturés. Les moins évolués dans cette dynamique d'acidification, rencontrés sous des formations végétales dominées par le Nard (*Nardus stricta*), correspondent à l'ancienne dénomination de sols bruns acides ou de sols bruns ocreux. Les plus évolués (rencontrés sous les éricacées ; myrtille et callune) présentent des ébauches de caractères podzoliques. Globalement, ces sols sont rattachés à la référence alocrisols même si les moins évolués sont des brunisols oligo- saturés et les plus évolués des podzosols .

### 4) Cône de déjection et éboulis

Il s'agit de matériaux détritiques calcaires, colluvions de toutes tailles mais également à proximité des axes de drainage des alluvions. Les sols présentent une forte charge en cailloux (<50%), à laquelle est associée une forte porosité, avec des cavités entre les éléments grossiers ; la perméabilité est très élevée (figure 9). Les éboulis une fois stabilisés, offrent une fraction de terre fine non négligeable ; les propriétés des sols diffèrent alors peu de celles des sols du cône de déjection. Dans le cas du cône de déjection qui tapisse l'axe du bassin versant, la lixiviation est assez intense et, dans la mesure où ces stations ne bénéficient pas partout d'une recarbonatation liée à la géomorphogénèse, on peut noter localement une légère acidification de surface, une désaturation du complexe d'échange et une élévation aluminique (cf tableau 1). L'acidification demeure néanmoins limitée car les apports d'eau et de nutriments par les déjections du troupeau qui fréquente quotidiennement ces sols, compensent une partie des lixiviats. Quoiqu'il en soit, on relèvera que dans ces situations, les flux d'eau sont intenses et confèrent un caractère non confiné, ouvert au milieu. Ces sols sont rattachés aux références colluviosols et fluvisols pour les unités les plus marquées par l'accumulation respectivement, de colluvions et alluvions. Les intergrades sont globalement des calcisols mais soit fluviqes (en bord de court d'eau) soit cumuliques.

## 5) marais et zones humides

Un ensemble de formations tourbeuses ceinture les zones de résurgence (marais de haut de versant, marais de fond de vallon). D'autres zones hydromorphes résultent de l'affleurement de nappes alluviales qui accompagnent le cours d'eau lorsque ce dernier franchit des zones relativement plates. Ces tourbes sont peu épaisses (10 à 20 cm) (caractère leptique), la matière organique englobant les graviers et matériaux grossiers alluviaux. Les eaux étant riches en calcium, ces tourbes sont formées à partir d'accumulation de matière type eutrophe, comme en témoigne une capacité d'échange cationique, un taux de saturation élevé et un pH proche de la neutralité. Ces sols correspondent à des histosols leptiques

### **5.1.4. Hydrodynamique de la couverture pédologique**

Les modalités de circulation d'eau sont très variables d'un type de sol à l'autre: le transfert d'eau est lié à des mouvements verticaux ou latéraux; il affecte des masses d'eau de subsurface ou profondes, le volume de ces masses est lui même très différent selon que les réservoirs sont délimités par les organisations pédologiques ou par l'épaisseur des formations superficielles quaternaires. Une vue synthétique des unités et leur interprétation en terme de modalité d'écoulement de l'eau, sont proposées à la figure 10.

Dans ce contexte de prairie et hormis les situations de fort piétinement (repositoires, sentiers), la perméabilité de la surface des sols est très forte et non sujette à la dégradation par battance, si bien que le ruissellement hortonien est vraisemblablement peu probable. En revanche, en relation avec une topographie accusée et des barrières de perméabilité à la base des sols, les écoulements latéraux jouent un rôle intense, comme en témoigne la saturation de bas de pente et les écoulements de fonds de talwegs observés lors de la période étudiée.

### **5.1.5. Contexte agropastoral**

L'unité pastorale de bise est constituée de 2 vallons de superficie équivalente (l'un des vallons constituant le site d'étude). Deux troupeaux bovins laitiers valorisent l'espace pastoral de fin mai à fin septembre. L'effectif des troupeaux est typique des exploitations de montagne, avec environ une quarantaine de vaches laitières et un nombre équivalent de génisses. Pour ces deux exploitations, le vêlage a lieu durant la saison automne - hiver, si bien que la production laitière baisse régulièrement de juin à septembre (de 600 litres à 200 litres/jour et par exploitation). Compte tenu du faible chargement moyen (0.5 UGB/ha/an), de l'absence de pratique organisée de restitution de la fertilisation organique et d'entretien des ressources fourragères, la situation étudiée relève typiquement d'une gestion extensive de l'espace pastoral.

Le circuit de pâturage dépend de choix techniques relatifs aux modalités de traite, d'itinéraires établis en relation avec la pousse de l'herbe et la ressource en eau, et du comportement animal. La traite a lieu deux fois par jour, en matinée et en fin de journée. Traites et complémentations d'alimentation sont réalisées dans les étables des chalets communaux de Bise, situés à l'aval du bassin versant étudié. La nuit, les animaux sont dans les étables ou restent à proximité des bâtiments, d'où un déficit global de restitution (état de fait qui perdure au moins depuis un siècle). Le matin, les animaux sont conduits dans des quartiers de pâturage et surveillés. L'après midi, les animaux sont « autonomes », laissés sans surveillance : ils choisissent alors généralement de pâturer les secteurs à topographie douce situés en fond de vallon, à proximité des cours d'eau où ils s'abreuvent.

Unités	Schéma	Transferts d'eau
Butte morainique	<p> </p>	<p>- en situation de replat : milieu confiné propice à la formation de nappes de subsurface en A et B/C ;</p> <p>- en situation de pente ; transfert latéraux de subsurface</p>
Colluvium		<p>- transferts d'eau latéraux de subsurface le long de la pente</p> <p>- formation de nappes de subsurface à la base du sol en situation de bas de pente.</p>
Cône / Eboulis	<p> </p>	<p>- transfert vertical de l'eau</p> <p>- formation d'une nappe profonde (aquifère) dans les dépressions du substratum</p>

Figure 10. Unités géomorphologiques et hypothèses relatives aux modalités de transfert d'eau.

Finalement, le circuit de pâturage est structuré par les éléments suivants :

- des axes de déplacements collectifs des animaux ; le troupeau longe la portion aval du cours d'eau sur des axes permettant la liaison entre les bâtiments et les quartiers de pâturage ; ces zones de déplacements collectifs sont marquées, le long des versants, par la formation de terrassettes où le sol est fréquemment mis à nu par le piétinement des animaux ;
- une zone de franchissement du cours d'eau et d'abreuvement du troupeau, localisée à l'aval du cône de déjection ;
- des quartiers de pâturage surveillé ; ils sont situés en début de saison sur les secteurs proches du fond de vallon (moraine et bas de cône de déjection) ; à partir du mois d'août, lorsque les réserves fourragères du bas sont épuisées, ils concernent des stations plus élevées telles le haut des pentes colluviales et les végétations à base d'éboulis ; en revanche même en fin de saison, les secteurs carbonatés karstiques d'altitude sont très rarement utilisés par le troupeau ;
- des quartiers de pâturage autonome et des reposoirs non surveillés, très généralement limités aux fonds de vallon.



Le fond de vallon correspondant au cône de déjection et aux buttes morainiques, est donc fréquemment fréquenté par les animaux, soit sous surveillance en début de saison, soit en autonomie en fin de journée.

#### **5.1.6. Végétation**

A l'échelle de l'alpage, sous l'effet du parcours des troupeaux et d'un régime hydrique très favorable, on assiste globalement à une concentration des déjections et nutriments en fond de vallon et à une eutrophisation des végétations prairiales. La redistribution d'éléments nutritifs s'effectue au détriment des pentes et de la périphérie de l'alpage, secteurs où les types de végétation ont tendance, en l'absence de phénomènes tampons locaux (recharge en carbonates et matériaux altérables liée aux effets de versant, fixation d'azote) à évoluer vers des faciès oligotrophes et en général acidifiés. Plusieurs types de végétation ont été caractérisés dans la zone pastorale de Bise (Dorioz et Party, 1987). Ils sont présentés ici dans le cadre de référence que constitue la typologie des alpages des alpes humides<sup>107</sup>.

- **Pelouses maigres acidophiles** (qualifiées dans ce texte de « nardaie »). Il s'agit de stations sur sols profonds et acidifiés, dominés du fait de l'absence de restitution fertilisante par des graminées, peu ou pas appétentes telles que *Nardus stricta*, *Festuca rubra* et *Descampsia flexuosa*. Elles occupent les points hauts relatifs du paysage (crêtes et faces structurales sur schistes, certains versants convexes de départ de matière, buttes morainiques). Leur caractéristiques principales sont les suivantes: un régime hydrique estival à tendance méso – xérophile attribué à une structure de sols microagrégée à faible RFU, une acidification prononcée des sols, avec accumulation de matière organique en surface ; une faible productivité et valeur pastorale, d'où une fréquentation épisodique par les animaux malgré une topographie souvent facile. Quand la pression pastorale cesse complètement, les nardaies évoluent à Bise en lande à Ericacées. Les sols sont ici des alocrisols sensu RP, 1995

- **Pelouses moyennes sèches calcicoles**. Ce type est caractérisé par *Carex sempervirens* et *Sesleria coerula* ; il est localisé au niveau des affleurements de calcaires massifs ; les sols peu profonds, caillouteux, sont humiques et calciques, méso à xérophiles ; la productivité et la valeur pastorale sont faibles à moyennes (mais ces pelouses sont reconnues d'intérêt pour la saveur des fromages ou la biodiversité). Les sols sont ici soit des rendisols, soit des organosols.

- **Pelouses à pâturin des alpes** (désignées par « gazon » à Paturin). La végétation est dominée par des graminées et des légumineuses à forte appétence. La production en biomasse est relativement élevée ; la fréquentation est précoce et intense d'où un aspect de « gazon » ; les apports d'éléments nutritifs par les bouses et la fixation d'azote compensent en partie les exportations de biomasse. Ces pelouses tapissent le fond de vallon, notamment la partie basale du cône de déjection. Les sols sont des sols alluviaux et colluviaux calciques.

- **Pelouses grasses mésophiles** (désignées par « hautes herbes » à Trisète). Ce type de végétation à base de *Trisetum flavescens*, dominé par les graminées fourragères et présentant de nombreuses légumineuses ; la biomasse produite est forte bien que les restitutions par déjection soient faibles. A Bise ces pelouses sont localisées au niveau des pentes d'éboulis stabilisés ; ce type est associé à des brunisols saturés et des calcisols dont la fertilité est maintenue grâce à des phénomènes de chaulage naturel, dus aux apports gravitaires amonts de matériaux calcaires. Il s'agit en général de pâturages un peu tardifs

---

<sup>107</sup> Bornard et al, 1992 Typologie de la végétation des alpages laitiers des Alpes du Nord. 25 fiches techniques,. G. I. S. Alpes du Nord, Chambéry.

- **Pelouses nitrophiles** à *Rumex alpina*. Elles occupent des zones de reposoir, avec concentration des déjections, qui confère un caractère nitrophile prononcé à la végétation. Entre les touffes de Rumex, des graminées fourragères subsistent, ce qui maintient la valeur pastorale de la végétation et différencie ces stations du véritable *Rumicion* des phytosociologues, localisé autour des bergeries et où le recouvrement par le Rumex et les Orties est quasi complet.

- **Zones humides**, marais aux sols hydromorphes, calciques et humifères, liés aux résurgences ou à des concentrations topographiques d'eaux de surface. La végétation est de très faible valeur pastorale, typique des bas marais carbonatés, marquée par un cortège de plantes typiques des milieux humides.

### **5.1.7. Synthèse: compartimentation agroécologique du système étudié et désignation des stations de suivis**

Le type de végétation constitue un premier bon descripteur des variations spatiales du territoire étudié, en terme agropédoécologique et à l'échelle station. Non seulement la végétation, ou l'absence de végétation, intègre les facteurs clés du milieu et leurs interactions, mais en outre, les types décrits sont relativement stables à l'échelle annuelle (la végétation évolue peu sur quelques années malgré les fluctuations du pâturage, sauf accident). Le site de Bise peut de ce fait être rapporté à un ensemble de compartiments « homologues », dénommés « **faciès pastoraux** » caractéristiques par leurs états de sol et de végétation. Les déterminismes des différenciations entre faciès étant, si l'on se réfère à la bibliographie (voir 3.3), significatifs vis à vis de la survie des bactéries fécales dans l'environnement, nous retenons cette compartimentation comme une base pour choisir nos stations d'étude de la dynamique bactérienne dans les sols (tableaux 2 et 3).

<b>Faciès</b>	<b>Reposoir à Rumex</b>	<b>Gazon à Paturin</b>	<b>Hautes herbes à Trisetè</b>	<b>Nardaie</b>	<b>Landes à Ericacées</b>
<b>Fonction pastorale</b>	Reposoir	Pâtûre intensive et précoce	Pâtûre extensive et tardive	Pâtûre extensive	Passage
<b>Productivité</b>	Maxi	Moyen	Maxi	Faible	Faible
<b>Retour au sol / biomasse Epigée (%)</b>	100	10- 20	50- 80	80- 100	100
Prélèvement par pâtûrage	Faible	Maxi <i>Forte appétence</i>	Moyen- faible <i>Appétence faible au delà de juillet</i>	Faible <i>Appétence faible</i>	Nul
Légumineuses (%)	0	10- 20	10	0- 5	0
Déjections (intensité)	Maxi	Moyen	Moyen- faible	Faible	insignifiante
<b>SOLS</b>  Désignation terrain et références	Sols divers	Sols bruns calciques alluviaux  COLLUVIOSOLS ET FLUVIOSOLS CALCIQUES	Sols bruns calciques  BRUNISOLS CALCISOLS	Sols bruns acides sur moraines et sur lias en place  BRUNISOLS OLIGO-SATURES  ALOCRISOLS	Sols bruns ocreux sur lias en place  ALOCRISOLS  PODZOSOLS

Tableau 2. Typologie des faciès pastoraux; sols drainants (milieux ouverts).  
En grisé type de station retenus pour les suivis (cf texte).

<b>Faciès</b>	<b>artificialisés chemins</b>	<b>Pelouse à Sols confinés pélosols</b>	<b>Marais à Sols hydromorphes alluviaux</b>
<b>Couverture végétale</b>	Sols nus	Selon l'usage : Prairie nitrophile à rumex	Végétation de bas marais calcicoles
<b>écoulement de surface</b>	ruissellement hortonien	ruissellement lié à saturation	ruissellement lié à saturation
<b>Fonctions pastorales</b>	déplacement collectif du troupeaux	Reposoir	Accès eau

Tableau 3. Typologie des faciès pastoraux ; sols imperméabilisés (confinés).  
En grisé type de station retenus pour les suivis (cf texte).

La typologie retenue des faciès, ne prend pas en compte tous les cas intermédiaires, ni les évolutions entre types. Elle distingue en bref 2 grands groupes où se retrouvent les types de végétation et de sols présentés précédemment :

- les faciès sur sols drainants, perméables (tableau 2) qui constituent l'essentiel de la zone pastorale (100ha) ; au-delà de ce trait commun ils supportent tout un gradient de fréquentation par les animaux, de végétations, de conditions édaphiques, de modalités de transferts d'eau et donc de conditions pour les bactéries fécales. Associés aux formations et remaniements superficiels (cône, éboulis, colluviums), on peut penser *à priori* que ces stations ne sont actives en terme d'émission de germes, qu'en période de saturation des sols ou encore lorsque les niveaux piézométriques des toits de nappes sont élevés au dessus de la surface du sol.

- les faciès à sols typiquement hydromorphes, c'est-à-dire tourbeux et/ou plus ou moins gleyfiés (tableau 3) ; ils existent soit en annexes du réseau hydrographique principal (« bas marais ») soit dans des positions topographiques diverses, comme les loupes concaves de remaniements morainiques ou en situation de bas de pente, associés à des suintements. Ces situations représentent quelques hectares de végétations hygrophiles dont la fréquentation par les animaux dépend plus de l'organisation du circuit de pâturage et du comportement animal (repositoires, abreuvement) que de la valeur pastorale des végétations (peu appetentes).

- enfin, les faciès de sols artificialisés et imperméabilisés (chemins, zones de piétinements intenses le long des axes de déplacement collectif du troupeau) sont caractérisés par le déchaussement voire la disparition de la végétation, la mise à nu des sols et donc par une forte imperméabilisation de la surface du sol; dans ces stations, il existe une introduction régulière et quotidienne de contaminants fécaux.

Les sites expérimentaux retenus pour l'étude du devenir environnemental des populations de germes fécaux sont figurés en gris dans les tableaux 2 et 3. La répartition des différents types est enregistrée sous **système d'information géographique**, avec la constitution de cartes et tables d'attributs portant sur le contexte topographique, hydrologique, ainsi que les propriétés des sols et des végétations associées.

## **5.2. Vue d'ensemble du dispositif : variables et métriques.**

Les variables enregistrées se rapportent aux entrées, aux stockages, et aux transferts d'eau et de germes. Plusieurs échelles et objets d'observations sont concernés : le peuplement bactérien, l'ensemble bouse- végétation- sol, le faciès pastoral, le circuit général du troupeau et le réseau hydrographique. Pour respecter le caractère hiérarchisé du réseau hydrographique, les investigations relatives à la charge contaminante de l'eau sont organisées en s'intéressant à la fois à l'exutoire général et à divers points du réseau hydrographique correspondant, à des sous bassins amonts non pâturés (servent de zones témoins) et à de divers sous- bassins plus ou moins précocement pâturés.

Le tableau 4 fournit une vue d'ensemble de la diversité et de la structure de l'information recueillie avec un rappel des objectifs et une évocation sommaire des méthodologies utilisées. Les méthodes seront présentées brièvement dans les paragraphes suivants..

Les informations récoltées pour ce projet sont à la fois qualitatives, semi- quantitatives et quantitatives. Les données quantitatives brutes sont exprimées dans des unités aussi différentes que: des nombres /ha (bouses), des concentrations mg/l (chimie de l'eau), des nombres de bactéries en CFU par volume, ou poids de sols ou d'eau (cfu/g ou cfu/l), et des débits (l/s). Au stade des comparaisons entre sites et époques et pour l'interprétation et la modélisation des relations entrées- sorties, ces données sont transformées en **stocks** (quantité /ha) et en **flux** (quantité /heure). A noter qu'il est peu fréquent de raisonner en flux pour des bactéries<sup>108</sup>.

---

<sup>108</sup>Cassell A., Kort R.L, Meals D.W., Aschman S.G., Anderson D.P, Rosen BH, Dorioz J.M., 2002 Use of mass balance modelling to estimate phosphorus and bacteria dynamics in watersheds. Water Sciences and Technology vol 45, N°9 pp157- 168

objets		objectifs	méthode et dispositifs	références bibliographiques
entrées	Eau	Connaissance des régimes pluviométriques et évaporatoires  Caractérisation de la qualité de l'eau de surface et de sources entrant dans le bassin	Station météorologique  Analyses physico chimiques et dénombrement <i>E. coli</i> (Cf ci- dessous)	
	Déjections (bouses)	Suivi de l'intensité et de la distribution des restitutions au pâturage	Dénombrement des effectifs de bouses dans diverses stations représentatives des faciès pastoraux types	Tate et al, 2000 <sup>109</sup>
stocks	<i>Escherichia coli</i> <i>Pseudomonas</i> fluorescents	Connaissance des cinétiques de survie des <i>E. coli</i> dont les STECS  Caractériser l'activité des populations.  Evolution de la structure des populations d' <i>E. coli</i>  Mises au point méthodologiques	Extraction/dénombrement dans différentes stations pastorales, à diverses dates durant la saison de pâturage  Activité enzymatique d' <i>E. coli</i>  Prélèvement – congélation – extraction ADN Typologie des populations d' <i>E. coli</i>  Suivi de l'expression de gènes marqueurs de l'état physiologique.	Vansteelant, 2004 <sup>Erreur ! Signet non défini.</sup>  George, 2001 <sup>110</sup>  Mascher <i>et al</i> , 2000 <sup>111</sup> Ranjard <i>et al.</i> , 2003 <sup>112</sup>  Recorbet <i>et al</i> , 1993 <sup>113</sup>
	Eau	Connaissance de l'état hydrique des sols et des connexions hydrologiques	Suivi d'humidité TDR en continu dans diverses unités géomorphologiques Cartographie du réseau hydrologique	Jordan Meille 1998 <sup>114</sup>
	Interaction stocks – écoulement ( <i>Escherichia coli</i> )	Mesure de la labilité du stock de bactéries	Echantillonnage de ruissellements contrôlés sur des déjections	Vansteelant, 2004 <sup>Erreur ! Signet non défini.</sup>
sorties	<i>Escherichia coli</i>	Détermination de la qualité bactériologique et chimique de l'eau  Concentrations et flux de bactéries  Evolution des populations bactériennes	Exutoires du bassin et de sous- bassins - dénombrement <i>E. coli</i> - physico- chimie (NO <sub>3</sub> , NH <sub>4</sub> , P Total eau filtrée, conductivité, MES orga, MES Totale, COD).  Mesures ponctuelles aux exutoires de sous- bassins A l'exutoire général, mesure des débits et concentrations en continu pour la chimie, en intégré journalier pour la bactériologie.  Typologie des populations à l'exutoire	selon normes AFNOR
	Eau	Connaissances des régimes hydrologiques	A l'exutoire général, mesure des débits en continu durant la période printemps automne	

Tableau 4. Dispositif d'étude et d'échantillonnage.

<sup>109</sup> Tate K.W., E.R. Atwill, N.K. McDougald, M.R. George, D. Witt, 2000. A method for estimating cattle fecal loading on rangeland watersheds. Journal of Range Management. 53(5), 506- 510.

<sup>110</sup> George I., P. Crop, P. Servais, 2001, Use of B- D- galactosidase and B- D- glucuronidase activities for quantitative detection of total and fecal coliforms in wastewaters, Can. J. Microbiol., 47 : 670- 675.

---

<sup>111</sup> Mascher F, Hase C, Moenne- Loccoz Y, Defago G. (2000) The viable- but- nonculturable state induced by abiotic stress in the biocontrol agent *Pseudomonas fluorescens* CHA0 does not promote strain persistence in soil. *Appl Environ Microbiol.* 66:1662- 7

<sup>112</sup> Ranjard L, Lejon DP, Mougel C, Schehrer L, Merdinoglu D, Chaussod R (2003) Sampling strategy in molecular microbial ecology: influence of soil sample size on DNA fingerprinting analysis of fungal and bacterial communities. *Environ Microbiol.* 5(11):1111- 20.

<sup>113</sup> Recorbet G, Picard C, Normand P, Simonet P. (1993) Kinetics of the persistence of chromosomal DNA from genetically engineered *Escherichia coli* introduced into soil. *Appl Environ Microbiol.* 59:4289- 94.

<sup>114</sup> JORDAN MEILLE L., DORIOZ J.M., WANG D.,1998, Analysis of the export of diffuse phosphorus from a small rural watershed. *Agronomie*,18, 5- 26

### 5.3. Méthodes et suivis :

#### 5.3.1. Dénombrements des bactéries dans les sols et les déjections.

**Evaluation des effectifs de *E. coli* et *Pseudomonas sp* par culture.** Le dénombrement des populations bactériennes est généralement réalisé sur des milieux gélosés électifs. Dans l'environnement, les microorganismes peuvent être dans un état actif mais non cultivable (incapables de former des microcolonies sur des milieux gélosés). De fait, des méthodes alternatives au dénombrement sur milieux gélosés, basées sur la détection d'activités microbiennes ou de gènes, sont utilisées pour estimer les populations bactériennes d'*E. coli* et de *Pseudomonas* fluorescents dans les bouses et les sols.

- Les échantillons de bouse et sol (25g) sont broyés dans du tampon phosphate (pH 6,9, 50 ml) à l'aide d'un Waring Blender ; des dilutions en série sont réalisées dans l'eau puis les populations bactériennes d'intérêt sont dénombrées par MPN dans différents milieux de culture liquide.

- Les populations d'*E. coli* non- pathogènes sont dénombrées par détection de l'activité enzymatique  $\beta$ - D- glucuronidase. Deux cents microlitres de chacune des dilutions en série de l'échantillon sont introduits dans 16 puits d'une plaque 96 puits contenant du milieu MUG-EC déshydraté<sup>110</sup>. Les microplaques sont incubées à 44°C pendant 36 à 72h. Une fluorescence bleue révèle la présence d'une activité  $\beta$ - D- glucuronidase donc d'*E.coli* (norme AFNOR NF T 90- 414). La technique choisie est appropriée puisque un test portant sur les colonies ainsi identifiées montre que 97% des séquences 16S rRNA correspondent à des séquences correspondant à *E. coli* ou *Shigella*- annotated *E. coli*.

- Certaines populations d'*E. coli* ne possèdent pas cette activité (i. e. *E. coli* O157 : H7) et ne peuvent être dénombrées par cette méthode. Le dénombrement des STEC est réalisé en détectant la présence des gènes de virulence *stx* (codant les shigatoxines) par MPN- PCR *stx* . Les échantillons de bouse et sol (50g) et d'eau (50 ml) sont mis en suspension respectivement dans 250ml et 200ml d'eau peptonée; des dilutions en série sont préparées et 15  $\mu$ l de chaque dilution sont introduits dans 5 puits d'une plaque 96 puits contenant 150  $\mu$ l d'eau peptonée. Les boîtes sont incubées à 37°C pendant 24h. Un microlitre des cultures contenues dans chaque puit est utilisé pour réaliser les PCR *stx*.

- Pour les populations de *Pseudomonas* fluorescents producteurs d'antibiotiques on utilise le milieu King'sB (un milieu carencé en fer) contenant de l'ampicilline (40  $\mu$ g/ml), du chloramphénicol (13  $\mu$ g/ml) et de la cycloheximide (100  $\mu$ g /ml). Les boîtes de microtitration sont incubées à 28°C pendant 5 jours. Une fluorescence jaune détecte la production de sidérophores et donc la présence de *Pseudomonas* fluorescents.

**Effectifs en STEC dans les bouses et les sols par PCR.** En ce qui concerne les populations STEC, nos observations sont basées sur un suivi diachronique des effectifs en STEC pendant la saison pastorale, selon un dispositif d'échantillonnage du système bouse- sol décrit plus loin (voir fig. 11). Préalablement, 50 bouses fraîches ont été échantillonnées en 2005 au niveau des faciès 'Rumex' et 'Gazon à Paturin' et, en 2006, respectivement 13 et 9 bouses fraîches au niveau des faciès 'Nardaie' et 'marais', afin de déterminer si certaines contenaient des STEC. Pour ce faire, un bouillon d'enrichissement (eau peptonée) est ajouté aux échantillons de bouse. Après une nuit d'incubation à 37°C, des PCR *stx* sont réalisées. Trois bouses présentes dans chacun des faciès sont sélectionnées, excepté dans le cas du 'sol hydromorphe alluvial' où seule une bouse positive pour le gène *stx* a pu être trouvée. Les effectifs en STEC sont suivis par MPN- PCR *stx*, pendant 7 à 12 semaines (avec une fréquence d'échantillonnage entre 7j et 15j), dans ces bouses ainsi que dans les sols présents

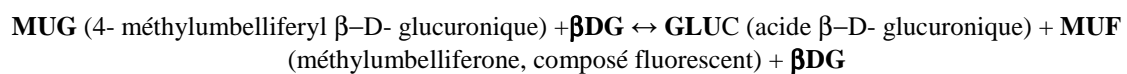


sous ces matières fécales (à 5 et 25 cm de profondeur) ou situés à 3 m en aval de ces bouses (à 10 cm de profondeur).

### **5.3.2. Evaluation de l'activité $\beta$ -D- glucuronidase d'*E. coli*.**

Différents travaux ont porté sur l'activité de la  $\beta$ -D- glucuronidase d'*E. coli* ( $\beta$ DG), dans les eaux, le lait, les sédiments<sup>115</sup> : l'idée est de mesurer l'activité enzymatique de la population bactérienne et de relier intensité de la réponse et effectif initial de la population. Nous souhaitons mettre à profit cette approche pour disposer d'un signal complémentaire pour la caractérisation des populations d'*E. coli*, évaluer en particulier la présence de bactéries viables mais non cultivables et leur influence sur la cinétique enzymatique.

La réaction enzymatique étudiée est la suivante :



Le MUF est dosé par fluorométrie. Plusieurs populations sont susceptibles de dégrader le MUG et de libérer du MUF<sup>116,117</sup>, telles que les *E. coli*, *E. coli* actif mais non cultivable (ABNC) et un ensemble d'organismes autres qu'*E. coli*, également producteur de  $\beta$ -Dglucuronidase. Pour ces derniers l'activité  $\beta$ -D- glucuronidasique est réduite à 44. 5°C. Dans les sédiments, le MUF libéré est fixé sur la matrice organo- minérale ; une partie du MUF fixé peut être extraite par l'éthanol, bien que le rendement de l'extraction ne soit pas de 100%<sup>118</sup>.

Le protocole mis en œuvre est le suivant : réalisation d'une suspension de terre (ou de matière fécale) dans une solution de MUG ; incubation à 44. 5°C ; prélèvement régulier d'aliqotes du mélange ; extraction du MUF par éthanol, centrifugation et dosage du MUF par fluorométrie ; en parallèle, établissement d'une courbe étalon pour relier intensité de la fluorescence et masse de MUF libérée par la réaction enzymatique. Quelques échantillons ont fait l'objet de mesures d'activité  $\beta$ DG : en début de saison sur marais, gazon et rumex ; en cours de saison sur gazon et rumex après un mois sous bouse (échantillons prélevés entre 5 et 20cm) ; sur bouse fraîche.

Suite à la dissociation enzymatique du MUG, la quantité de MUF libérée est donnée par :

$$MUF = GLUC * \frac{PM_{MUF}}{PM_{GLUC}}, \text{ avec :} \quad \text{Équation 1}$$

*GLUC* : masse de GLUC contenue dans le MUG (mg), substrat pour la croissance bactérienne ;  $GLUC = \text{masse de MUG} * \frac{PM_{GLUC}}{PM_{MUG}}$  où  $PM_{MUF}$ ,  $PM_{GLUC}$  et  $PM_{MUG}$  sont les poids moléculaires des différentes espèces.

<sup>115</sup> Flang W, Vikepur M, Sandholm M., 1995. A fluorometric bglucuronidase assay for analysis of bacterial growth in milk, Veterinary Microbiology, 46, 361- 367.

<sup>116</sup> Tryland I, Fikssdal L. 1998. Enzyme characteristics of  $\beta$ - D- galactosidase and  $\beta$ - D- glucuronidase positive bacteria and their interference in rapid methods for detection of waterbornE. coliforms and *Escherichia coli*. Appl. Environ. Microbiol., 64(3), 1018- 1023

<sup>117</sup> Petit M, George I, Servais P, 2000. Survival of *Escherichia coli* in freshwater : bDGlucuronidase activity measurements and characterization of cellular states. Can. J. Microbiol. 46: 679- 684.

<sup>118</sup> Boeschker H, Cappenberg T, 1994. A sensitive method using 4- methylumbelliferyl- b- cellobiose as a substrate to measure b glucanase activity in sediments. Appl. Environ. Microbiol., 60, 3592- 3596.

On considère qu'il existe deux types de populations bactériennes susceptibles de dégrader le MUG : *E. coli* et des espèces Non Target (NT). Pour *E. coli*, l'utilisation du substrat suit un modèle logistique. Pour NT, on suppose que l'enzyme est sensible aux conditions de température de l'essai et on considère une dynamique de dénaturation enzymatique selon un modèle de Kostistin<sup>119</sup>.

$$\frac{dECol}{dt} = a_{ECol} \cdot R_{ECol} \cdot GLUC \cdot ECol \quad \text{Équation 2}$$

$$\frac{dNT}{dt} = a_{NT} \cdot R_{NT} \cdot GLUC \cdot NT - c \int NT \quad \text{Équation 3}$$

$$\frac{dGLUC}{dt} = -a_{ECol} \cdot GLUC \cdot ECol - a_{NT} \cdot GLUC \cdot NT + \frac{rc}{R_{NT}} \cdot NT \int NT, \text{ avec :} \quad \text{Équation 4}$$

t le temps ; *ECol* et *NT* : masse de GLUC intégrée dans respectivement *E. coli* et les bactéries NT (mg);  $a_{ECol}$  et  $a_{NT}$  : taux d'utilisation du GLUC ( $\text{min}^{-1}$ );  $R_{ECol}$ ,  $R_{NT}$  : rendement d'utilisation du GLUC (sans dimension);  $c$  ( $\text{min}^{-1}$ ), taux de dénaturation de l'enzyme;  $r$  ( $\text{min}^{-1}$ ), le taux de recombinaison du substrat.

A  $t=0$ , on a  $ECol_0$  et  $NT_0$  = masse initiale de GLUC dans les populations bactériennes.

On considère une loi d'action de masse pour tenir compte de la fixation non extractible par l'éthanol du MUF sur la phase organique ou organo- minérale :

$$\frac{dMUF}{dt} = -kMUF \quad \text{Équation 5}$$

avec  $k$  : coefficient d'adsorption du MUF non extractible ( $\text{min}^{-1}$ ). A  $t=0$ ,  $MUF_0=0$ .

L'intégration du système différentiel est effectuée par méthode numérique (Range Kutta), sous ModelMaker. Les paramètres sont calculés en optimisant le modèle sur les masses de MUF observées (Marquardt).

### 5.3.3. Caractérisation moléculaire de la structure et de l'état physiologique des populations d'*E. coli*

- **Structure des populations d'*E. coli* dans les différents compartiments du bassin versant.** Différentes techniques telles que l'électrophorèse enzymatique multilocus (MLEE)<sup>120</sup>, les méthodes d'amplification aléatoire du polymorphisme de l'ADN (comme la box- , rep- , ERIC- PCR, et RAPD<sup>121;122;123</sup> ou l'électrophorèse en champ pulsé (PFGE<sup>124</sup>))

<sup>119</sup> Pavé A. 1994. Modélisation en Biologie et en écologie, 559p. Aléas Ed, Lyon

<sup>120</sup> Gordon D. M., S. Bauer and J. R. 2002. The genetic structure of *Escherichia coli* populations in primary and secondary habitats. Microbiology. 148 : 1513- 1522.

<sup>121</sup> Yang, H. - H., R. T. Vinopal, D. Grasso, and B. F. Smets. 2004. High diversity among environmental *Escherichia coli* isolates from bovine feedlot. Appl. Environ. Microbiol. 70 : 1528- 1536.

<sup>122</sup> Aslam, M., F. Nattress, G. Greer, C. Yost, C. Gill, and L. McMullen. 2003. Origin of contamination and genetic diversity of *Escherichia coli* in beef cattle. Appl. Environ. Microbiol. 69 : 2794- 2799.

<sup>123</sup> McLellan, SL, AD Daniels, AK Salmore. 2003. Genetic characterization of *Escherichia coli* populations from host sources of fecal pollution using DNA fingerprinting. Appl. Environ. Microbiol. 69 : 2587- 94.

sont utilisées pour analyser et comparer la diversité des populations naturelles d'*E. coli* dans différents compartiments environnementaux du site d'étude. Ces approches nécessitent toutefois l'isolement préalable des bactéries sur milieux gélosés (approches par isolats) et sont donc fastidieuses et ne permettent pas de tenir compte de l'ensemble de la diversité des populations ciblées.

- Dans ce travail nous avons choisi d'utiliser une technique permettant d'obtenir et comparer les empreintes moléculaires (ou '*fingerprints*') des populations d'*E. coli* dans les différents compartiments du système bassin versant. Il s'agit de la DGGE ciblant le gène *uidA*<sup>125</sup>. Le principe de la méthode repose sur la séparation (en fonction de la variabilité de leurs séquences et notamment de leurs pourcentages GC) d'amplicons sur un gel d'acrylamide contenant un gradient dénaturant. Pour les populations d'*E. coli*, le fragment amplifié correspond à un fragment interne de 168 pb du gène *uidA*.

- La première étape limitante de cette méthode est d'extraire à partir des échantillons un ADN total en quantité suffisante, de bonne qualité (non dénaturé) et pur (absence de contaminations par des acides humiques pour les échantillons sols qui sont un frein aux amplifications PCR). Au cours de ce travail plusieurs méthodes d'extraction et de purification d'ADN (kits *FastDNA SPIN* de BIO101 systems, Qbiogene et *PowerSoil* de Mobio, utilisation de colonnes de PVPP) ont été testées. Les plus grandes difficultés sont rencontrées avec les échantillons de sol car les amplifications PCR *uidA* réalisées sur ce type d'échantillon se sont avérées insuffisantes. Ceci est probablement lié aux faibles niveaux des populations d'*E. coli* dans les sols. Pour pallier ce problème, des étapes d'enrichissement (cultures en milieu) sont réalisées.

- La structure des populations d'*E. coli* avant et après enrichissement a pu être comparée, en ce qui concerne les échantillons d'eau et de bouses. Les modifications de structure des populations observées, en particulier dans les échantillons de bouses, mettent en évidence l'existence de (sous)populations d'*E. coli* non- cultivables dans ces échantillons. C'est donc la structure des populations d'*E. coli* cultivables (i. e. après enrichissement) que nous avons comparée dans ce travail.

- En parallèle, une approche complémentaire de clonage/séquençage est développée afin d'étudier le polymorphisme du gène *uidA* dans les populations des différents compartiments du bassin versant. Pour ce faire, des amplicons *uidA* sont générés à partir d'échantillons d'ADN total ou d'isolats d'*E. coli*. Ces amplicons sont clonés dans le vecteur pGEMT- Easy puis séquencés en utilisant des amorces universelles M13Forward et M13Reverse. Ces séquences sont analysées et un arbre phylogénétique construit (par Neighbour joining) en utilisant le logiciel Mega 31.

- En ce qui concerne les STEC, la diversité des isolats collectés au cours des 2 saisons de pâturage est analysée par électrophorèse en champ pulsé (PFGE). Cette méthode permet de révéler les liens de clonalité entre des isolats par comparaison de leur pulsotype (c'est-à-dire du profil de digestion de l'ADN génomique par une ou plusieurs enzymes de restriction). Ici, nous utilisons l'enzyme *XbaI*. Les profils de virulence des isolats sont caractérisés par amplification PCR des gènes *stx1*, *stx2*, *eae* et *ehx*. D'autres caractéristiques phénotypiques sont également étudiées (sérotypes, mobilité, aptitude à former des biofilms).

- **Analyser l'état physiologique des *E. coli*** . Notre objectif initial est de déterminer et comparer l'état physiologique (état de division ou de dormance) dans lequel se trouvent les

---

<sup>124</sup> Lu L., M. E. Hume, K. L. Sternes and S. D. Pillai. 2004. Genetic diversity of *Escherichia coli* isolates in irrigation water and associated sediments : implications for source tracking. *Water Res.* 38 : 3899- 3908.

<sup>125</sup> Sigler W. V. and L. Pasutti. 2006. Evaluation of denaturing gradient gel electrophoresis to differentiate *E. coli* communities in secondary environments. *Environ. Microbiol.* 8 : 1703- 1711.

populations d'*E. coli* et les populations de *Pseudomonas* fluorescents (i) dans les différents compartiments du bassin versant et (ii) en fonction des saisons (pendant la période de pâturage, l'hiver). Dans la littérature, aucune méthode permettant d'appréhender l'état physiologique des bactéries dans le sol n'est disponible. Des mises au point méthodologiques ont donc dûes être entreprises pour tester la faisabilité de cette approche.

- Comme nous l'avons précédemment décrit (voir § 3. 3), certains gènes chez les bactéries sont spécifiquement transcrits *in vitro* au cours des phases exponentielle ou stationnaire de la croissance bactérienne. Nous avons choisi de travailler sur 3 marqueurs de phase exponentielle *rpoZ*, *fis* et *ftsZ* et 3 marqueurs de phase stationnaire *rpoS*, *rmf* et *dps*, pensant que l'analyse de l'expression de ces 6 marqueurs dans un même échantillon nous permettrait de définir l'état physiologique d'*E.coli*. Etant donné que la transcription de ces marqueurs n'a, à notre connaissance, jamais été étudiée *in situ*, il s'est avéré nécessaire de vérifier l'expression de ces marqueurs moléculaires au cours de cinétique de croissance d'*E. coli* dans des systèmes simplifiés, à savoir des microcosmes de sol inoculés.

- Une souche *E. coli* DH5 $\alpha$  est utilisée comme souche de laboratoire témoin. Plusieurs souches environnementales isolées dans le bassin versant sont utilisées: (i) dans une bouse, dans les sols rhizosphériques (ii) sous *Poa* et (iii) sous *Rumex*. Ces souches sont isolées après culture sur MUG- Ec agar. L'appartenance de ces souches à l'espèce *E. coli* est confirmée par croissance sur milieu TTC- Tergitol7 à 44°C, par galerie API- 20E et par séquençage d'un fragment du gène *uidA*. Après tamisage des sols à 2 mm, des. A partir de précultures de nuit (les cellules sont lavées dans du NaCl à 0,8% et mises en suspension dans du tampon phosphate), des microcosmes d'environ 10g de sol humide sont inoculés avec 5. 10<sup>8</sup> cellules d'*E. coli*. Trois microcosmes sont préparés par type, de sol, de temps d'échantillonnage et de souche. De façon à simuler l'alternance des températures existant entre le jour et la nuit, les microcosmes sont incubés quotidiennement 12h à 20°C et 12h à 4°C. Les microcosmes sont analysés aux temps 0h, 3h, 18h, 24h, 48h, 7 jours (168h), 10 jours (240h), 14 jours (336h), 28 jours (672h) et 60 jours (1440h). Une bouse fraîche mélangée à du sol rhizosphérique sous *Poa* ou *Rumex* (50% bouse fraîche/50% sol) complète le dispositif expérimental.

- La croissance des souches d'*E. coli* est suivie par énumération des *E. coli* sur milieu TTC- tergitol7 agar, à 44°C. En parallèle, les ARNs sont extraits à partir de 0,5 g de sol équivalent sec avec des billes de zirconium, dans un tampon de lyse. Suite au broyage, les protéines sont éliminées par un traitement avec un mélange chloroforme/alcool isoamylique (24/1 (V/V) et les acides nucléiques sont précipités avec de l'isopropanol à température ambiante. Les ARNs sont purifiés sur colonne (RNeasy mini kit, Qiagen) et traités deux fois avec une DNase (Ambion) afin d'éliminer toute traces d'ADN. Les ARNs extraits sont alors déposés sur gel d'agarose 1,2% afin de vérifier leur pureté, dosés au Nanodrop ND1000 et une PCR sur le gène *rrs* avec les amorces universelles pA/pH (référence) est effectuée afin de vérifier l'absence de toute trace d'ADN. Les ARNs purs sont rétrotranscrits aléatoirement avec le kit ImPromII™ Reverse Transcription System (Promega) afin d'obtenir des ADNc.

- Les gènes cibles sont ensuite amplifiés par PCR semi- quantitatives avec des amorces spécifiques mises au point dans le cadre de ce projet. Les PCR sont réalisées sur une quantité fixe d'ADNc (50 ng). Les amplifiats (5  $\mu$ l) obtenus après différents cycles d'amplification sont déposés sur gel d'agarose. Pour un nombre de cycles identiques situés dans la zone d'augmentation linéaire de l'amplification, l'intensité des signaux obtenus pour chaque marqueur est comparée sur l'ensemble des échantillons extraits au cours du temps.

- En ce qui concerne, les amorces spécifiques d'*E. coli* et de *Pseudomonas* spp., ces dernières sont définies sur la base d'alignements multiples (en utilisant le logiciel ClustalW) des séquences de ces différents marqueurs chez différentes subdivisions des protéobactéries (utilisation de la base de données du *National Center for Biotechnology Information* (NCBI)). Des analyses phylogénétiques de ces différents marqueurs sont menées en parallèle en utilisant le logiciel MEGA3. <sup>126</sup> Après la définition des amorces, les protocoles PCR sont établis sur 11 souches d'*E. coli* isolées dans l'eau de l'alpage de Bise en 2004 et sur la souche DH10B d'*E. coli* K- 12.

- Pour les amorces ciblant les *Pseudomonas* spp., les protocoles sont tout d'abord élaborés à partir de souches de *Pseudomonas fluorescens* (PITR2, CM1a2, F113, P97- 30, K94- 31, CHA0, PILH1, P97- 26) puis testés sur d'autres espèces de *Pseudomonas* spp. (*P. syringae* pv *syringae*, *P. syringae* pv *aptata*, *P. aeruginosa* PA01, *P. alcaligenes*, *P. asplenii*, *P. chlororaphis*, *P. citronellolis*, *P. fragilis*, *P. pseudoalcaligenes*, *P. stutzeri*, *P. viridiflava*).

- La spécificité des amorces fait l'objet d'un test sur des souches d'espèces proches phylogénétiquement d'*E. coli* (*Pectobacterium carotovorum*, *Erwinia chrysanthemi*, *Proteus mirabilis*, *Salmonella enterica*, *Salmonella enteritidis*, *Enterobacter aerogenes* et *Serratia marescens*) et de *Pseudomonas* spp. (*B. cenocepacia*, *Ralstonia solanacearum* GMI1000 et *Acinetobacter calcoaceticus*).

#### **5.3.4. Etude de la variabilité des effectifs fécaux du système bouse – sol.**

Dans le système bouse- sol, on s'attend à une forte variabilité des effectifs des populations bactériennes, en termes de localisation et de pérennité des stocks, en relation avec un certain nombre de mécanismes et phénomènes relatifs à la survie/mortalité et à l'introduction/transfert bactérien. Le dispositif adopté pour tester ces hypothèses consiste en des suivis d'effectifs d'*E. coli* et de *Pseudomonas* fluorescents (témoin tellurique) dans situations différentes par la proximité de la bouse (position et durée) et les conditions saisonnières et pastorales (fig 11).

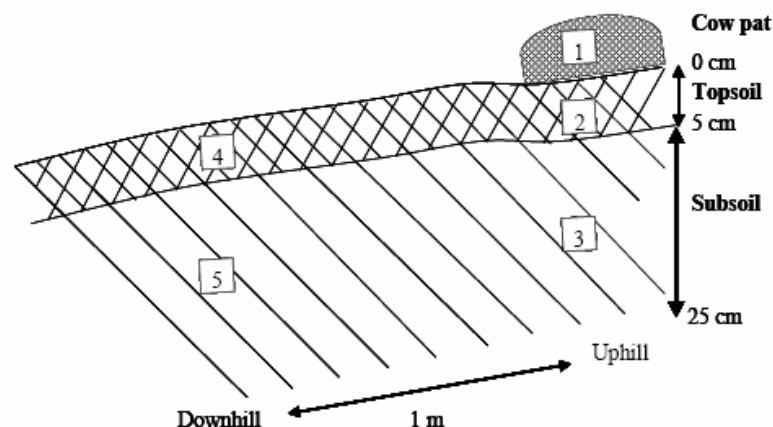


Figure 11. Localisation des prélèvements dans le système sol- bouse.

<sup>126</sup> Kumar S., K. Tamura and M. Nei. 2004. MEGA3 : Integrated Software for Molecular Evolutionary Genetics Analysis and Sequence Alignment Brief. Bioinform. 5 : 150- 163.

Deux types d'analyse sont mises en œuvre sur la base de ce schéma de prélèvement (cf tableau 5) :

- une *analyse synchronique* visant à révéler le rôle des facteurs bioclimatiques et agropastoraux, avec des prélèvements effectués sous le manteau neigeux, en période de fonte des neiges et durant la saison pastorale, dans des contextes de sols et de fréquentation animale tranchés; des mesures complémentaires sont réalisées dans des zones naturelles, en dehors du secteur pastoral, afin d'évaluer le rôle de la faune sauvage sur les stocks bactériens;

- une *analyse diachronique* visant à révéler l'effet de différents niveaux de proximité des bouses sur les dynamiques des populations bactériennes; les mesures sont réalisées plusieurs fois pendant la saison pastorale et dans des stations représentatives de conditions de sols confinés (réductisols pélosols...) ou à l'opposé de conditions « ouvertes » (sur formation filtrante, voir 5.1.3).

Les données du suivi synchronique sont traitées par test ANOVA, celles issues des relevés diachroniques par MANOVA afin de tenir compte de l'appariement des échantillons.

	Faciès échantillonnés	Période - fréquence d'échantillonnage
Analyse synchronique	<ul style="list-style-type: none"> <li>- <i>Rumex</i> (conditions pélosoliques) <ul style="list-style-type: none"> <li>- Nardaie</li> <li>- Sol alluvial</li> <li>- Gazon à <i>Poa</i></li> </ul> </li> <li>- Pelouse naturelle (zone non pastorale)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Fonte des neiges</li> <li>- Conditions hivernales</li> <li>- Saison pastorale</li> </ul> (fréquence d'échantillonnage : 2 mois)
Analyse diachronique	<ul style="list-style-type: none"> <li>- <i>Rumex</i> (conditions pélosoliques)</li> <li>- <i>Rumex</i> (conditions stagniques)</li> <li>- Gazon à <i>Poa</i></li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- début juillet à fin septembre</li> <li>- fréquence d'échantillonnage : 15 jours</li> </ul>

Tableau 5. Analyses diachronique et synchronique. Caractéristiques de l'échantillonnage.

### **5.3.5. Suivis du bilan hydrique et de la qualité des eaux.**

- **Enregistrements climatiques.** Une station météorologique installée durant la période de suivi printemps- automne (à 1660m d'altitude à proximité de l'exutoire) fournit des références locales indispensables en conditions de montagne, sur les hauteurs de précipitation et les paramètres nécessaires au calcul de l'ETP Penman- Monteith<sup>127</sup>.

- **Quantité et qualité de l'eau en sortie de bassin.** L'exutoire est équipé d'un seuil jaugé. Lors de la bonne saison (mai –octobre) un enregistrement automatique des hauteurs d'eau est réalisé. Un préleveur automatique échantillonne l'eau tous les quarts d'heure, avec constitution de quatre échantillons intégrés par jour maintenus dans une enceinte réfrigérée (2°C) alimentée par batteries et panneau solaire.

<sup>127</sup> ALLEN R. G., PEREIRA L. S., RAES D., SMITH M., 1998. Crop evaporation. Guidelines for computing crop water requirements. . ISBN 92- 5- 104219- 5. FAO Irrigation and drainage paper 56, Rome.

- L'eau est destinée à des analyses physico- chimiques. Elles sont réalisées sur des échantillons hebdomadaires proportionnels au débit journalier par le laboratoire de chimie de l'INRA Thonon et selon les normes AFNOR (tableau 6). Les échantillons analysés sont conservés à 4°C pendant une semaine maximum. La filtration quand elle est nécessaire, est réalisée avec des filtres fibres de verre à 0.7µm.

- Deux fois par semaine, les quatre échantillons intégrés journaliers font l'objet d'une analyse bactériologique, pour le dénombrement par Nombre le Plus Probable d'*E.coli* (filtration sur membrane et mise en culture sur microplaque 96 puits contenant du milieu MUG<sup>128</sup>). Des prélèvements automatiques supplémentaires pour analyses microbiologiques et physico- chimiques, sont réalisés lors d'épisodes pluviaux. Les prélèvements couvrent en détail les phases de montée et de descente de crue (1 échantillon par 2h ou 8h). L'acheminement des flacons au laboratoire est réalisé dans un délai maximum de 12 à 16 heures après échantillonnage; dans ces conditions opératoires, l'évolution des effectifs bactériens est négligeable<sup>129,130</sup>.

Conductivité	MES	NH4+	NO3	Ptef	Ptotal	COD	SO4.
Conductivité à 25 °C Correction de température automatique	MEST Filtration sur filtres fibres de verre	Azote ammoniacal 1 Bleu indophénol	Azote nitrique Colorimétrie réduction Cd	Phosphore total Minéralisation au peroxodisulfate en milieu acide	Phosphore total Minéralisation au peroxodisulfate en milieu acide	(COT) détection IR Minéralisation Persulfate à chaud 80°C	Sulfates Chromatographique
NFEN2788 /ISO7888	NF EN 872	NF T90- 015	NF EN ISO 26777	NF EN 1189	NF EN 1189	FDT 90- 102	EN ISO 10304- 1

Tableau 6. Références des méthodes utilisées pour la chimie des eaux.

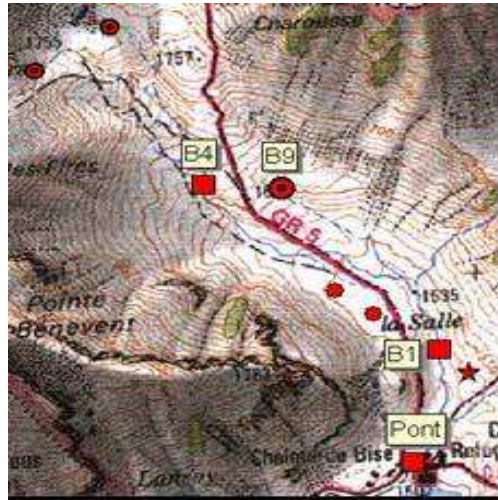
En période hivernale, le site est d'accès difficile; le bassin est totalement couvert de neige pendant 5 mois et les prélèvements sont limités à des échantillonnages ponctuels trimestriels à l'exutoire.

**- Qualité de l'eau en entrée de bassin et sur quelques sous bassins.** Dans le but d'une part, d'évaluer la qualité de l'eau à l'entrée du système étudié, c'est- à- dire le bruit de fond provenant de zones non pâturées et d'autre part, de suivre l'acquisition de la charge contaminante en fonction de la progression du troupeau, le suivi de la qualité physico- chimique et bactériologique des eaux comprend un échantillonnage régulier de plusieurs points d'écoulements temporaires et permanents, résurgences, sources, suintements d'eau et exutoires de sous- bassins (cf fig 12). Quelques prélèvements d'eau de pluie et de neige complètent ce dispositif. Ces suivis se déroulent sur trois ans à un rythme plus ou moins hebdomadaire pendant la saison pastorale.

<sup>128</sup> Hernandez J. F., J. M. Guibert, J. M. Delattre, C. Oger, C. Charrière, B. Hugues, R. Serceau, 565 and F. Sinégre. 1991. Evaluation of miniaturized procedure for enumeration of *Escherichia 566 coli* in sea water, based upon hydrolysis of 4- methylumbelliferyl - D- glucuronide. Water Res. 567 25:1073- 1078.

<sup>129</sup> GAY S, 2002. Mise au point d'une méthodologie pour évaluer le degré de contamination fécale des eaux de surface en région de montagne, Mem DEA, Université de Savoie, Chambéry, 68p.

<sup>130</sup> Ferguson C. M., 2003. Refrigerated autosampling for the assessment of bacteriological water quality. Water Research, 28(4), 841- 847.

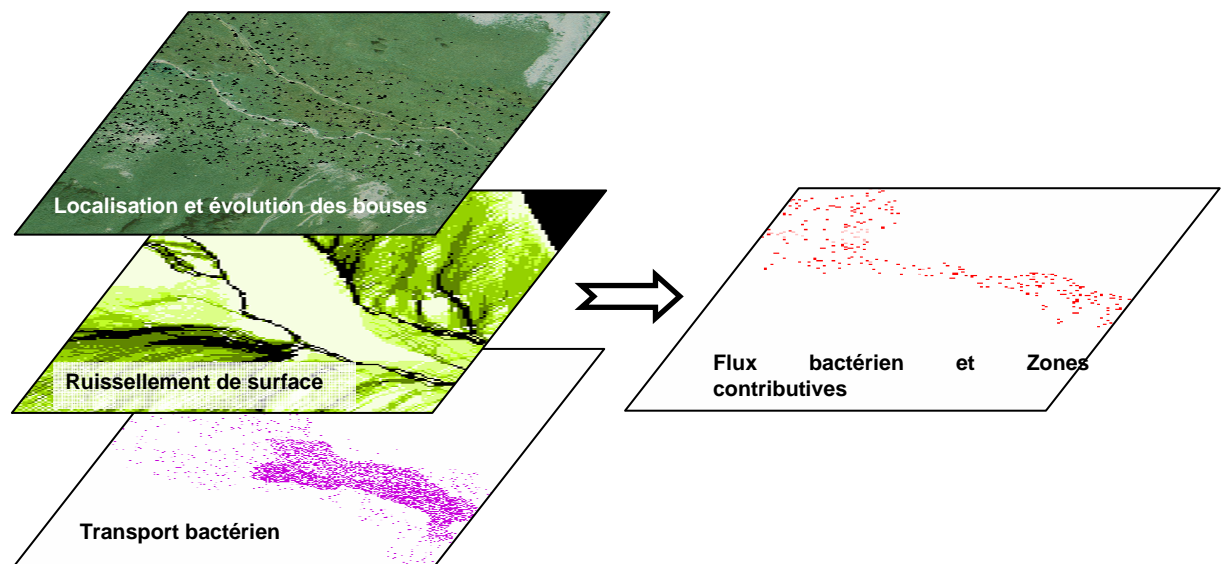


**Figure 12. Résurgences et points de prélèvements :** ronds pointés résurgences d'origine karstique ; ronds : résurgences temporaires de cône ou d'éboulis ; étoiles : suintements de colluvium ; carré : écoulement de surface. L'écoulement est permanent au niveau des points « B4, B9, B1 et Pont » (échelle: 1 :25 000).

## 5.4. Développement et paramétrage d'un modèle du transfert des B. fécales à l'échelle bassin versant.

### 5.4.1. Principes

Nous avons développé un modèle rendant compte de l'évolution dans l'espace et dans le temps des effectifs des bouses, de la coïncidence entre dépôts et zones sensibles au ruissellement et de leur localisation vis-à-vis du trajet des écoulements de surface (Figure 13).



**Figure 13. Modèle de transfert bactérien. Bases conceptuelles.**

L'espace est discrétisé sous forme de cartes « raster » pixellisées. Le modèle calcule chaque jour  $j$  la quantité totale  $NT_j$  de bactéries transmises à l'exutoire selon :



$$NT_{jc} = \sum_1^k \sum_1^{i=nk} S_{jik} \overline{E} G_{ji} \quad \text{Équation 6}$$

où  $i$  est le nombre de pixels qui ruissellent et sur lesquels une bouse est déposée ;  $k$  le nombre de classes de bouses homogènes en terme d'âge de dépôt et de stock de bactéries mobilisables,  $S$  la quantité de bouse,  $\overline{E}$  la teneur moyenne en bactérie mobilisables des bouses et  $G$  une fonction de transfert bactérien rendant compte des phénomènes de mobilisation des bactéries et de leur interception lors de leur trajet vers le réseau hydrographique. La mise en œuvre d'un tel modèle suppose de préciser des fonctions relatives à la répartition des bouses, à l'émission de ruissellement et au transport bactérien.

### **5.4.2. Déjections animales et émission de bactéries**

**Stock de bouses S.** La quantité de bouse apportée par le troupeau (exprimée en nombre de bouses équivalente de 30cm de diamètre.  $ha^{-1}$ ) est estimée tout au long de la saison pastorale par comptage sur différentes placettes représentatives d'unités de sol- végétation (Tableau 2 et Tableau 3). Pour généraliser ces observations à l'ensemble des quartiers de pâturage, des modèles d'évolution du stock de bouses sont développés, rendant compte des apports par le troupeau et de phénomènes de dégradation des bouses, lesquelles évoluent après dépôt sous l'effet du délavage par les pluies et de remaniements biologiques par les insectes coprophages<sup>131</sup>. Pour une entrée potentielle  $N_0$  de bouses, on distingue notamment :

- une évolution graduelle du nombre  $S_j$  de bouses, puis atteinte d'un pallier correspondant à un équilibre entre apport  $p$  et disparition  $q$  des dépôts, dans les situations où il n'entraîne pas une dégradation de l'appétence de la végétation :

$$S_j = N_0 p \frac{1 - q^j}{1 - q} \quad \text{Équation 7}$$

- une évolution graduelle, avec maximum puis décroissance du nombre de bouses dans les stations où l'accumulation a un effet rétroactif, entraînant une baisse de la fréquentation du troupeau :

$$S_j = N_0(p + k) \frac{q^j - u^j}{q - u} \quad \text{Équation 8}$$

Considérant une structure spatiale du semis de points homogènes et isotropes<sup>132</sup>, ces modèles permettent d'élaborer des cartes donnant la distribution spatiale de différentes classes d'âge de bouses (bouses fraîches, bouses peu évoluées, vieilles bouses).

**Stock de bactéries mobilisables E.** Afin d'évaluer dans quelle mesure l'état d'évolution des bouses influence la quantité de bactéries mobilisables, des pluies artificielles sont réalisées sur quelques bouses plus ou moins anciennes et donc d'états physiques variables. Plusieurs bouses sont arrosées, avec un dispositif permettant le recueil des eaux de ruissellement et d'écoulement de l'eau au travers du mât racinaire pour analyse microbiologique et estimation des quantités de bactéries mobilisées (

Figure 14). Le dispositif utilisé est simple mais suffisant et adapté aux difficultés du terrain.

On dispose grâce à ces approches, d'une évaluation des stocks de bouses, de leurs évolutions dans l'espace et dans le temps en relation avec le comportement animal, de leurs

<sup>131</sup> Gobat J., M. Aragno, and W. Matthey. 1998. Le sol vivant: bases de pédologie, biologie des 556 sols. Presses polytechniques et universitaires romandes, CH- 1015 Lausanne.

<sup>132</sup> Goreaud F, 2000. Apports de l'analyse de la structure spatiale en forêt tempérée à l'étude et la modélisation des peuplements complexes. Thèse doc. ENGREF, Engref, Nancy, 364p + annexes.

potentiels d'émission bactérienne, bases d'estimation indispensables pour l'examen des entrées de bactéries dans le système étudié.



Figure 14. Dispositif de simulation de pluie.

### **5.4.3. Hydropédologie – modélisation du comportement hydrique**

La modélisation du fonctionnement hydrique de la couverture pédologique est introduite avec l'hypothèse d'une origine du ruissellement liée au fonctionnement des sources variables. Le choix du modèle s'est porté sur SMDR<sup>133</sup> (Soil Moisture Distribution and Routing model) en raison d'un nombre de paramètres limités, facilement accessibles et relatifs à l'hydrodynamique et à la réserve en eau des sols. Les calculs permettent de reconstituer les débits de l'exutoire du bassin à partir du bilan hydrique des sols de chaque pixel de l'espace discrétisé (Figure 15).

Les bilans d'eau sont optimisés sur les humidités de différentes unités de sols, mesurées par sonde TDR, englobant une gamme assez représentative des modelés topographiques, avec les secteurs plats des complexes hydromorphes, des toposéquences relatives aux associations sols superficiels - colluvions de pente ainsi que celles liées au cône de déjection central (Figure 16).

L'aptitude du modèle à reproduire le débit à l'exutoire du bassin versant est également vérifiée. Dans ce but, les volumes de ruissellement et d'écoulements latéraux qui arrivent au pixel « exutoire » sont sommés pour rendre compte des composantes eau de surface et de sub-surface du débit. Le débit de base est obtenu en sommant les volumes d'eau de drainage de chacun des pixels, le délai de transfert de cette eau profonde à l'exutoire étant considéré comme nul. Le débit total à l'exutoire calculé par SMDR est finalement obtenu par addition des deux composantes flux latéraux et volume total de drainage. Pour rendre compte de la complexité hydrogéologique du secteur d'étude et notamment de l'existence d'un compartiment karstique, un volume supplémentaire de drainage karstique est ajouté au débit total SMDR. Il s'agit d'introduire une variable calculée par ajustement d'une loi de vidange d'un réservoir amont, déduite d'un formalisme empirique<sup>134</sup> et dont les paramètres rendent compte de l'extension spatiale du karst et de sa cinétique de vidange. Les sorties du modèle

---

<sup>133</sup> SMDR, 2003. Soil Moisture Distribution and routing Model, version 2. 0. Documentation, Cornell University,,88p. <http://www.aben.cornell.edu/swlab/SoilWaterWeb/Research/smdr/index.html>

<sup>134</sup> Neitsch SL, Arnold JG, Kiniry JR, Williams JR, 2005. SWAT. Theoretical documentation, Grassland Soil and Water Research Laboratory, Temple, TX, 494p.

sont exploitées sous forme de cartes rendant compte pour chaque pixel de la hauteur du ruissellement de surface.

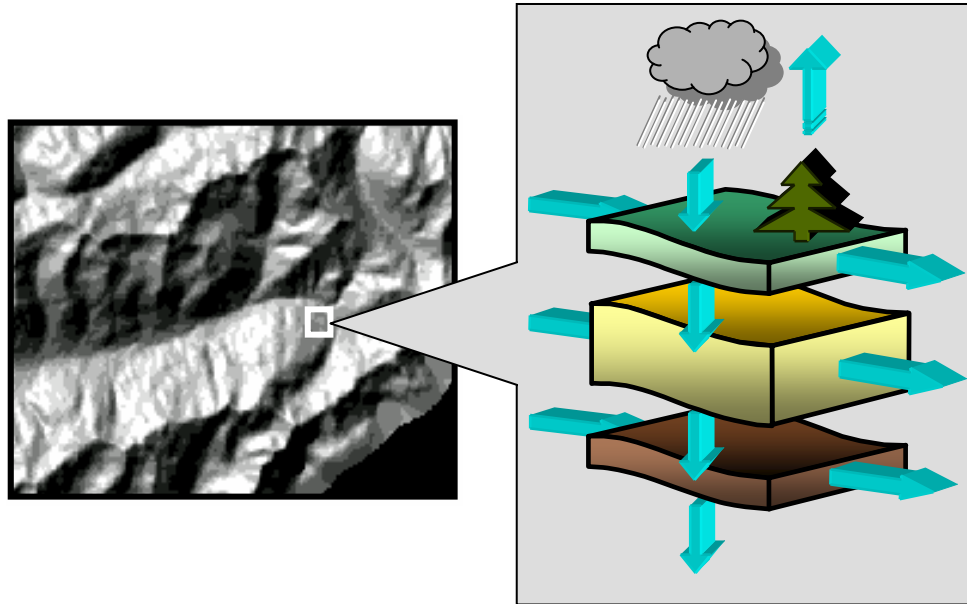


Figure 15. SMDR. Carte raster d'altitude et bases conceptuelles du calcul. Un bilan hydrique est effectué sur un pas de temps journalier pour chaque pixel de l'espace discrétisé. Les entrées et sorties d'eau verticales sont calculées en relation avec la demande évapotranspiratoire et l'équation d'écoulement de Richard simplifiée où les effets de capillarité sont négligés. Cette équation est également appliquée pour la détermination des flux latéraux, considérant un gradient hydraulique parallèle à la pente. Le ruissellement apparaît sur le pixel considéré si le bilan des flux verticaux et latéraux excède la porosité du sol..

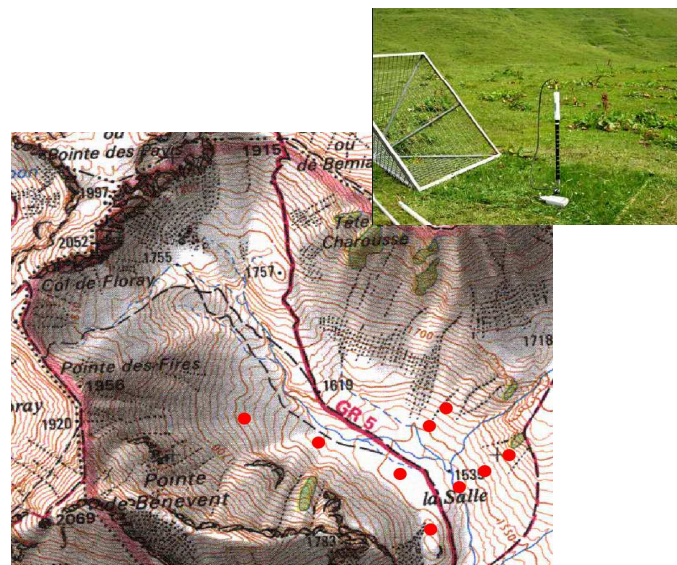


Figure 16. Humidimétrie TDR et points de mesure.

#### **5.4.4. Transport bactérien.**

Plusieurs auteurs considèrent une loi d'action de masse pour rendre compte, à partir du stock initial de bactéries  $E$ , de la quantité de micro-organismes exportée en fonction du volume de ruissellement<sup>135</sup>. Partant, avec un coefficient de proportionnalité  $\alpha$  décrivant la fraction de bactéries de  $E$  susceptible d'être mise en suspension dans la lame  $R$  de ruissellement en écoulement sur les bouses d'un pixel  $i$ , l'effectif  $n_{ji}$  de bactéries émis est :

$$n_{ji} = E_{ji}(1 - e^{-\alpha R_{ji}}) \quad \text{Équation 9}$$

Dans la mesure où les effets de sédimentation – rétention lors du transport font l'objet de controverses, nous avons testé plusieurs hypothèses :

- la rétention de bactéries entre pixels émetteurs et cours d'eau est négligeable ;
- elle est constante en fonction de la distance  $L$  parcourue :

$$\frac{dn_{ji}}{dL_{ji}} = -\beta n_{ji} ; \quad \text{Équation 10}$$

- la rétention s'amplifie le long de la pente :

$$\frac{dn_{ji}}{dL_{ji}} = -\frac{\omega}{1 + \lambda L_{ji}} n_{ji} \quad \text{Équation 11}$$

Les paramètres de ces modèles sont déterminés par analyse inverse à partir de mesures des flux totaux de bactéries enregistrés à l'exutoire du bassin versant.

## **6. RESULTATS**

### **6.1. Vue d'ensemble des résultats : dynamique saisonnière des état du bassin, des entrées et des sorties.**

#### **6.1.1. Evolution saisonnière de l'état du bassin**

Etats hydriques des sols et activités pastorales se succèdent sur le territoire étudié selon un calendrier qui dépend de la phénologie végétale et de la météorologie (Tableau 7). Les contrastes entre périodes sont représentatifs des conditions de l'étage subalpin et sont à l'origine d'une forte différenciation en terme de fonctionnement potentiel des transferts.

En bref, la couverture neigeuse hivernale réduit totalement l'activité sur le bassin. L'étiage hivernal est alimenté par des sources. Durant cette période, le système de transfert est *à priori* peu actif. A la fonte des neiges, le ruissellement et la saturation des sols sont maximaux. Il lui succède une saison biologique et pastorale avec une entrée maximale de djctions dans le système et des situations très diversifiées en terme d'états hydriques des sols et de couverts végétaux. Au cours de la saison pastorale, les divers évènements pluvieux génèrent des crues, dont les périodes de retour sont généralement < 5ans. Deux crues exceptionnelles de période >10 ans sont enregistrées durant la durée des suivis.

---

<sup>135</sup> Guber A. K., D. R. Shelton, Y. A. Pachepsky, A. M. Sadeghi, L. J. Sikora, 2006. Rainfall- induced release of fecal coliforms and other manure constituents: comparison and modelling. Appl. environ. Microbiol., 72 (12), 7531- 7539.

<b>PERIODE</b>	couverture neigeuse (« hiver »)	fonte des neiges	saison de végétation et pastoralisme	automne
Durée	5,5 à 6 mois (décembre à mai)	1 mois (se situe en mai-juin)	3,5 mois (juin – septembre)	1,5 à 2mois (octobre novembre)
Pluviosité	1,5 à 3m de neige	équivalent >100 mm	460 mm	100 mm
ETP	faible	faible	290 mm	30 mm
Température	- 1. 6 °C	8,5 °C	11,8 °C	8 °C
	<i>Estimations</i>		<i>Mesures</i>	
Gamme de débits exutoire (l/s)	10 à 80	100- 300	10 – 100 (300)	50- 100
Etat du bassin	réseau hydrographique masqué et étiage hivernal	saturation totale des sols et extension maximale du réseau hydrologique	étiage estival crues estivales	re- saturation des sols
Saturation sols				
Fréquentation animale (entrées potentielles)	Micro- mammifères vie ralentie	Herbivores sauvages (bouquetins) (charge très faible, >1 UGB/100 ha)	Herbivores domestiques (bovins, charge 0. 5 UGB/ha)	Herbivores sauvages (charge très faible, <1 UGB/100ha)

Tableau 7. Evolution saisonnière de l'état du système étudié (échelle bassin versant).

### **6.1.2. Entrées d'eau, de nutriments et de bactéries**

**Qualité physicochimique.** Les eaux de source (Tableau 8) sont bicarbonatées calciques et très oligotrophes, à l'exception de certaines sorties d'origine profonde qui possèdent une très forte charge en sulfates en relation avec la présence de trias ( $X < 1500 \mu S$ ). Bien que le débit de ces arrivées d'eau soit faible (elles alimentent un petit bas marais équivalent à un apport de l'ordre de 1 à 5 l/s), elles contribuent à une conductivité et surtout à une teneur relativement élevée en  $SO_4^{2-}$  (15 à 30 mg/l) à l'exutoire en étiage.

	Cond $\mu S/cm$	NH4 $mg. l^{-1}$	NO <sup>3-</sup> $mg. l^{-1}$	Ptot $mg. l^{-1}$	Ptot EF $mg. l^{-1}$	COD $mg. l^{-1}$	Cl $mg. l^{-1}$	SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup> $mg. l^{-1}$	MesT $mg. l^{-1}$
<b>n</b>	36	36	36	30	36	37	35	35	29
<b>Moyenne</b>	250,4	0,002	0,24	0,006	0,005	0,87	0,5	3,7	0,8
<b>CV (%)</b>	7,2	121,4	12,6	60,3	36,9	22,0	57,3	25,0	163,8

Tableau 8. Qualité physico- chimique des entrées d'eau dans le bassin versant de la source permanente B9 (voir fig 12).

**Qualité bactériologique de l'eau en entrée de bassin.** Le dispositif de suivi des entrées (prélèvements manuels hebdomadaires réalisés de 2004 à 2006 hors période de manteau neigeux, cf.

Figure 12) porte sur la source majeure du bassin (soutenant en été l'écoulement de base du cours d'eau) (noté B9), située en pied d'éboulis et attribuée à la vidange d'un réservoir karstique. A des fins de comparaison le même protocole est appliqué à mi- parcours sur le cours d'eau principal pour un prélèvement isolant un sous bassin amont (B4) où la pâte

début un peu plus tardivement et à l'exutoire du bassin (B1). Des prélèvements complémentaires sont effectués en divers points d'écoulements temporaires, en particulier à la fonte des neiges.

En B9 (figure 17) la contamination fécale est limitée (plus de 75% des échantillons présentent des teneurs  $<10 \text{ cfu. } 100 \text{ ml}^{-1}$ ), alors que B4 et surtout B1 sont marqués par une forte proportion d'analyses où les teneurs sont très élevées ( $>100 \text{ cfu. } 100 \text{ ml}^{-1}$ , non conformes à la qualité des eaux de baignade). Les mesures complémentaires sur des écoulements temporaires à l'amont de la zone actuellement pâturée ( $n = 50$ ; 80% teneurs moyenne  $<10 \text{ cfu}/100 \text{ ml}$ ) ou encore à l'aval mais avant l'arrivée des bovins et enfin sur des suintements associés à la fonte des neiges, confirment la faible contamination hors zone ou époque de pâture.

L'eau se contamine au fur et à mesure de son parcours dans le bassin versant pâturé. En début de saison la contamination « progresse » vers l'amont au fur et à mesure de l'exploitation pastorale. En moyenne, la concentration B9 en entrée de bassin versant ne représente que 5% de celle de l'exutoire.

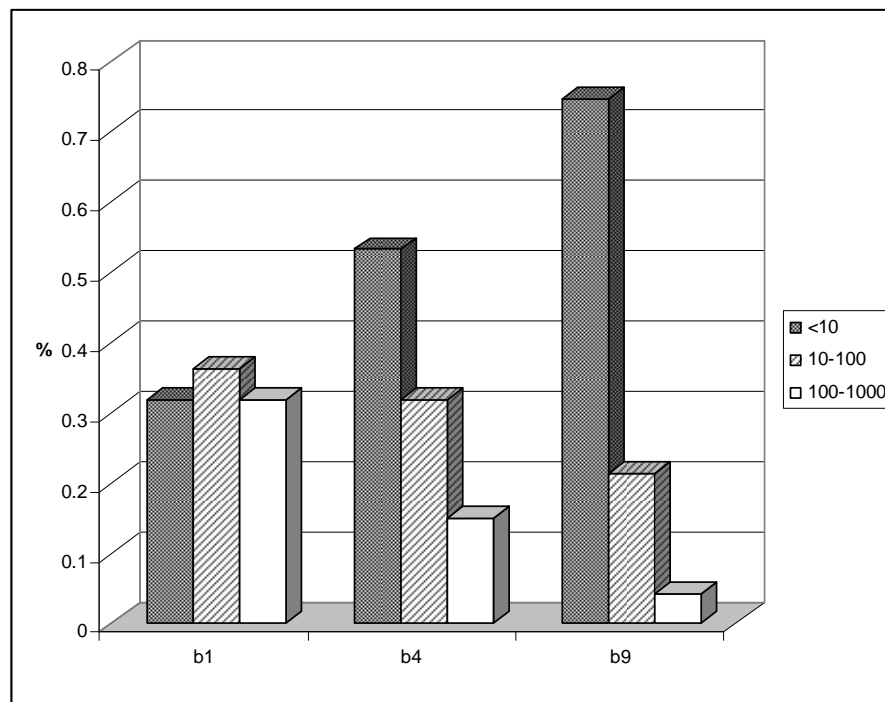


Figure 17. Teneurs en contaminants fécaux des eaux à l'entrée dans le bassin (B9) à l'exutoire (B1), à mi-pente (B4); histogramme de fréquences d'analyses où la teneur est  $<10$  (grisé), comprise entre 10 et 100 (tirets) et  $> 100 \text{ cfu. } 100 \text{ ml}^{-1}$  (références des sites fig 17).

**Entrées liées aux déjections: teneurs en *E.coli*. et *E.coli* mobilisables des bouses.** La teneur en *E. coli* des bouses atteint entre  $10^{6,5}$  et  $10^{7,5} \text{ E.coli cfu g}^{-1} \text{ MS}$  (matière sèche), teneurs assez voisines de celles généralement citées dans la littérature<sup>136</sup>. Les déjections des

<sup>136</sup> Sinton L. W., Braithwaite R. B., Hall C. H., Mackenzie M. L., 2007. Survival of indicator bacteria in bovine feces on pasture, App. Environ. Microbiol., 73(24): 7917- 7925.

bovins introduisent donc des quantités considérables d'*E. coli* sur les sols et les végétations de l'alpage (sur une saison, environ 20 000 bouses sont émises, soit  $10^{12}$  *E. coli*).

La teneur en *E. coli* au sein des déjections reste assez stable pendant le mois qui suit son dépôt (figure 18). La même gamme de teneur et la même stabilité sont enregistrées pour les *Pseudomonas* fluorescents. De fait, la principale évolution enregistrée concerne l'état physique de la bouse dont le volume décroît rapidement sous l'effet d'une dispersion biologique (insectes, ...) et physique par la pluie (phénomène de splash) ou par les écoulements (ruissellement, infiltration). Après le dépôt, les bouses évoluent assez rapidement, avec réduction de taille et perte de matière sèche. La durée de persistance d'un dépôt de début de saison n'excède pas 1,5 à 2,5 mois. Cette disparition assez rapide peut s'expliquer en partie par la forte pluviométrie du site d'étude. Concrètement, nos mesures montrent qu'en un mois le volume d'une bouse est divisé par 40, ce qui correspond à une baisse de 98% du stock de *E. coli*. Une bouse n'est donc qu'une **source transitoire** de bactéries fécales. En conséquence, si les teneurs varient peu, le stock décroît et l'état physique de la matière associée change, ce qui influence le potentiel de mobilisation par le ruissellement comme en témoignent les résultats relatifs aux teneurs des eaux de ruissellement d'averses artificielles réalisées sur différentes conditions (figure 19).

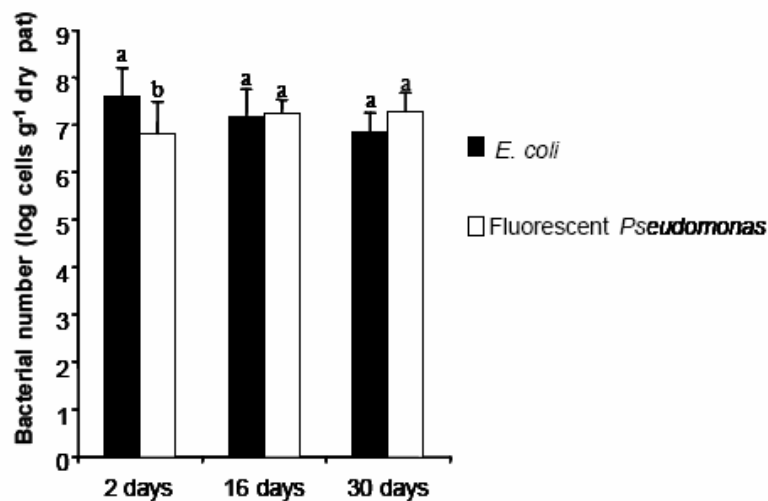


Figure 18. Evolution de la teneur en *E. coli* et *Pseudomonas* fluorescents dans les bouses (a et b indiquent des classes de valeurs significativement différentes selon ANOVA ; n=75).

Avec une bouse fraîche, cette teneur est comprise entre 6 à 7 Log cfu.  $100\text{ml}^{-1}$ . Elle baisse fortement lorsque l'on arrose une bouse croûtée (déposée quelques jours avant la simulation de pluie) avec environ 4.5 Log cfu.  $100\text{ml}^{-1}$ . La réduction s'accroît encore sur une bouse sèche ( $3.5$  Log cfu.  $100\text{ml}^{-1}$ ) résultant d'un dépôt de plusieurs semaines. Dans la mesure où les conditions de simulation de pluie, les sols et donc les intensités de ruissellement sont identiques d'un essai à l'autre, le rapport des concentrations correspond au rapport des stocks de bactéries mobilisables des bouses. Ainsi, le stock mobilisable de la bouse croûtée ne représente qu'une fraction de 1.8% de celle de la bouse fraîche. Pour la bouse sèche, cette valeur est minimale, de l'ordre de 1%. Ceci montre qu'après le dépôt des bouses, les teneurs en bactéries sont assez stables alors que les quantités de bactéries potentiellement mobilisables décroissent très rapidement. Ces résultats montrent l'intérêt de prendre en considération l'état de vieillissement des bouses pour une estimation non biaisée des entrées de bactéries fécales lors de ruissellements.

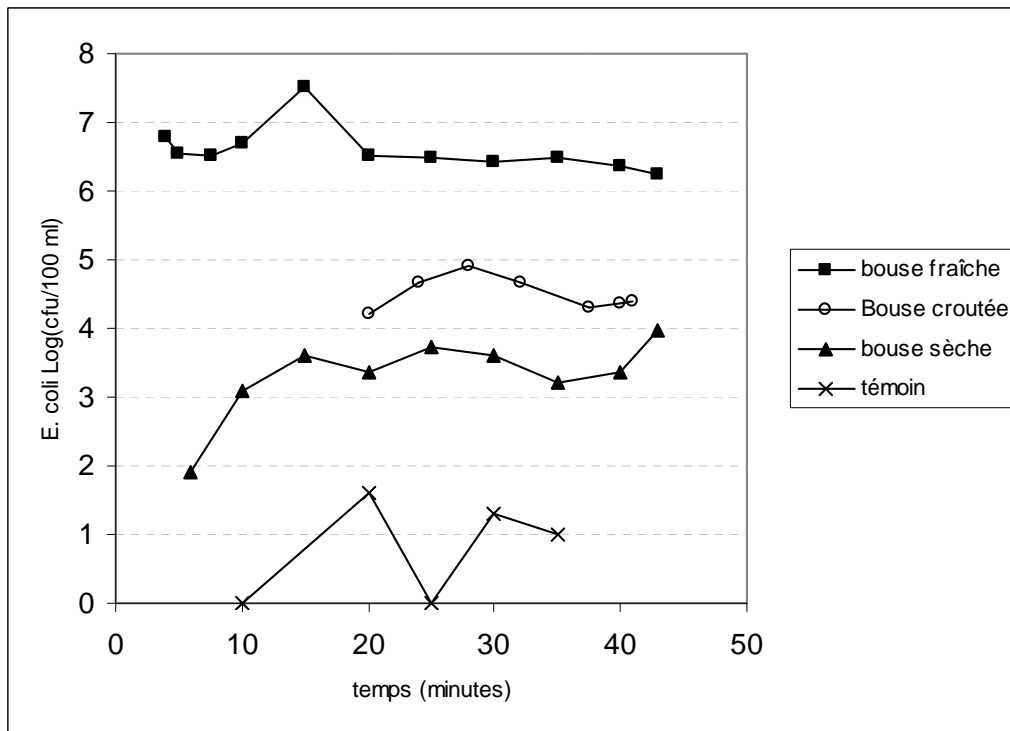


Figure 19 . Teneurs en *E.coli* du ruissellement sous pluies artificielles (témoin = sols sans déjection).

Rien n'exclut l'existence d'autres sources d'*E.coli* liées à la faune sauvage homéotherme dont la principale biomasse dans un écosystème pastoral est représentée par les micromammifères (campagnols). Dans le contexte du bassin étudié où il n'y a pas de pullulation des campagnols, on peut estimer d'après Note et Poix, 2006<sup>137</sup> leur densité à environ 100 individus. ha<sup>-1</sup>, ce qui pour les 170 ha du bassin et avec un poids approximatif par animal de 100 g, correspond à une biomasse campagnol de 1.7T. La population de campagnols est donc loin d'être négligeable mais elle ne représente en réalité que 4 à 5 % de la biomasse bovine, laquelle compte tenu d'un chargement de 0.5UGB/ha, équivaut à 48T. Selon Dubos et al<sup>138</sup>, les déjections de micromammifères du type souris contiennent de l'ordre de 10<sup>7</sup> *E. coli* g<sup>-1</sup> MS. Dans le cadre du projet, cet apport n'a pu être ni mesuré ni distingué par traçage génétique mais l'absence fréquente d'*E.coli* dans l'eau des zones pâturées et la faible biomasse des micromammifères suggèrent que cette source est négligeable.

**Evolution du nombre de bouses.** Les situations pastorales diffèrent assez fortement en terme de dynamique de dépôt des bouses (tableau 9) mais s'ajustent sur l'un des modèles (7) ou (8) de façon globalement satisfaisante compte tenu des incertitudes sur le dénombrement des bouses (figure 20). La pression d'entrée de bouses calculée est conforme à celle déduite du diagnostic agro- pastoral des unités, avec des valeurs réduites dans le cas des tapis végétaux où l'entrée d'azote est faible (nardaies et hautes herbes à triseté), moyennes pour les situations à fortes valeurs pastorales (gazon à pâturin) et fortes pour les pelouses nitrophiles à

<sup>137</sup> Note P., Poix C, 2006. Simulations spatialisées des pullulations de campagnols terrestres : étude de l'influence des structures paysagères. *Cybergeo*, 346, 12p.

<sup>138</sup> Dubos, R., W. R. Schaedler, R. Costello & P. Hoet., 1965. Indigenous, normal, and autochthonous flora of the gastrointestinal tract. *J. Exp. Med.* **122**.



rumex. Dans le cas des stations où la pression d'entrée de déjections est faible, ou lorsque l'accumulation n'interfère pas avec les besoins du troupeau (marais), le dépôt de bouse croît régulièrement au cours du temps et le modèle (7) peut alors être appliqué. A l'inverse, en cas de forte pression pastorale, comme c'est le cas pour Rumex et Poa, le modèle (8) est mieux adapté, ce qui signifie ici une dégradation progressive de la valeur pastorale de l'herbe et en retour une réduction progressive de la fréquentation animale.

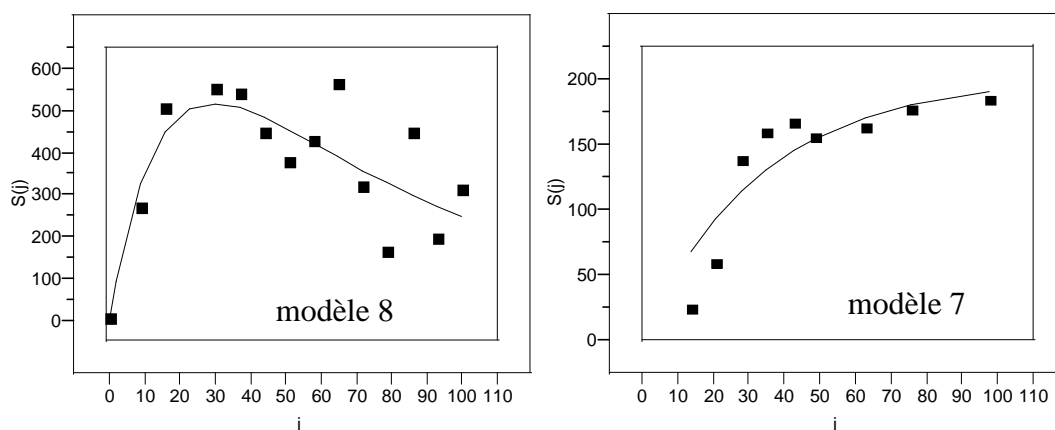


Figure 20. Modèles d'évolution du stock de bouses et ajustement aux données expérimentales (j : jours ; S(j) : nombre de bouses équivalentes. ha<sup>-1</sup>). A : réduction de la pression d'entrée de bouse avec l'avancement dans la saison pastorale ; B : constance de la pression d'entrée.

station pastorale	modèle	Entrée de bouses (N. ha <sup>-1</sup> . j <sup>-1</sup> ) : Nop (A) ou No(p+k) (B)	q taux disparition ha <sup>-1</sup> . j <sup>-1</sup>	u réduction entrée ha <sup>-1</sup> . j <sup>-1</sup>	r <sup>2</sup>
Nardaie	(7)	5. 91	0. 97	-	0. 82
Trisète	(7)	5. 98	0. 95	-	0. 43
Poa (haut de pente)	(7) (8)	13. 94 12. 17	0. 96 0. 98	- 0. 98	0. 67 0. 72
Poa (mi pente)	(7) (8)	11. 77 10. 10	0. 96 0. 98	- 0. 98	0. 56 0. 65
Poa bas de pente	(7)	9. 72	0. 98		0. 77
Marais	(7)	16. 5	0. 99		0. 69
Terrassettes	(7)	0. 22	0. 99		0. 85
Rumex	(8)	49. 75	0. 98	0. 93	0. 70

Tableau 9. Valeurs des paramètres des modèles (7) et (8) des différentes situations pastorales.

Chaque jour de la saison pastorale, il est possible à partir de (7) ou (8) de différencier la quantité de bouses déjà déposée de celle qui est apportée et d'estimer ainsi l'effectif de différentes classes d'âge de bouses. Sur cette base, on peut à tout moment distribuer de façon aléatoire les bouses dans l'espace des différentes unités pastorales (figure 21). Le stock de bouses s'avère principalement localisé dans les unités du cône de déjection de fond de vallon, dans les pelouses nitrophiles à rumex et dans la frange marécageuse bordant le cours d'eau. Début septembre par exemple, lorsque la saison pastorale touche à sa fin, il y a environ 5000 bouses déposées sur l'alpage, avec 30% de bouses fraîches (<15 jours), 20% de bouses évoluées (d'âge compris entre 15 et 30 jours) et 50 % de bouses sèches (>1 mois). Ces

évaluations permettent d'estimer<sup>139</sup> que durant la saison pastorale, l'ordre de grandeur du stock total de *E. coli* contenus dans les bouses de l'alpage est d'environ  $10^{14}$  bactéries. Des observations complémentaires montrent en outre que des bouses sont encore présentes bien après la fin du pâturage ; elles persistent même sous le manteau neigeux et peuvent être retrouvées le printemps suivant lors de la fonte des neiges. A ce stade, la matière fécale contient encore des *E. coli*, avec une teneur toujours importante, d'environ  $10^6$  cfu.  $g^{-1}$  et donc très proche de celle des bouses fraîches.

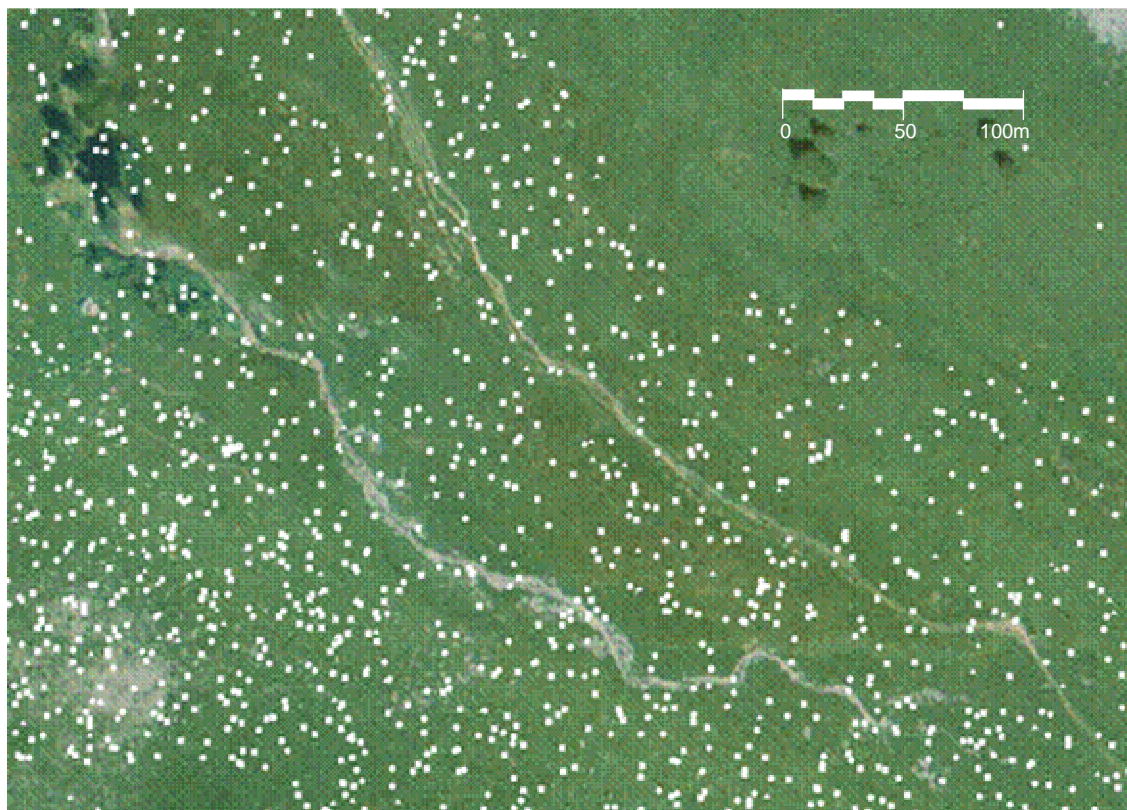


Figure 21. Modèle de répartition de différentes classes de bouses à la mi- saison sur différentes unités pastorales.

(triangles : bouses <15 jours, croix : bouses >15 et <30 jours ; ronds : bouses > 30 jours).

On retiendra 1) que le stock global de bouses est marqué par une assez forte diversité en termes de répartition et de dynamique d'évolution ; 2) que les bouses fraîches sont à l'origine de l'essentiel des bactéries retrouvés dans le ruissellement.

### **6.1.3. Sorties d'eau, de nutriments et de bactéries**

**Physico- chimie des eaux à l'exutoire.** Les eaux sont toutes bicarbonatées calciques (pH= 7. 8 /8. 2) et oligotrophes. A l'exutoire du bassin (tableau 10) ou des sous bassins, en période estivale, les concentrations en nutriments sont faibles pour COD,  $NO_3$  et P, les teneurs MES très peu élevées, et la conductivité peu variable. En hiver et à la fonte des neiges, malgré un nombre beaucoup plus restreint d'échantillons (la pression d'échantillonnage est réduite pour des raisons d'accessibilité du site), les tendances et les ordres de grandeur sont identiques.

<sup>139</sup> Considérant une teneur de  $10^8 g^{-1}$  bactéries pour les bouses fraîches et évoluées et  $10^7. g^{-1}$  bactéries pour les bouses sèches, avec respectivement une matière sèche par bouse de 250, 150 et 50g.

	Cond	NH <sub>4</sub>	NO <sup>3-</sup>	Ptot	Ptot EF	COD	Cl <sup>-</sup>	SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>	MesT
<b>nombre</b>	38	39	38	31	37	40	36	36	30
<b>moyenne</b>	314,0	0,004	0,165	0,005	0,003	1,06	0,54	26,2	0,87
<b>CV (%)</b>	4,6	115,4	42,6	62,3	57,8	31,4	54,2	33,1	90,3
<b>nombre</b>	21	29	21	21	25	29	21	21	17
<b>moyenne</b>	307,8	0,003	0,19	0,006	0,004	0,94	0,88	25,7	1,8
<b>CV (%)</b>	14,7	59,8	50,5	61,0	84,9	27,2	118,5	60,1	113,7

Tableau 10. Vue d'ensemble de la composition chimique à l'exutoire du BV (B1), hors saison pastorale (échantillons ponctuels 2004- 2005).

**Variabilité selon le débit.** La variabilité des concentrations en nutriments n'est que partiellement liée au débit. Les teneurs en MES, en COD et en Ptotal s'accroissent linéairement avec le débit, dans la gamme étudiée, mais restent faibles, même à fort débit (pas de valeur de MES > à 100 mg/l ; Ptotal <0. 30 mg P/l, COD <1. 4 mg/l) et ce quelque soit la période de l'année. Les sulfates sont très dilués en crue. Les formes dissoutes de l'azote NO<sub>3</sub> et NH<sub>4</sub> évoluent saisonnièrement avec une augmentation durant les mois d'été, décrivant ainsi un cycle lié probablement à l'activité biologique générale de sols du bassin. Les teneurs en COD restent basses et relativement stables, autour de 1 mg/l. Les indices d'aromaticité suggèrent qu'il s'agit pour l'essentiel de substances humiques.

Il est possible grâce à des prélèvements en continu d'eau à l'exutoire et d'analyses d'échantillons moyens hebdomadaires proportionnels au débit, de calculer les flux exportés hors périodes hivernales avec une assez bonne précision. Les exportations de nutriments ramenées au bassin topographique s'avèrent très faibles : moins de 0. 1 kg /ha /an pour P-total, et moins de 1 kg pour N- NO<sub>3</sub>. Une estimation complémentaire utilisant les données ponctuelles disponibles en périodes hivernales et de fonte de neige (2005- 2006) permet un calcul à l'échelle annuelle qui confirme les ordres de grandeurs ci dessus.

Durant les périodes de crues, la physicochimie de l'eau nous renseigne sur les compartiments du bassin contribuant à l'écoulement (fig. 22). Durant l'épisode cité en exemple, l'hydrogramme de débit ne présente pas de pic en raison défaut d'enregistrement du à un remaniement des berges ayant amené un dépassement du seuil de mesure. Certaines évolutions sont assez classiques : réduction de la conductivité (entre t=4 et t=6, ce qui permet de situer le pic de crue à t=5), élévation concomitante du Ptotal et des matières en suspension ; réduction des nitrates lors du pic de crue et remontée en phase de retour au régime d'étiage. D'autres comportements semblent assez spécifiques avec notamment l'élévation des nitrates en entrée de crue, ainsi que la chute drastique de NH<sub>4</sub> lors de l'épisode. Ces variations suggèrent :

- avant la crue, un écoulement de base soutenu par le fonctionnement des zones hydromorphes et notamment les marais, d'où la forte teneur en NH<sub>4</sub> ; diluée lors de la crue par les apports d'eaux de ruissellement;

- lors de la montée de crue, un écoulement lié à des flux d'eau provenant probablement d'horizons saturés de la surface des sols des bas fonds et mobilisés par effet piston, comme en témoignerait l'élévation des NO<sub>3</sub> ;

- lors du pic de crue, le développement de lames de ruissellement de surface qui entraînent les matières en suspension et le phosphore, avec une forte dilution des volumes d'eau transitant par le sol ;
- enfin durant la phase de décrue, un écoulement soutenu par la vidange des eaux de subsurface.

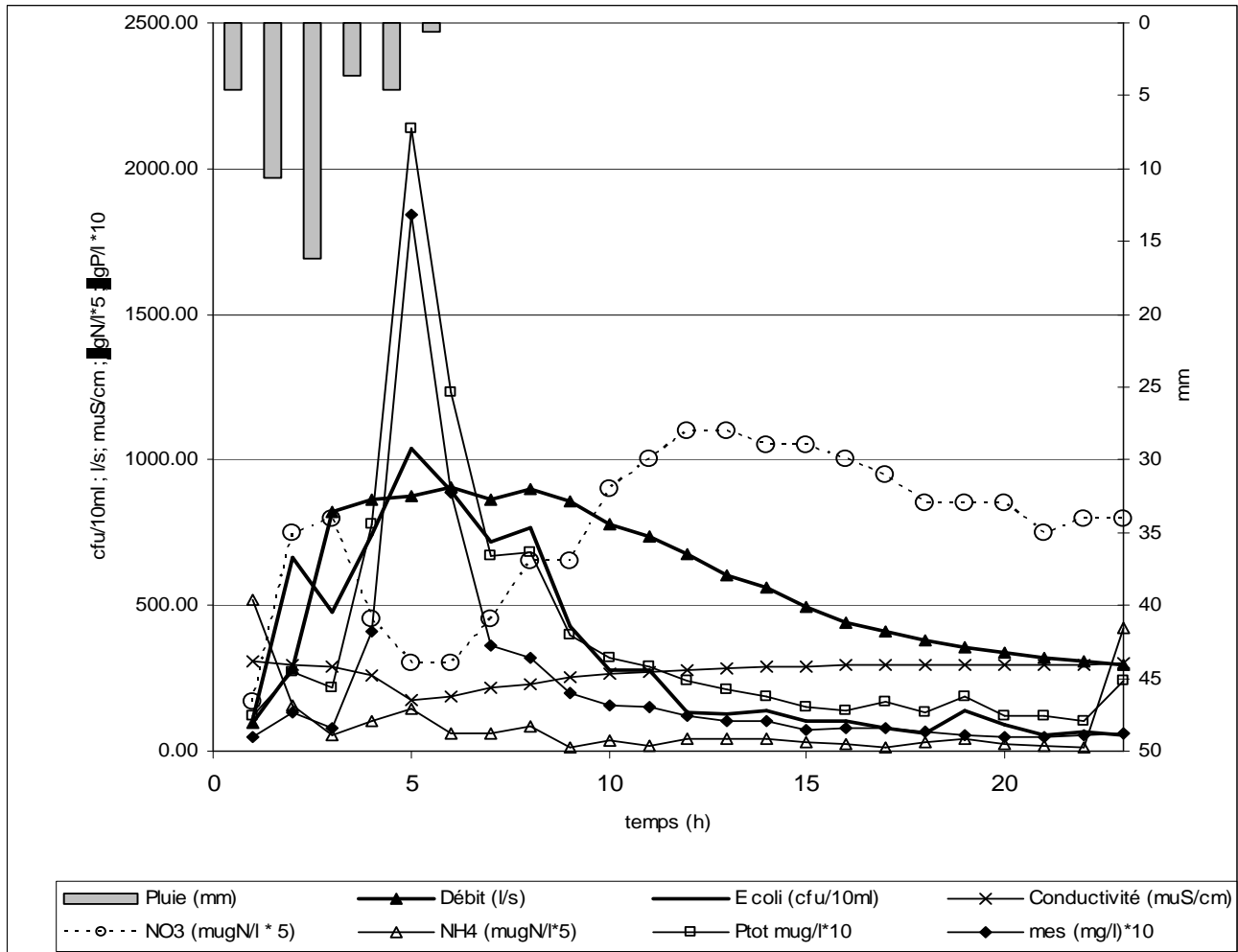


Figure 22. Evolution du débit, de *E.coli*, de la physico- chimie lors d'une crue enregistrée en août 2006.

Dans la phase de montée de crue (figure 22) les teneurs en *E.coli* suivent un petit pic qui pourrait être lié à l'exportation de bactéries des biofilms ou de bouses directement déposées dans la rivière. L'évolution des teneurs en *E.coli* suit ensuite de très près celle du P et des MES, ce qui suggère un transport des bactéries par les lames de ruissellement. Notons que cette élévation caractéristique des teneurs en micro- organismes lors du pic de crue se reproduit de façon systématique pour tous les épisodes où il a été possible de suivre en simultané débit et exportation de micro- organismes .

Les crues modifient donc assez fortement les propriétés physicochimiques de l'eau à l'exutoire, avec des évolutions qui confortent l'hypothèse d'une émergence du ruissellement lié au fonctionnement des sources variables et d'une exportation d'*E.coli* par les lames de ruissellement. En terme de volumes d'eau transférée à l'exutoire, l'écoulement annuel est assez marqué par le régime de fonte des neiges (fig. 23), avec un débit journalier durant le

mois de mai évalué en 2006 à près de 300 à 350 L. s<sup>-1</sup>, ce qui correspond cependant à un ordre de grandeur inférieur aux pics des crues estivales.

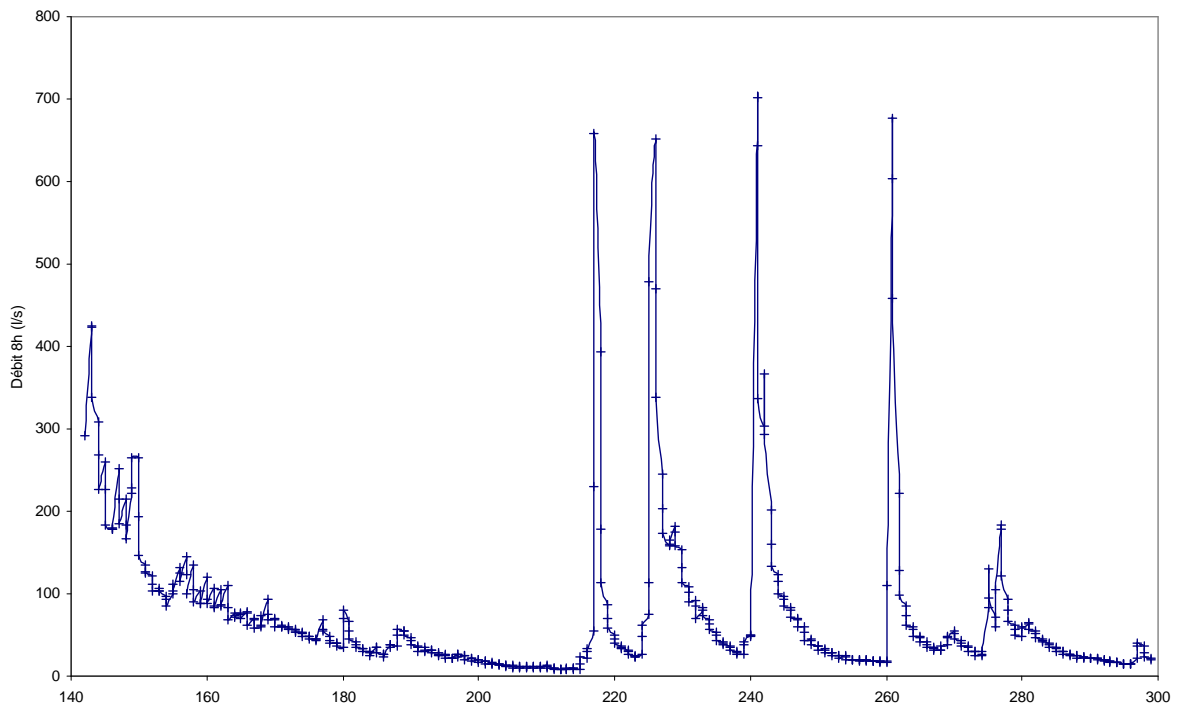


Figure 23. Débit 8 heures enregistré en 2006 (en abscisse jours julien, ordonnée débit L/s ).

**Qualité microbiologique à l'exutoire.** Durant la fonte des neiges (mai- juin), avant l'arrivée du troupeau et très rapidement après le départ des animaux (à partir d'octobre), la concentration bactérienne de l'eau de l'exutoire reste faible (fig. 24). La présence du troupeau influence fortement la qualité microbiologique de l'exutoire, avec un retour à l'état initial très rapide dès que ce dernier a quitté l'alpage.

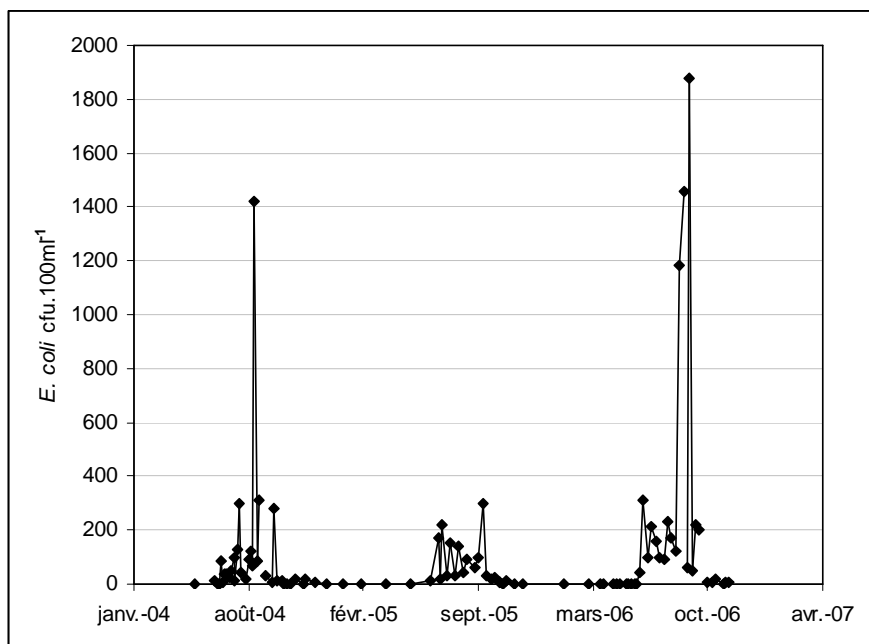


Figure 24. Concentrations en *E. coli* (prélèvements manuels) à l'exutoire du bassin versant.

Lors de la saison pastorale, les teneurs des périodes d'étiage oscillent entre plusieurs unités à 20- 30 cfu/ml, alors que durant les crues, elles sont d'un ordre de grandeur 100 fois supérieur. L'essentiel du flux bactérien est exporté durant les crues (fig. 25).

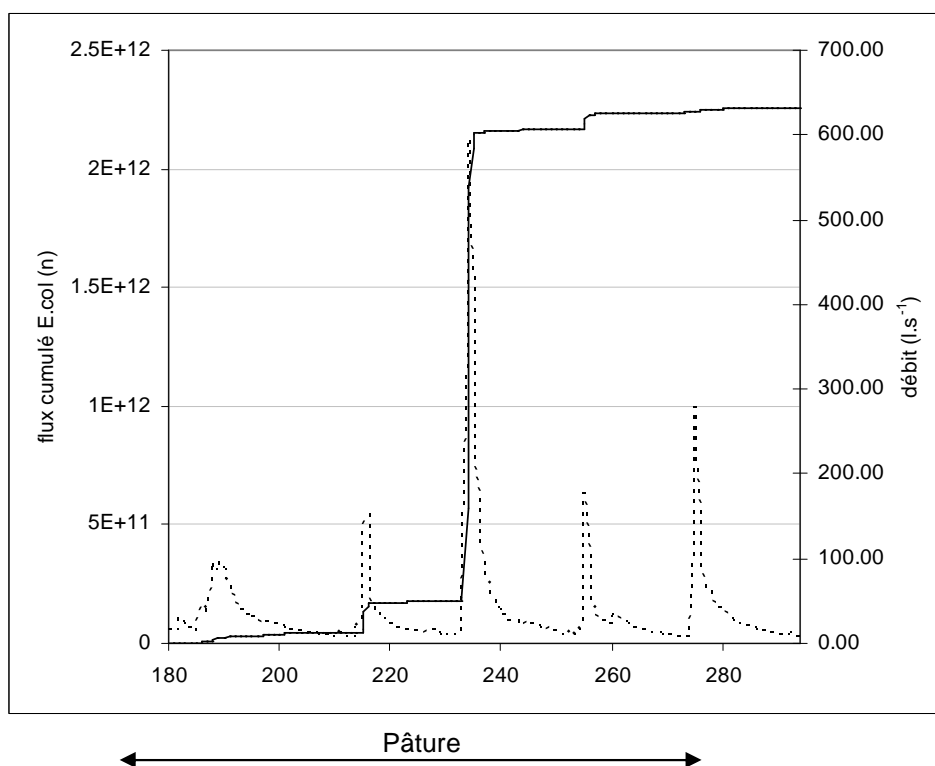


Figure 25. Débit (en pointillés) et flux cumulés d' *E. coli* (en traits pleins) à l'exutoire du bassin versant en fonction de la date (jour julien) pendant la saison pastorale.

En 2005, quatre averses majeures surviennent durant la saison pastorale ; elles sont responsables de plus de 97% du flux total de la période suivie ce qui, compte tenu des faibles teneurs de la période de fin d'automne - fonte des neiges, peut être assimilé au flux total annuel. Ceci montre l'importance des phénomènes de crue et notamment l'intérêt d'analyser les relations existant entre transferts de bactéries et ruissellements, durant la période pastorale. L'analyse des variations des teneurs en période d'étiage fournit néanmoins des informations intéressantes révélant l'existence d'autres modalités différentes de transfert bactérien (fig. 26)

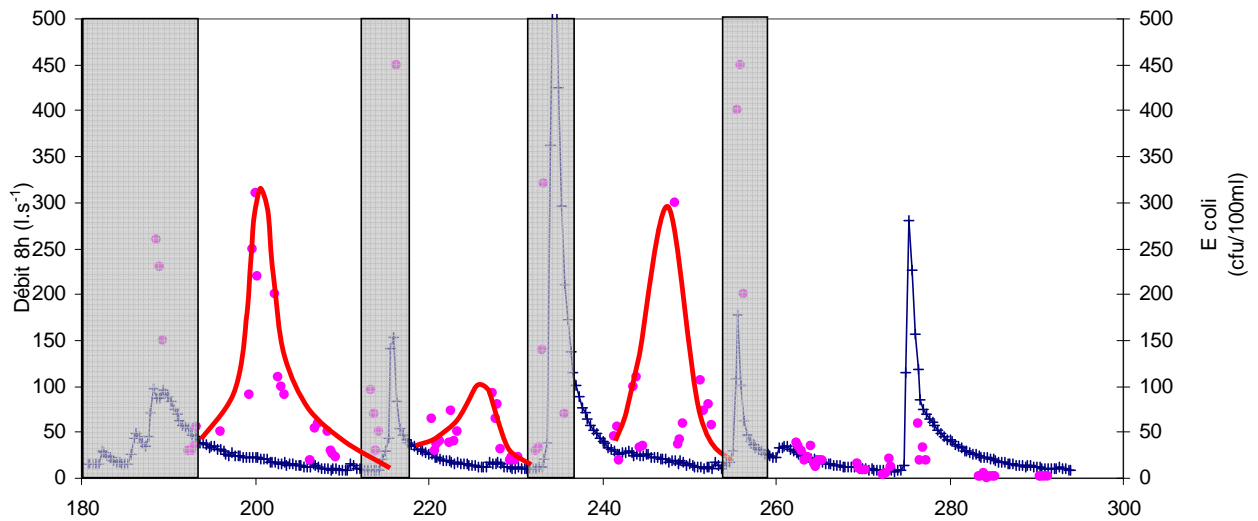


Figure 26. Teneurs en *E. coli* (prélèvements automatiques) durant les périodes inter- crues en fonction de la date (jour julien). En grisé, périodes de ruissellement. Traits fins : débit ; trait plein ajustement sur données *E. coli*. L'échelle des teneurs en *E. coli* est tronquée à 500 cfu. 100ml<sup>-1</sup> ; la valeur maximale enregistrée est de 5600 cfu. 100ml<sup>-1</sup>.

Durant les inter- crues on observe une élévation des teneurs en *E. coli*, lorsque le troupeau est présent sur l'alpage. Cette élévation peut être mise en relation avec un transfert profond des bactéries fécales, véhiculées dans des nappes transitant probablement au travers de matériaux fissurés. Le pic inter- crue survient entre 10 et 14 jours après la crue, délai assez constant d'un épisode à l'autre, qu'il faut sans doute mettre en relation avec le temps nécessaire pour que l'écoulement de l'aquifère profond arrive à l'exutoire. Une fois le troupeau parti, ce fonctionnement n'est plus observé (au- delà du jour 250). Des suivis journaliers montrent en outre des variations aléatoires des teneurs en bactéries, qui sont probablement liées à des entrées directes de bouses dans le cours d'eau. Les teneurs demeurent faibles entre quelques cellules à 20- 30 cfu.ml<sup>-1</sup>.

**Bilan entrées sorties.** Un essai de bilan entrées- sorties de *E.coli* durant les crues de l'année 2005 est donné au tableau 11. C'est une fraction minimale des stocks associés aux déjections qui est exportée lors des crues étudiées, de l'ordre de 1 à 10 %.

Date (jours Julien)	Entrées : stocks de <i>E. coli</i> déposés sur l'alpage	Flux exporté par la crue	% exporté
188	6. 2E+13	1. 6E+10	0. 26
215	6. 5E+13	8. 3E+10	1. 27
234	6. 2E+13	3. 9E+11	6. 22
255	6. 1E+13	5. 5E+10	0. 90

Tableau 11. Bilan entrées/sortie.

L'ensemble des informations obtenues sur l'évolution de la qualité microbiologique à l'exutoire en relation avec les déjections déposées par les troupeaux, laisse en suspens toute une série de questions:

- Quels sont les phénomènes impliqués dans le transfert des bactéries par ruissellement ?
- Quel est le devenir des bactéries qui ne sont pas exportées ? Sont-elles capables de survivre ? A quel niveau et dans quelles circonstances ? Quelles en sont les conséquences en termes d'adaptation et de potentiel indicateur et pathogène ?
- Quelles circulations d'eau profondes sont responsables des exportations de bactéries durant les périodes inter-cruées ? A partir de quelle espace sensible de telles contaminations peuvent elles être générées ?

L'étude des stocks et la modélisation fournissent une première réponse à ces questions.

## **6.2. Stocks: persistance de formes cultivables de *Escherichia coli* dans les divers sols types de la zone pastorale**

### **6.2.1. Persistance de *E. coli* dans les couches superficielles des sols (0- 5cm )**

L'étude porte tout d'abord sur des échantillons non directement et récemment contaminés. Il s'agit d'un suivi synchronique du contenu en *E. coli* des couches de surface des sols (0- 5 cm) sur la base de prélèvements effectués loin de toute déjection ou résidu de déjection visible (échantillon « aval » de la fig. 11). Les résultats obtenus mettent en évidence un phénomène inattendu: *E. coli* existe et persiste à un niveau significatif et relativement constant (autour de  $10^4 \text{ g}^{-1} \text{ MS}$ ) dans tous les échantillons, indépendamment du type de milieu et en l'absence de contamination directe et récente (figure 27).

Le stock est assez important ( $10^8 \text{ E. coli} / \text{m}^2$ ). Les données enregistrées pendant l'hiver (prélèvement sous une couverture neigeuse de 1.5 à 2 m en janvier 2006) et avant l'arrivée des troupeaux (mai 2006) confirme ce phénomène inattendu : l'hiver n'élimine pas *E. coli* qui persiste dans ces couches de surface de sol.



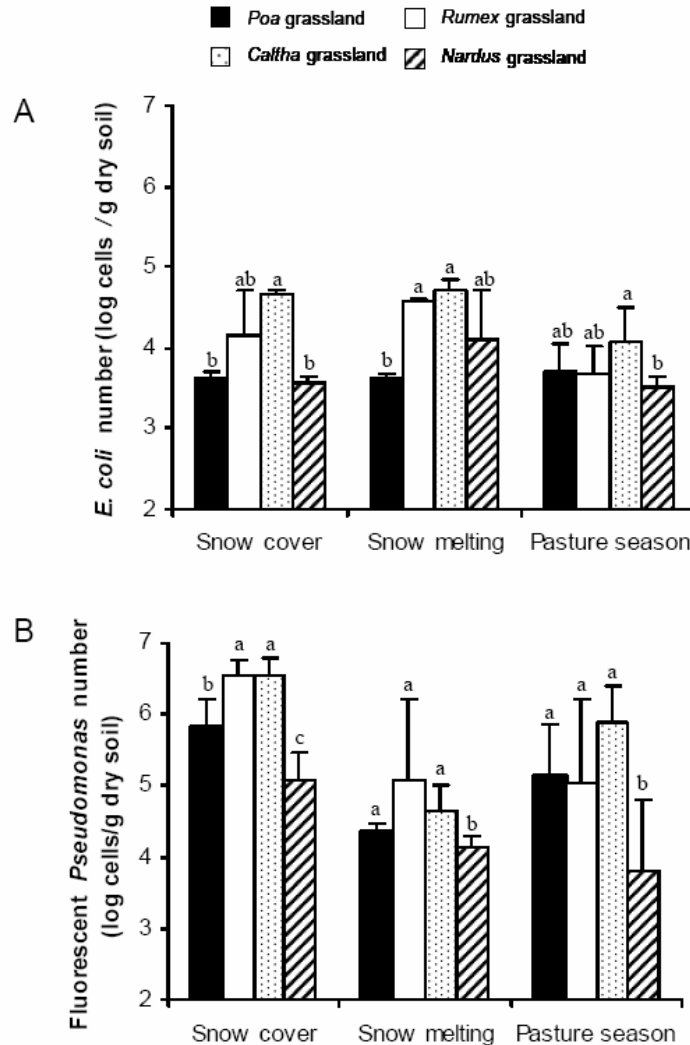


Figure 27. Suivi synchronique. Concentration en *E. coli* et *Pseudomonas* fluorescents dans les couches superficielles du sol.

(a et b indiquent des classes de valeurs significativement différentes selon ANOVA ; n=75).

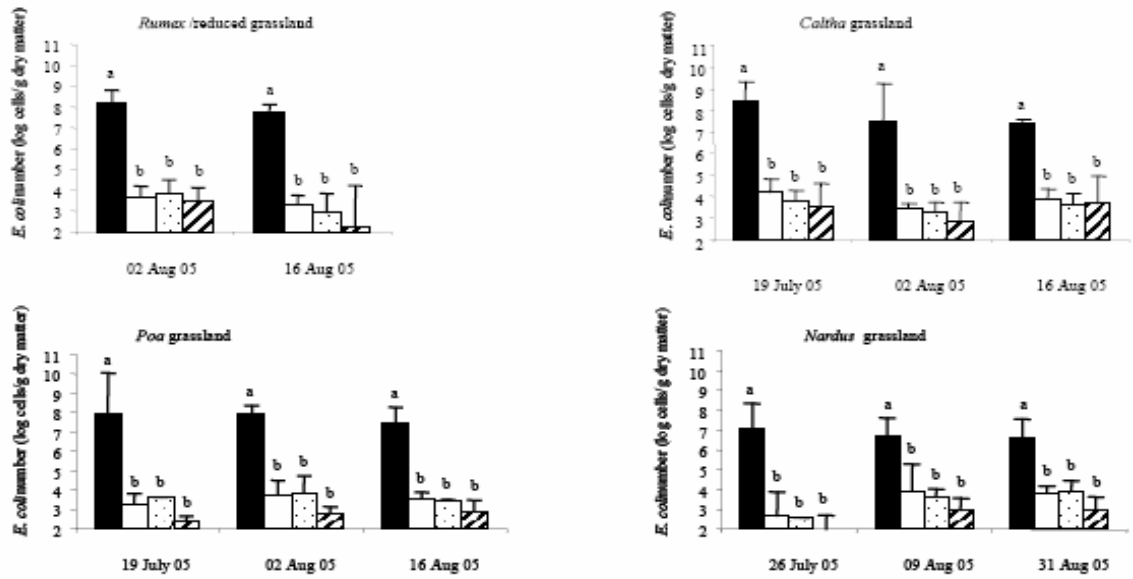
Dans le détail, pendant la saison pastorale il existe une certaine variabilité de la teneur moyenne en *E. coli* avec le temps et selon le faciès pastoral (tableau 3), mais sans lien évident avec le niveau de déjection enregistré dans les stations. Ainsi, *E. coli* est constant dans le sol de gazon à Pâturin, tandis qu'une légère et significative décroissance (de 0.5 à 1 log unit) peut être observée pour la Nardaie, la prairie à Rumex et le faciès de bas marais à *Caltha*. Ces deux derniers faciès offrent toujours le contenu le plus élevé en *E. coli* ( $5 \times 10^4$  à  $10^5$  cfu g<sup>-1</sup> MS contre un nombre significativement plus bas pour le gazon à Poa et la Nardaie,  $3 \times 10^3$  à  $10^4$  cfu g<sup>-1</sup> MS). A noter que le bas marais, bien que présentant d'après nos mesures la plus faible entrée de déjections, héberge toujours les populations les plus abondantes de *E. coli* cultivables ce qui attire l'attention sur le rôle du facteur « eau ». De tels niveaux de populations cultivables ne s'observent pas dans les secteurs non pâturés (pentes, accès difficiles) : 45% des échantillons de sol récoltés présentent seulement de  $10^3$  à  $10^2$  cfu g<sup>-1</sup> MS ; l'autre fraction d'échantillons ne montrant pas d'*E. coli* cultivable.

Les *Pseudomonas* fluorescents offrent un comportement bien différent, plus typique de bactéries telluriques. Les teneurs moyennes sont plus élevées, s'étalent entre  $10^4$  et  $5 \times 10^6$  cfu  $g^{-1}$ MS (fig. 27) et surtout fluctuent plus nettement, les plus basses teneurs s'observant à la fonte des neiges. Globalement la Nardaie (sol pauvre) présente la teneur la moins élevée.

#### **6.2.2. Persistance de *E. coli* cultivable dans les couches de sub- surface du sol (5- 25cm)**

Durant les 2 saisons du suivi (en 2005, un échantillon par 15 jours ; en 2006 un par mois) la teneur en *E. coli* des déjections est toujours largement supérieure à celle de la surface du sol et de la sub- surface (qui ne dépassent pas  $10^4$  CFU  $g^{-1}$  MS) quelque soit la station considérée (fig. 28 et 29).

A



B

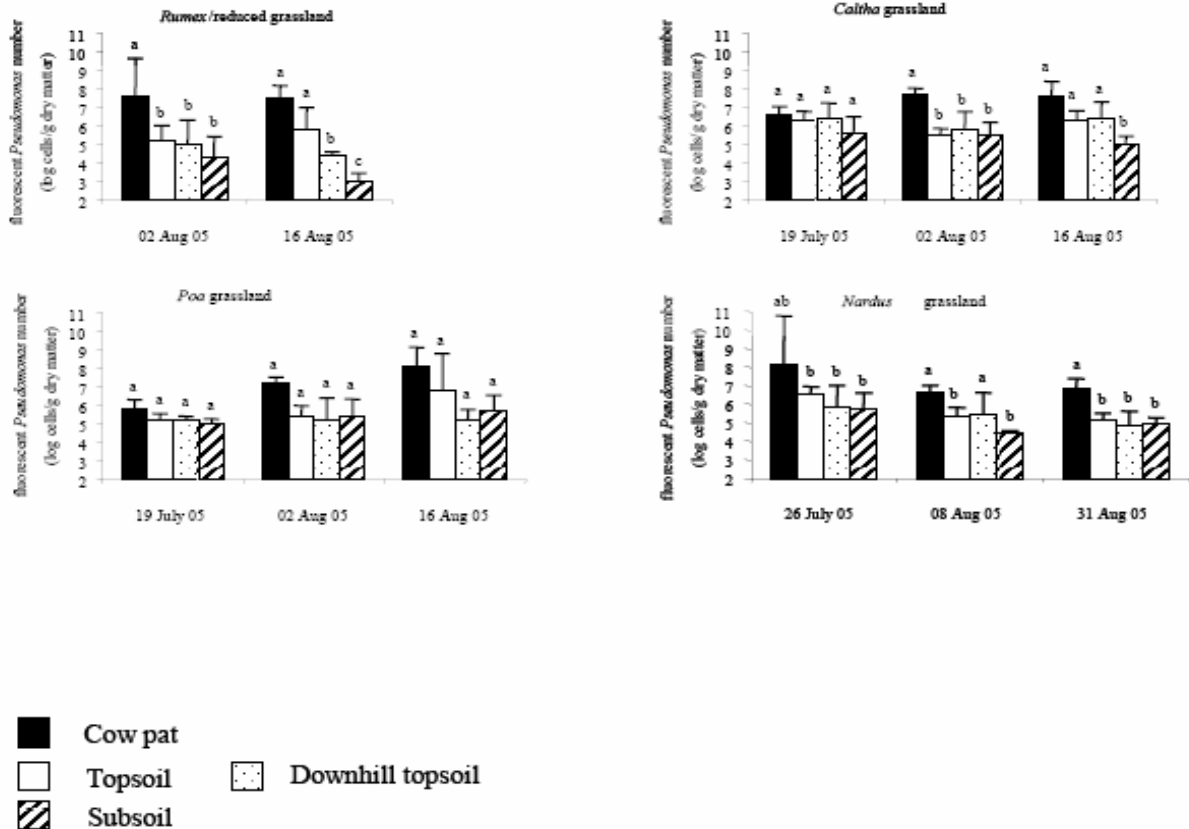
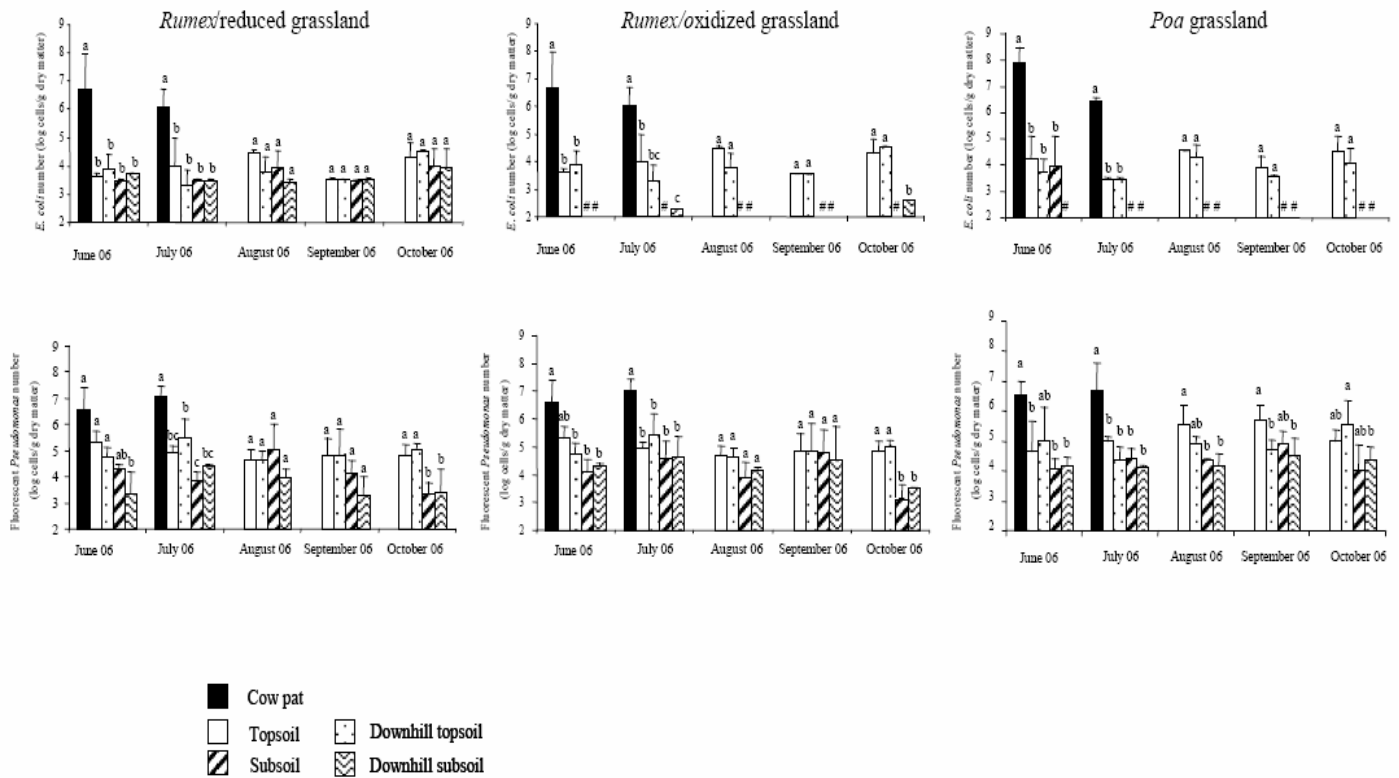


Figure 28. Suivi diachronique 2005 montrant l'évolution des teneurs en *E. coli* (A) et *Pseudomonas* fluorescents (B) (a et b indiquent des classes de valeurs significativement différentes selon ANOVA ; n=75) (localisation des prélèvements, voir fig 11 ; typologie des faciès voir tableau 3)..



**Figure 29. Suivi diachronique 2006, montrant l'évolution des teneurs en *E. coli* (ligne du haut) et *Pseudomonas* fluorescents (bas)**  
(a et b indiquent des classes de valeurs significativement différentes selon ANOVA ; n=75)  
(localisation des prélèvements, voir fig 11 ; typologie des faciès voir tableau 3).

Les enregistrements réalisés dans les couches plus profondes du sol (5- 25cm) révèlent une variabilité bien plus grande que celle de la surface pour *E. coli*. Deux types de comportements sont observés et peuvent être mis en relation avec la dynamique de l'eau dans le sol.

- (1) Dans un premier cas, la sub- surface présente des teneurs basses ( $10^2$  cfu  $g^{-1}$  de sol sec) ou non détectables de *E. coli*. Le faciès à Rumex /ox est un cas typique de cette dynamique (fig 29). Ceci s'observe aussi pour le gazon à *Poa*, notamment en fin de saison, après le départ des bovins. Dans ce faciès, une teneur forte de  $10^4$  CFU  $g^{-1}$ .sol sec est toutefois observée, sous une bouse très récente. Cette situation de basses teneurs correspond à deux types de faciès résultant de fortes entrées (tableau 3) de déjections mais présentant des états pédologiques radicalement différents avec d'une part, un sol calcique (pH 7.8) caillouteux et particulièrement drainant (*Paturin*, voir fig 9) et d'autre part, un sol acide (pH 4.8) (*Rumex ox*, voir fig 6), riche en  $Al^{3+}$  ( $1.46$  cmol  $kg^{-1}$ ). La persistance limitée ou l'absence chronique de *E. coli* dans ces faciès peut être comprise en se référant aux travaux de Oliver et

al., (2005b) et Guida *et al.*, (1991)<sup>140</sup> comme une conséquence, soit de conditions trophiques défavorables (sol acide, rumex /ox), soit de conditions favorables au transfert vers les couches profondes voire la zone saturée (sol drainant, gazon). Dans ces horizons de subsurface correspondant à des « **milieux ouverts** » où l'eau ne stagne pas de façon permanente, les conditions trophiques et les physico- chimiques ne semblent donc pas favorables au maintien des populations fécales.

- (2) Dans un second cas (*Rumex/sol réduit*) le niveau de *E. coli* en subsurface reste élevé (de  $10^3$  and  $10^4$  CFUg<sup>-1</sup>sol sec) et assez constant indépendamment du temps et de la présence des troupeaux. Il s'agit d'un faciès correspondant à des conditions de sols non drainantes et peu oxygénées (*pélosol, tab. 1*) mais non acides, riches en eau, argiles (59%) et matières organiques (43 g kg<sup>-1</sup>), ce qui au total peut s'interpréter comme des conditions relativement favorables à la survie d'*E.coli*<sup>141,142</sup>. Ce comportement semble être typique du fonctionnement des **milieux confinés** où les faibles vitesses de circulation d'eau et l'importance des ressources nutritives sont favorables au maintien de populations d'*E. coli*.

Les différences des niveaux de contamination mentionnées qualitativement ci- dessus sont testées selon un protocole MANOVA portant sur l'ensemble des échantillons analysés. Ce test confirme notamment que les teneurs en *E. coli* sont similaires sous gazon et Rumex/ox et significativement différentes de celles sous rumex/réduit ( $P = 0.0002$ ), et que les différences entre couches de sols sont significatives ( $P < 0.0001$ ). Ce test porte sur 20 échantillons supplémentaires collectés en 2006 pour différencier les 2 variantes de sols sous à Rumex.

Le comportement de *Pseudomonas fluorescents* est différent. Les teneurs sont toujours élevées (de  $10^5$  and  $10^6$  cfu g<sup>-1</sup> sol sec) y compris de façon inattendue dans les bouses (jusqu'à  $10^8$  cfu g<sup>-1</sup> MS, Figure 18). Les variations selon les types de sols et la profondeur d'échantillonnage sont significatives (effet faciès pastoral significatif MANOVA  $P = 0.002$ ; effet couche de sol hautement significatif ;  $P < 0.0001$ ).

### **6.2.3 Analyse par clonage- séquençage de la diversité de souches cultivées de *E. coli***

Une première évaluation de la diversité repose sur l'étude des séquences partielles de *uidA* (166 bp) pour des *E.coli* prélevés dans des bouses (n=10) et les sols (n=28) correspondant à 2 faciès pastoraux (gazon à *Paturin* et prairie nitrophile à *Rumex réduit*). L'arbre phylogénétique (figure 30) obtenu à partir de ces séquences, met en évidence deux groupes principaux d'*E. coli* significativement différents (valeurs de bootstrap >60%).

Le premier cluster de séquences se retrouve dans tous les types d'échantillons (déjections ou sols) à l'exception notable de l'échantillon de subsurface du faciès confiné (*Rumex, réduit*). Cette séquence est répertoriée dans GenBank database (séquences retrouvée chez *E. coli* K- 12, *E. coli* O157 : H7, des souches humaines pathogènes et dans des

---

<sup>140</sup> Oliver D. M., L. Heathwaite, P. M. Haygarth, and C. D. Clegg. 2005. Transfer of *Escherichia coli* to water from drained and undrained grassland after grazing. *J. Environ. Qual.* 34:918- 925.

Guida L., Z. Saidi, M. N. Hughes, and R. K. Poole. 1991. Aluminum toxicity and binding to *Escherichia coli*. *Arch. Microbiol.* 156:507- 512.

<sup>141</sup> England L. S., H. Lee, and J. T. Trevors, 2003. Bacterial survival in soil: effect of clays and protozoa. *Soil Biol. Biochem.* 25: 525- 531.

<sup>142</sup> Recorbet G., A. Richaume, and L. Jocteur- Monrozier, 1995. Distribution of a genetically engineered *Escherichia coli* population introduced into soil. *Lett. Appl. Microbiol.* 21: 38- 40.

échantillons d'eau<sup>143</sup>). Le second groupe contient seulement des séquences propres à nos échantillons environnementaux et notamment celles provenant du sous- sol « confiné » du faciès à *Rumex*.

Cette première approche de la diversité des populations fécales est partielle dans la mesure où un nombre assez restreint de souches a été analysé. La connaissance de la diversité des populations d'*E. coli* est renforcée par le test portant une activité enzymatique d'*E. coli* et par analyse sous DGGE du marqueur *uidA*.



Figure 30. Analyse phylogénétique de séquences partielles d'*uidA*.

#### 6.2.4. Analyse d'activités enzymatiques

Les tests portent sur la dynamique enzymatique de ma  $\beta$ - D glucuronidase. Après différentes optimisations préalables nous avons pu calculer les coefficients k d'adsorption du MUF sur les particules de sol et R de rendement de l'assimilation du MUG dans les

<sup>143</sup> Farnleitner A. H., N. Kreuzinger, G. G. Kavka, S. Grillenberger, J. Rath, and R. L. Mach, 2000. Simultaneous detection and differentiation of Escherichia coli populations from environmental freshwaters by means of sequence variation in a fragment of the  $\beta$ - D glucuronidase gene. Appl. Environ. Microbiol. 66: 1340- 1346.

populations bactériennes Non Target NT et d'*E. coli*. Pour diminuer le nombre de degrés de liberté du modèle, on a fixé  $k$  à  $0.01\text{min}^{-1}$  dans le cas des bouses et à  $0.1\text{min}^{-1}$  pour les sols. Les valeurs de  $R_{ECol}$  et  $R_{NT}$  sont fixées à 0.9. Avec ces contraintes, l'optimisation aboutit à des résultats très satisfaisants, puisque les  $r^2$ , entre titre de MUF observé et calculé, sont compris entre 0.95 et 0.999 (fig. 31)

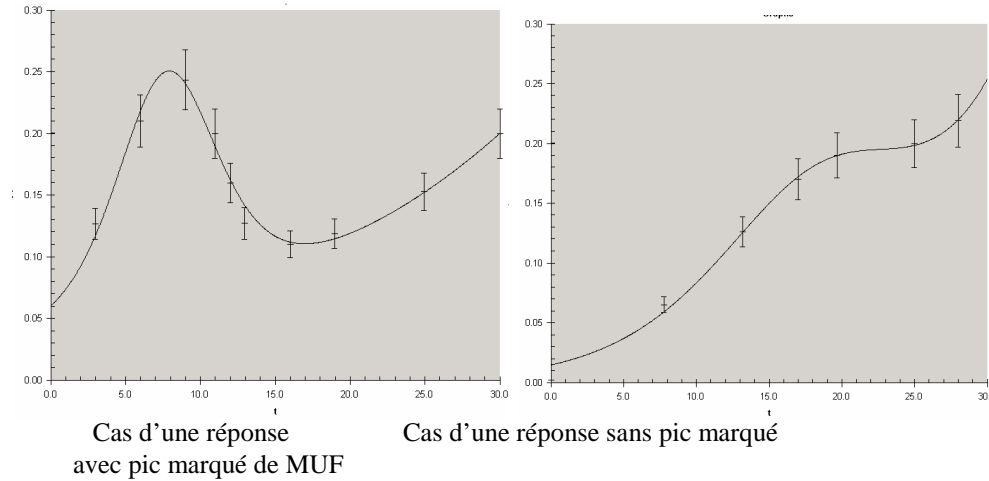


Figure 31. Evolution du MUF en fonction du temps.

Les ajustements du modèle ont permis de calculer les différents paramètres de la cinétique enzymatique. On a analysé la différence  $\text{diff}_a$  de taux d'absorption du MUG par les deux populations bactériennes :

$$\text{diff}_a = a_{Ecol} - a_{NT} \quad \text{Équation 12}$$

$\text{Diff}_a$  est corrélé e(fig. 32) avec le % de bactéries NT :

$$\%NT = \frac{NT_0}{NT_0 + ECol_0} \cdot 100 \quad \text{Équation 13}$$

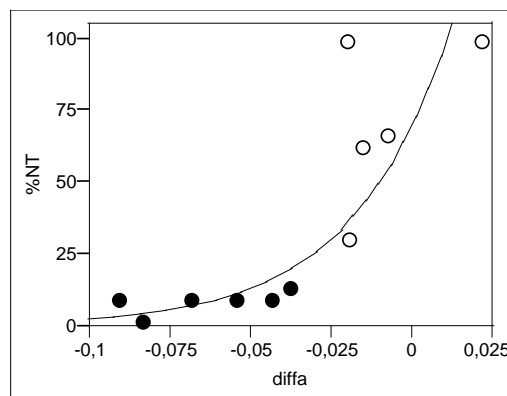


Figure 32. Relation %NT-  $\text{diff}_a$ .

Ronds pleins : courbes à pic ; ronds vides : courbes sans pic.

Quand les deux types de population ont des taux d'utilisation équivalents ( $\text{diff}_a$  proche de 0), la population de NT est très forte : elle représente 50 à 99% de l'effectif initial de bactéries impliquées dans la dégradation du MUG. Lorsque les taux d'utilisation sont très différents (courbes à pic), les NT sont très faiblement représentés. Ces différences de taux d'utilisation du substrat sont probablement liées à des natures différentes d'enzyme (fig. 33)

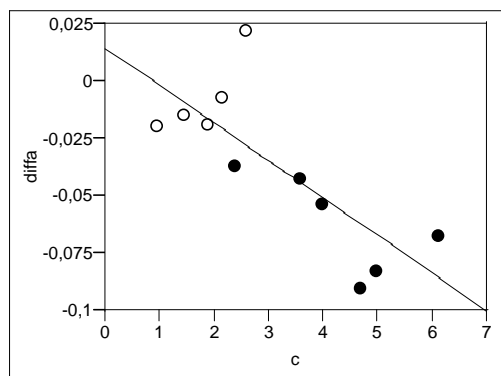


Figure 33. Relation existant entre différences d'utilisation du substrat ( $\text{diff}_a$ ) et taux de dénaturation  $c$  de l'enzyme.

Les courbes à pic correspondent aux situations où le % de NT est faible par rapport à la population totale et où les populations NT et ECol sont dissemblables en termes de taux d'utilisation du substrat et de dénaturation de l'enzyme : c'est le cas des bouses et des échantillons sous gazon, après 1 mois sous bouses. Dans ces situations NT est physiologiquement très éloigné d'*E. coli* et fortement déprimé dans les conditions expérimentales. NT correspondrait ici à des micro-organismes autres que *E. coli*.

Les courbes convexes sont relevées dans les situations où le % de NT est fort par rapport à la population totale (en début de saison ou sous le rumex peu filtrant) ; l'activité de ces bactéries est voisine de celle d'*E. coli* ( $a_{Ecol}$  et  $a_{NT}$  semblables) ; elles sont moins réprimées que dans les types à pic. Physiologiquement NT et *E. coli* sont assez proches et NT correspondraient à des *E. coli* VBNC ; NT proviendraient de contaminations fécales antérieures avec une évolution des propriétés physiologiques d'*E. coli*.

Ces résultats suggèrent que les populations bactériennes des sols filtrants présentent des propriétés physiologiques voisines de celles des bouses (aux effectifs  $E_{Col_0}$  près) ; elles diffèrent par contre dans le cas des sols non filtrants, milieux favorables au confinement, à l'adaptation d'*E. coli* et à l'établissement d'un cortège de VBNC. Ces hypothèses sont confortées par l'approche moléculaire portant sur la structure des populations d'*E. coli*.

## **6.2 Structure des populations d'*E. coli* dans les différents compartiments du bassin versant.**

La structure des populations naturelles d'*E. coli* présentes dans les différents compartiments du bassin versant, i.e. les bouses (entrées), les sols et l'eau à l'exutoire (sortie) est comparée par DGGE sur le gène de fonction *uidA*. Globalement, plus de 20 empreintes moléculaires différentes constituées de 1 à 15 bandes DGGE sont observés, 8 bandes (B à I) existant sur la plupart des profils et représentant des populations ubiquistes (Figure 34).



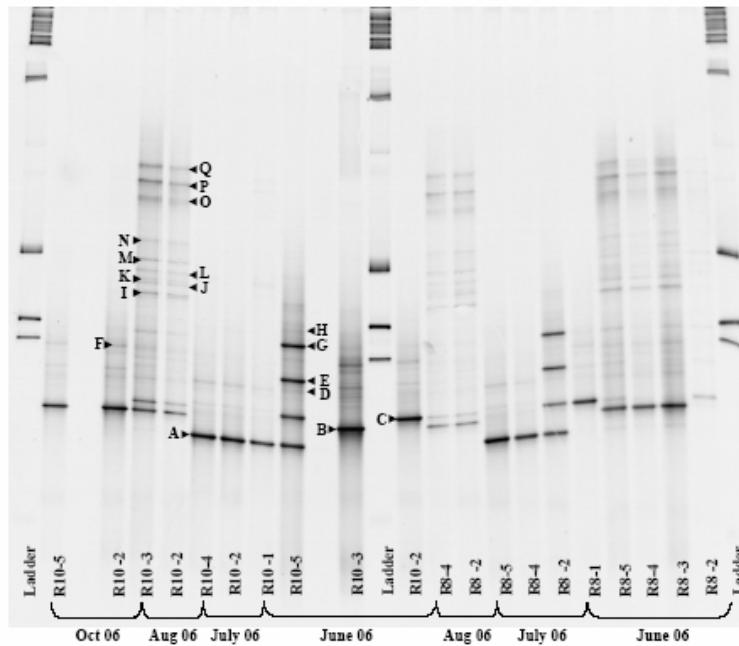
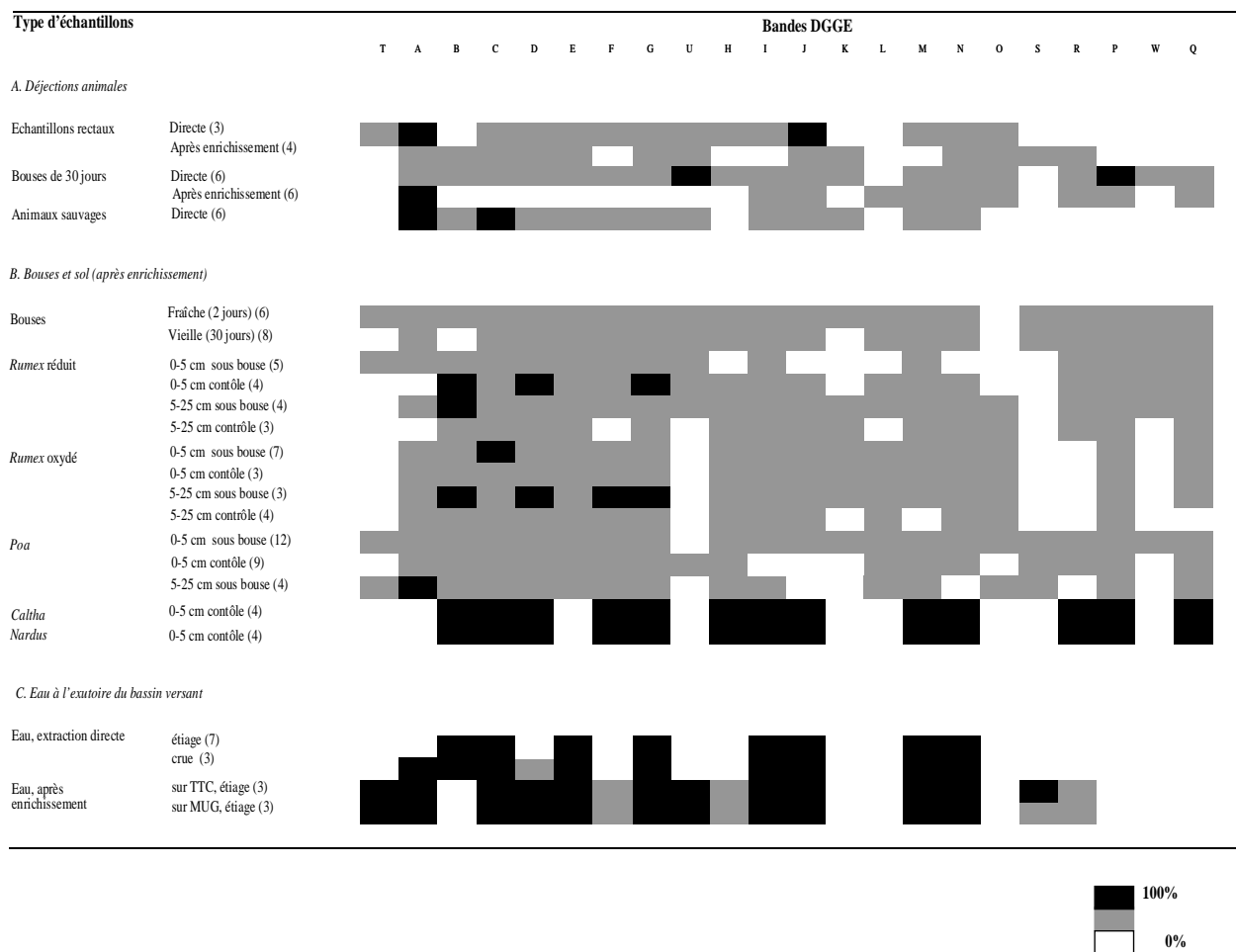


Figure 34. Exemple d'empreintes moléculaires DGGE- *uidA* observées dans des échantillons de bouse et de sols sous *Rumex*. R10- 1 correspond à un échantillon prélevé dans une bouse, R10- 2 et R10- 3, dans du sol sous cette même bouse à une profondeur de 0- 5 cm et 5- 25 cm, respectivement et R10- 4 et R10- 5 dans du sol en amont de cette bouse (contrôle) à 0- 5 cm et 5- 25 cm de profondeur, respectivement. Une lettre a été assignée à chaque bande en fonction de son pourcentage en G- C%.

**Sols et déjections.** Les populations d'*E.coli* les plus complexes s'observent dans les échantillons de sol sous *Rumex* (environ 12 bandes par empreinte) et celles de plus faible diversité, dans le sol de surface sous *Paturin* (environ 3 bandes par empreinte). La comparaison des profils DGGE (présence/absence de bandes) met en évidence l'existence d'une forte diversité des populations naturelles d'*E. coli* au sein de l'alpage puisque 22 bandes DGGE différentes ont été retrouvées (Tableau 12). Compte tenu des travaux préalables<sup>144</sup> qui ont mis en évidence une sensibilité similaire des techniques DGGE *uidA* (basées sur l'étude du polymorphisme de *uidA*) et BOX- PCR (tenant compte du polymorphisme de différentes régions du génome), on peut suggérer l'existence, au sein de l'alpage de Bise, de 22 haplotypes ou clones différents d'*E.coli* dont on peut suivre la distribution dans les différents compartiments du bassin .

<sup>144</sup> Sigler, V. & L. Pasutti, 2006. Evaluation of denaturing gradient gel electrophoresis to differentiate *Escherichia coli* populations in secondary environments. *Environmental Microbiology* 8: 1703- 1711.



**Tableau 12. Distribution des bandes DGGE trouvées dans les bouses, les sols et l'eau.**  
 Les bandes toujours absentes des échantillons considérés sont en blanc, celles toujours présentes en noir.

L'ensemble de cette diversité est présente dans les fèces bovins puisque ces 22 haplotypes sont retrouvés dans les bouses, qu'elles soient fraîches ou vieilles (deux haplotypes - L et S- devant correspondre à des populations mineures puisqu'elles ne sont visibles que lorsque les échantillons sont enrichis). En ce qui concerne les populations d'*E.coli* pathogènes, la diversité s'avère également importante puisque le pulsotypage de 75 isolats STEC génère 8 profils différents (notés de C1 à C8), appartenant à 6 sérotypes différents. Comme rapporté par d'autres auteurs<sup>145</sup>, les populations fécales d'*E.coli* présentent donc une forte diversité. L'identification des sources potentielles de contamination fécale des eaux nécessite donc des méthodes moléculaires permettant de tenir compte de cette diversité.

<sup>145</sup> McLellan, S. L., A. D. Daniels & A. K. Salmore, (2003) Genetic characterization of *Escherichia coli* populations from host sources of fecal pollution by using DNA fingerprinting. *Appl. Environ. Microbiol.* 69: 2587- 2594.

Une perte de diversité des populations fécales cultivables est observée au cours du vieillissement des bouses. La comparaison des profils DGGE avant et après enrichissement met en évidence que cette perte de diversité pourrait être liée à l'entrée de certaines sous-populations (A à H, K, U, et W) dans un état non cultivable plutôt qu'à leur totale disparition lors de leur exposition aux conditions environnementales rencontrées sur l'alpage.

Ces 22 haplotypes sont retrouvés dans les sols. Ce résultat suggère que les bouses sont la principale source de diversité des *E. coli* dans les sols. L'existence de transferts verticaux d'*E. coli* des bouses vers le sol sous-jacent est révélée par l'examen de la distribution de l'haplotype T. En effet, cet haplotype est absent de tous les échantillons provenant de sols localisés en amont, loin d'une déjection. Il n'est présent que dans les échantillons de surface prélevés sous une bouse et, en profondeur, que dans un sol drainant (*Pâturin*) suggérant son transfert vertical par infiltration. Le séquençage du fragment *uidA* correspondant montre que cet haplotype est phylogénétiquement proche d'*E. coli* pathogène de sérotype O157 : H7. La comparaison des pulsotypes des 75 isolats de STEC confirme également l'hypothèse du transfert des *E. coli* de la matière fécale au sol, jusqu'à une profondeur d'au moins 20 cm, puisque des isolats présentant un même pulsotype sont retrouvés à une même date dans les fèces et le sol sous-jacent (Figure 35).



Figure 35. Comparaison des profils PFGE de STEC isolés dans des fèces (F) et du sol sous-jacent à cette bouse (à S : [0- 5 cm] et S' : [5- 20 cm] de profondeur) à différents temps d'échantillonnage. Deux systèmes bouse/sol (l'un représenté en noir, l'autre en gris) ont été suivis dans l'unité pastorale *Poa*.

L'analyse de la distribution des bandes DGGE met également en évidence une stabilité et identité de la structure des populations naturelles d'*E. coli* présentes dans les sols de deux zones peu pâturées telles que la Nardaie et la zone de marais. Ces deux zones correspondent à des sols avec des propriétés physico- chimiques (teneurs en matières organiques, en argiles, pH,...) et d'hydromorphie très différentes. Ces résultats montrent que ces facteurs abiotiques

n'influencent pas la structure des populations d'*E.coli* dans les sols. Ils soulignent l'existence de mécanismes de sélection de populations (B à D, F, G, I à K, M, N, R et P) adaptées à l'environnement tellurique que l'on peut désigner sous le terme de populations naturalisées. Certains de ces haplotypes (B à D, F, G) sont également fréquemment retrouvés dans le *Rumex*.

**Dans l'eau**, la structure des populations d'*E.coli* est également particulièrement stable, quelque soit le régime hydrique de la rivière ou la période d'échantillonnage au cours de la saison pastorale, alors que des variations importantes des effectifs en *E.coli* sont observées. Il s'agit de populations (D à C, E, G, I, J, M, N) qui, pour la plupart, existent également dans les sols non confinés. La comparaison des profils DGGE par regroupement (*clustering analysis*, qui tient compte à la fois de la présence/absence mais également de l'intensité des bandes) montre que, parmi l'ensemble des profils DGGE analysés, ceux qui groupent avec **les profils obtenus dans l'eau correspondent à des profils obtenus à partir de matières fécales** (Figure 36, groupe 1a). Proche de ce groupe, on retrouve les profils d'échantillons de sol de surface sous *Pâturin* (sol drainant), lorsqu'il est localisé sous une bouse fraîche (groupe 1b). **Lorsque la bouse vieillit voire disparaît** (échantillons PX. 2 AUG/OCT ou PX. 4/5), **on observe un éloignement de ces profils par rapport à ceux de l'eau** (groupe 3). Dans les sols où les flux d'eau sont limités (*Rumex*/réduit), la structure des populations d'*E. coli* est plus faiblement influencée par la présence d'une bouse. **Après la disparition des bouses, les structures des populations d'*E. coli* dans les sol étudiés** (sous *Paturin* et *Rumex*) **deviennent semblables** suggérant, comme souligné précédemment, la sélection de populations naturalisées au sol et qui sont peu affectées par les propriétés physicochimiques des sols (pH, présence d'ions toxiques  $Al^{3+}$ , disponibilité en oxygène...).

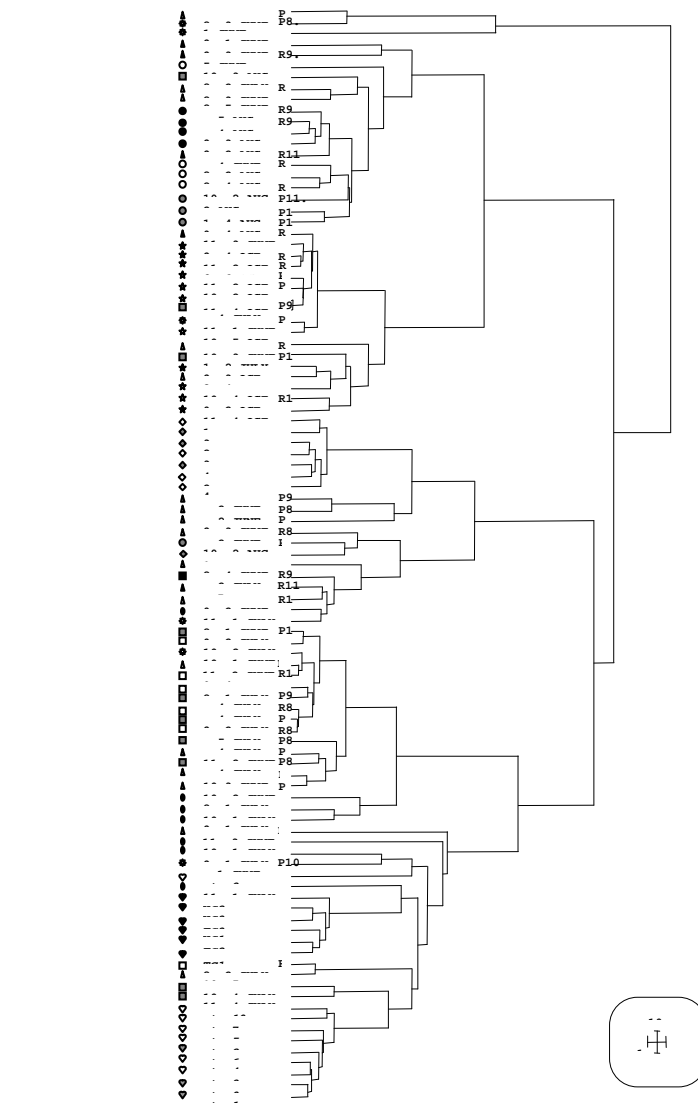


Figure 36 : Analyse par regroupement des profils DGGE uidA obtenus à partir d'échantillons d'eau, de bouse et de sols.

Les cœurs représentent des échantillons d'eau collectés au début (1, 2), au milieu (3, 7, 4, 8 et 9) et à la fin (10) de la saison pastorale et un mois après le départ du troupeau (5 et 6).

Les triangles, carrés, ronds et étoiles à 5 branches représentent des sols collectés respectivement en juin, juillet, août et octobre dans du *Rumex* réduit en noir, du *Rumex* oxydé en blanc et dans la *Poa* en gris.

Les losanges blancs et gris représentent des échantillons collectés dans la *Nardaie* et la zone de marais, respectivement. Les étoiles à 8 branches et les formes ovales correspondent à des échantillons de bouse échantillonnés en juin et juillet,.

### 6.3. Mise au point d'une méthode pour analyser l'état physiologique des *E. coli* dans les différentes unités pastorales.

Dans ce projet, nous avons pour objectif de tenter de mettre au point des outils moléculaires permettant de suivre l'état physiologique d'*E. coli* dans l'environnement. A partir d'une revue de la littérature, six gènes marqueurs sont choisis: 3 gènes marqueurs de la phase exponentielle de croissance *fis*, *ftsZ*, *rpoZ* et 3 gènes marqueurs de phase stationnaire *rpoS*, *rmf* et *dps*. Des amorces sont définies pour amplifier de façon spécifique ces marqueurs chez *E. coli* et chez les *Pseudomonas* spp. Nous avons ensuite suivi l'expression de ces marqueurs lors de cinétique de croissance d'*E. coli* dans des microcosmes de sols, comparant la croissance de différentes souches d'*E. coli* isolées à partir de différents biotopes (bouse, sol sous *Paturin*, sol sous *Rumex*) et d'une souche de laboratoire, dans deux sols aux caractéristiques physicochimiques différentes, le sol sous *Rumex* et le sol sous *Paturin*.

Mise au point des amorces. Pour mettre au point les couples d'amorces spécifiques des *E. coli* et *Pseudomonas* fluorescents, nous réalisons des analyses phylogénétiques sur chacun des 6 gènes marqueurs de l'état physiologique *fis*, *ftsZ*, *rpoZ*, *rpoS*, *rmf* et *dps*. Nous utilisons des séquences appartenant à l'ensemble des classes de Protéobactéries et plus particulièrement

aux familles des Enterobacteriaceae et des Pseudomonadaceae auxquelles les taxons d'intérêt appartiennent. Pour chacun des gènes, il s'avère que les séquences d'*E. coli* et de *Pseudomonas* fluorescents appartiennent à des groupes monophylétiques bien distincts. A partir des alignements des séquences nucléotidiques, il est possible d'envisager le dessin d'amorces ciblant ces marqueurs d'état physiologique de façon spécifique vis-à-vis des taxons d'intérêt.

Les différentes amorces sont dessinées à partir des alignements d'une dizaine de séquences nucléotidiques d'*E. coli*, d'une dizaine séquences de *Pseudomonas* spp. et de séquences de proches voisins (e. g. *S. enterica* subsp. *enterica* CT18 pour *E. coli* et *A. vinelandii* Avin0231 pour *Pseudomonas* spp.). Les jeux d'amorces sont définis afin d'amplifier des fragments de petites tailles (<300 pb), optimale pour le suivi de l'expression de gènes par RT-PCR (Tableau 13).

	Séquence (5' → 3')	Longueur amplifiée	T° d'hybridation
<b>A. <i>E. coli</i></b>			
<i>rpoS</i> forward (267)	CTCTCGCCGCCGGATG	265	59°C
reverse (546)	TCGTAAAGGAGCTGAACGTTT		
<i>rmf</i> forward (35)	CACATCAACGTGGTTATCAG	170	56°C
reverse (225)	CATTACTACCCTGTCCGC		
<i>dps</i> forward (85)	ACAGTAGAGTTGCTGAATCG	190	56°C
reverse (295)	ATCCAGATGATCGATCAGTG		
<i>rpoZ</i> forward (4)	GCACGCGTAACTGTTTCAGG	180	60°C
reverse (203)	GCAGCGCGATTACAGTGGT		
<i>ftsZ</i> forward (245)	GATGAGGATCGCGATGCA	220	60°C
reverse (482)	GATCACTGAACTGTCCAAGC		
<i>fis</i> forward (135)	GGATGTGAATGACCTCTATG	190	49°C
reverse(345)	TTAGTTCATGCCGTATTTTTTC		
<b>B. <i>Pseudomonas</i> spp.</b>			
<i>rpoS</i> forward (219)	GCCGGGTTTGACATCGACG	300	59°C
reverse (538)	CAACACAAATACATTGATTACAC		
<i>rmf</i> forward (3)	GAGAAGACTTAAGCGTGATCCG	205	53°C
reverse (230)	GTGCCRGTSAKRCCGACCCAGTTG		
<i>dps</i> forward (1)	ATGGMAATCRATATYGGWTTTCMG	160	45°C
reverse (284)	GSTGACRTTCCAGTGRAAG		
<i>rpoZ</i> forward (58)	ATGGCCCGCGTMACYGTGAAG	185	60°C
reverse (265)	CGGTHGGYTTGTCGTTTTCCCA		
<i>ftsZ</i> forward (70)	CAAGCGCATGCAGATCG	175	53°C
reverse (262)	GATCACTGAACTGTCCAAGC		
<i>fis</i> forward (20)	TGAAACAGCACCTCAMYACSCCG	210	56°C
reverse (253)	GTCTGGTTSCCCTTSACGRGTTC		

Tableau 13. Amorces dessinées pour amplifier les gènes marqueurs d'état physiologique chez *E. coli* et *Pseudomonas* spp.

Excepté pour le gène *ftsZ*, les amorces mises au point permettent l'amplification de fragments uniques, de taille attendue pour toutes les souches d'*E. coli* et de *Pseudomonas* spp. testées. Le séquençage des produits PCR obtenus vérifie leur identité. La spécificité de ces jeux d'amorces est alors testée sur des souches appartenant à des genres proches, i. e. *Erwinia*, *Salmonella*, *Proteus*, *Serratia* et *Enterobacter* pour *E. coli* et *Burkholderia*, *Acinetobacter* et *Ralstonia* pour *Pseudomonas* spp. (Tableau 14). Dans l'ensemble, les amorces amplifient de façon spécifique les taxons d'intérêt. Cependant, des signaux aspécifiques de faible intensité sont observés pour les amorces *rpoZ* et *dps* d'*E. coli* vis-à-vis de *Salmonella enterica* et *Salmonella enteritidis* et pour les amorces *fis* d'*E. coli* vis-à-vis d'*Erwinia chrysanthemi*. En

ce qui concerne les amorces ciblant les *Pseudomonas* spp., une aspécificité de réponse est observée avec les amorces *rpoZ* vis- à- vis d'*Acinetobacter calcoaceticus* et *Burkholderia cenocepacia*. Enfin, les jeux d'amorces spécifiques à *E.coli* sont testés sur différents *Pseudomonas* spp. et vice- versa : aucune amplification croisée n'est observée.

	<i>fis</i>	<i>rpoZ</i>	<i>fisZ</i>	<i>Dps</i>	<i>rmf</i>	<i>rpoS</i>
<i>Amorces définies pour E. coli</i>						
<i>E. coli</i>	+++	+++	+++	+++	+++	+++
<i>E. carotovora</i>	-	-	-	-	-	-
<i>E. chrysanthemi</i>	+	-	-	-	-	-
<i>P. mirabilis</i>	-	-	-	-	-	-
<i>S. enterica</i>	-	+	-	++	-	-
<i>S. enteritidis</i>	-	+	-	++	-	-
<i>E. aerogenes</i>	-	-	-	-	-	-
<i>S. marcescens</i>	-	-	-	-	-	-
<i>Amorces définies pour Pseudomonas spp.</i>						
<i>Pseudomonas</i> fluorescents	+++	+++	-	+++	+++	+++
<i>Pseudomonas</i> 11 genres/	+++	+++	-	+++	+++	+++
<i>A. calcoaceticus</i>	-	+++	-	-	-	-
<i>B. cenocepacia</i>	-	+	-	-	-	-

Tableau 14. Résultats des tests de spécificité d'amplification des différents couples d'amorces mis au point.

**Cinétiques de croissance de différentes souches d' *E. coli* dans les sols sous *Paturin* et sous *Rumex*.** Les survies de 4 souches d' *E.coli*, 3 souches environnementales isolées sur l'alpage de Bise et une souche de laboratoire (DH5 $\alpha$ ) sont comparées dans 2 sols, afin d'évaluer si l'origine des souches a une influence sur leur aptitude à survivre. Les suivis des effectifs des *E.coli* dans le bassin versant suggèrent l'existence, dans les sols, de populations d'*E coli* naturalisées c'est- à- dire adaptées, acclimatées à la croissance dans un sol. Cette expérience est donc réalisée avec deux objectifs: 1) suivre l'expression des gènes marqueurs de l'état physiologique au cours de la croissance d'*E. coli* dans un sol, 2) valider l'hypothèse d'acclimatation des souches environnementales au développement dans un sol.

Pour chacun des deux sols, des différences comportementales existent en fonction de l'origine de la souche bactérienne (Figure 37). La souche DH5 $\alpha$  est celle qui se maintient le moins dans chacun des sols. Ses effectifs décroissent progressivement dans le sol sous *pâturin* jusqu'à atteindre la limite de détection (10 CFU g<sup>-1</sup> de sol) après 8 semaines d'incubation. Dans le sol sous *Rumex*, la décroissance est plus rapide et la souche DH5 $\alpha$  disparaît dès 1 semaine d'incubation. Au contraire, les souches environnementales se maintiennent dans le sol sous *Pâturin* à des effectifs de l'ordre de 10<sup>5</sup>/10<sup>6</sup> cellules g<sup>-1</sup> de sol, après une phase de déclin de 7, 14 et 1 mois pour, respectivement, les souches issues du *Rumex*, de la bouse et de la *Pâturin*. Dans le sol sous *Rumex*, exception faite de la souche isolée de ce même sol, une décroissance plus rapide des effectifs en *E. coli* est observée, la souche issue de la bouse disparaissant après 10 jours d'incubation (240 h), celle issue de la *Pâturin* et du *Rumex* après deux mois. Nous avons également étudié la cinétique de croissance des populations naturelles d'*E. coli* pendant 2 semaines dans chacun des 2 types de sol et mis en évidence des dynamiques très différentes de celles des souches d'*E.coli* introduites après culture au laboratoire. La phase de déclin précédemment obtenue pour toutes les souches dans les deux

types de sol n'est pas observée. Au contraire, une phase de croissance est observée jusqu'à 18h ( $10^4$  cellules  $g^{-1}$  de sol à 0h et environ  $10^6$  à 18h). Par la suite, les effectifs se stabilisent à  $10^6$  cellules  $g^{-1}$  de sol.

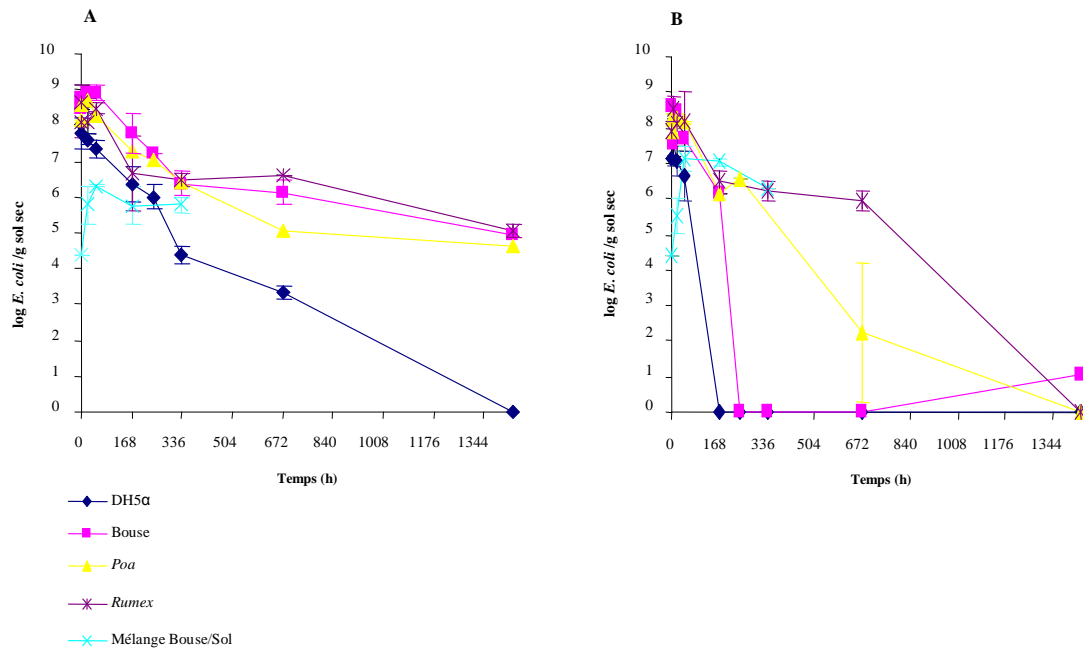


Figure 37. Cinétiques de survie de souches d'*E. coli* de laboratoire et environnementales (isolées d'une bouse, de sol sous *Paturin* et de sol sous *Rumex*) et de populations d'*E. coli* indigènes d'une bouse dans deux sols (sous *Paturin* (A) et sous *Rumex* (B)).

Ces expériences montrent donc que, selon leur origine, les **souches d'*E. coli* ne présentent pas les mêmes capacités de survie dans les sol testés**. Le sol sous *Paturin* apparaît être un milieu plus favorable au maintien des *E. coli* que le sol sous *Rumex* puisque toutes les souches testées y survivent plus longtemps. Chaque souche isolée d'un sol semble en fait être adaptée à survivre dans ce sol validant l'hypothèse de naturalisation/acclimatation de populations d'*E. coli* dans les sols.

**Expression des marqueurs moléculaires d'état physiologique.** Des signaux d'amplification ont rarement été obtenus (Tableau 15). Les ARNs extraits du sol étant de bonne qualité, l'absence de réponse peut provenir d'une trop forte dilution des cibles en raison soit d'un niveau de transcription des gènes trop faible, soit d'effectifs en *E. coli* trop faibles. Des développements méthodologiques doivent encore être réalisés. Au cours de ce projet, nous avons choisi de réaliser une rétrotranscription de l'ensemble des ARNs en utilisant des amorces aléatoires étant donné que l'étude de l'expression de 6 gènes devait être menée en parallèle. L'utilisation d'amorces spécifiques de chaque gène pour réaliser la synthèse du brin d'ADN complémentaire pourrait augmenter l'efficacité de la méthode. D'autre part, nous avons observé une grande variabilité de réponses inter- microcosmes en particulier dans les microcosmes de sol sous *Paturin*. C'est un sol riche en matières humiques, et cette richesse peut affecter les rendements d'extractions des acides nucléiques et inhiber les amplifications PCR. Nous avons d'autre part étudié pour le sol sous *Rumex* (variabilité inter- microcosme plus faible) la variabilité intra- microcosme. Elle est importante. La masse de sol utilisée pour



l'extraction des ARNs (i. e. 500 mg) n'est peut être pas suffisante pour obtenir une bonne représentativité. Le sol sous *Rumex* est riche en argile. Suite à l'inoculation des souches d'*E.coli*, l'agrégation des bactéries par des particules d'argile a pu conduire à une variabilité de réponse. Ce biais n'existe pas pour l'étude des cinétiques de survie, les énumérations étant réalisées sur des échantillons plus importants (1,5 g de sol). Il serait donc intéressant de tester de nouveau la variabilité intra- microcosmes sur des échantillons de 1,5g.

Malgré ces difficultés méthodologiques, certains résultats peuvent toutefois être soulignés. En ce qui concerne les gènes marqueurs de phase de division, des différences de réponse sont observées en fonction des marqueurs. En ce qui concerne les marqueurs *ftsZ* et *fis*, leur expression n'est jamais mise en évidence, exceptée dans le cas de *ftsZ* pour lequel un signal est observé une fois. Il s'agit d'un échantillon provenant du mélange entre le sol et la bouse, après 3h d'incubation c'est- à- dire durant la phase exponentielle de croissance. Cette absence de détection des transcrits des gènes *ftsZ* et *fis* pouvait être attendue étant donné qu'ils sont exprimés de façon transitoire durant la phase exponentielle de croissance<sup>146,147</sup>. De plus, de réelles phases de croissance bactériennes sont rarement obtenues dans des cinétiques réalisées en microcosmes de sol. En ce qui concerne le gène *rpoZ*, des signaux positifs sont observés dans la majorité des microcosmes analysés, quelque soit le temps d'échantillonnage (comme par exemple 3h (phase de division) versus 7j (phase stationnaire) pour la cinétique des populations d'*E. coli* indigènes d'une bouse). Pour le gène *rpoZ*, sa transcription est décrite comme maximale en début de phase exponentielle puis nulle en phase stationnaire. Cependant, *rpoZ* est aussi impliqué dans la réponse stringente *in vitro*. Dans cette étude, l'accumulation des transcrits du gène *rpoZ* en particulier lors des phases de déclin est sans doute liée à l'expression de ce marqueur en réponse à des stress plutôt qu'en réponse à la division des cellules. On peut supposer que cette fréquente détection de l'ADNc du gène *rpoZ* n'est pas liée à un plus fort taux de transcription mais uniquement à une **augmentation de la stabilité de l'ARNm**.

En ce qui concerne les marqueurs de phase stationnaire, le gène *rmf* est rarement exprimé. De plus, les signaux positifs sont plutôt observés en début de cinétique (0 à 48h), lors des phases de déclin. Le transcrit du gène *dps* est observé dans un plus grand nombre d'échantillons en particulier pour la souche isolée d'une bouse et inoculée dans chacun des sols, à 48h ou 7j d'incubation.

Si l'on s'intéresse aux rapports de transcription entre le gène *rpoZ* (phase de division) et les gènes *dps* ou *rmf* (phase stationnaire), des réponses cohérentes sont généralement observées avec une détection de transcrits soit pour *rpoZ* soit pour *dps* et/ou *rmf*. Cependant étant donné la variabilité inter et intra- microcosme observée il est difficile de conclure sur l'état de division ou de dormance des *E. coli* dans le sol. Comme indiqué ci- dessus, d'autres développements méthodologiques doivent encore être fournis.

---

<sup>146</sup> Garrido, T., M. Sánchez, P. Palacios, M. Aldea, and M. Vincente, 1993. Transcription of *ftsZ* oscillates during the cell cycle of *Escherichia coli*. *EMBO J.* 12: 3957- 3965.

<sup>147</sup> Ali Azam, T., Iwata, A., Nishimura, A., Ueda, S., Ishihama, A., 1999. Growth phase- dependent variation in protein composition of the *Escherichia coli* nucleoid. *J. Bacteriol.* 181: 6361- 6370.

Souche	Sol	Temps d'incubation	Microcosme	Marqueurs de phase exponentielle			Marqueurs de phase stationnaire		
				<i>ftsZ</i>	<i>rpoZ</i>	<i>fis</i>	<i>dps</i>	<i>rmf</i>	
DH5 $\alpha$	Rumex	0h	1				-	-	
			2				-	-	
		3h	1	-	+		-	-	
			2	-	+		-	-	
			3	-	+		-	-	
		48h	1	-	++		-	-	
	2		-	++		-	-		
	3		-	+		-	-		
	Poa	3h	1	-	-		-	-	
			2	-	++		-	-	
			3	-	-		-	+	
		48h	1	-	++		-	-	
2			-	-		++	-		
3			-	+		-	-		
Bouse	Rumex	0h	1				-	-	
			2				++	-	
		3h	1				-	-	
			2				-	-	
			3				-	-	
		48h	1	-	+ / + + * / + *	- / -	-	-	
	2		-	+ / + + * / + *	- / -	/ + + * / + *	-		
	3		-	+ + * / + *	- / -	- / + *	-		
	Poa	7j	1	- / -	+ / -	- / -	- / + +	- / -	
			2	- / -	+ + / -	- / -	- / + +	- / -	
			3	- / -	+ / -	- / -	+ / -	- / -	
		48h	1	-	+		-	++	
			2	-	-		++	-	
			3	-	++		-	-	
	Poa	Rumex	0h	1				++	++
				2				-	++
			3h	1				-	-
				2				++	-
3							-	-	
48h			1	-	+++		-	-	
		2	-	+		-	-		
		3	-	+		-	-		
Poa		48h	1	-	++		-	-	
			2	-	-		-	-	
			3	-	-		-	-	
Populations indigènes d'une bouse		Rumex	3h	1	- / + + + / -	- / - / +	- / - / -	- / - / +	- / - / -
	2			- / - / -	- / + / +	- / - / - /	- / - / +	- / - / -	
	3			- / - / -	- / - / -	- / - / -	- / - / -	- / - / -	
	7j		1	- / - / -	+ / + / +	- / - / -	- / - / -	- / - / -	
			2	- / - / -	- / - / -	- / - / -	- / - / -	- / - / -	
			3	- / - / -	- / + / -	- / - / -	- / - / -	- / - / -	

Tableau 15. Résultats des tests de RT-PCR semi-quantitative réalisés sur les marqueurs de phases de division (*ftsZ*, *rpoZ* et *fis*) et stationnaire (*dps* et *rmf*) dans les microcosmes de sol (sous *Poa* et sous *Rumex*) inoculés par des souches de laboratoire (DH5 $\alpha$ ), environnementales (souches de *Poa* et de *Rumex*) et par des populations indigènes d'une bouse.

Par temps d'échantillonnage, deux ou trois microcosmes (notés de 1 à 3) sont échantillonnés. Pour un même microcosme, 2 à 3 extractions d'ARN sont parfois réalisées (signifiées par des «/»). Le symbole – signifie une absence de signal d'amplification; +, un faible signal, ++, un signal d'intensité moyenne; +++ : un signal de forte intensité ; \*, un signal détecté pour un nombre n+1 de cycles d'amplification PCR.

## 6.6. Transferts sols- eaux: modélisation du transfert bactérien par ruissellement à l'échelle bassin versant.

Les sorties du modèle portent sur: (i) le comportement hydrologique et l'établissement de cartes relatives aux hauteurs de ruissellement des pixels de l'espace et à l'extension du réseau hydrographique, ces cartes sont par la suite confrontées à celles relatives à la génération automatique d'un semis de bouses pour la localisation des points potentiels d'émissions de bactéries; (ii) la détermination des paramètres reliant flux bactérien observé et flux bactérien calculé, notamment ceux qui caractérisent le stock de bactéries mobilisables et les fonctions de transfert bactérien.

### 6.6.1. Modélisation hydrologique

Les valeurs d'humidité  $\theta_c$  calculées par SMDR et celles  $\theta_o$  observées sur les tubes TDR sont concordantes (fig. 38), les points étant bien centrés sur la bissectrice ( $\theta_c = 0.98\theta_o - 0.31$ ;  $r^2 = 0.89$ ). En profondeur, pour certains tubes, de faibles variations d'humidité sont mal prises en compte par le modèle. Les écarts de prédiction sont néanmoins du même ordre de grandeur que l'erreur de mesure de sondes équivalentes et dans la mesure où il n'existe pas de biais systématique dans la distribution des résidus, l'estimation de l'humidité des sols peut être acceptée.

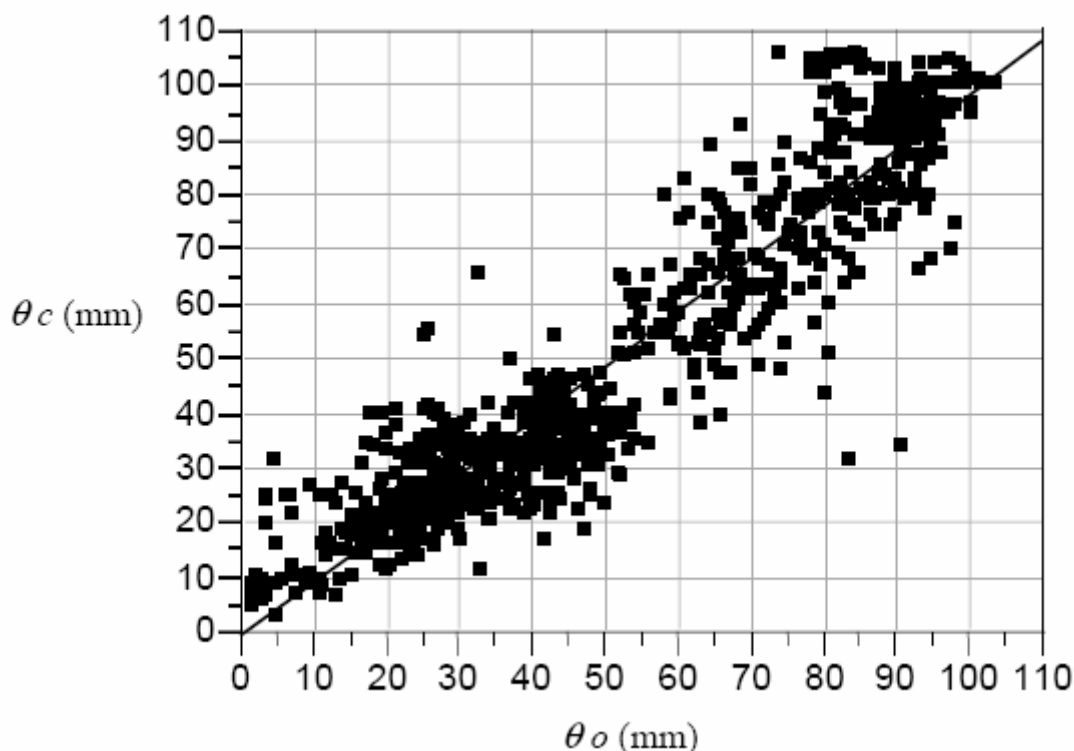


Figure 38. Humidités volumiques observées et prédites (nombre de sites=10)

Le débit d'eau à l'exutoire est calculé selon deux modalités, l'écoulement karstique *Dkar* étant considéré soit comme nul, soit non nul (fig. 39). En 2005, comme en 2006, les débits sont bien simulés, avec respectivement un coefficient de Nash- Sutcliffe (Nash et

Sutcliffe, 1970) de 0.70 et 0.59 pour l'estimation où  $D_{kar} \neq 0$ . Au vu de ces résultats, la simulation nous semble tout à fait acceptable, d'autant que seuls deux paramètres (notamment, aire du karst et temps de trajet de l'écoulement karstique) résultent d'un ajustement sur le débit de l'exutoire. L'examen des simulations montre que la prise en compte de l'écoulement karstique modifie peu l'hydrogramme en phase de montée de crue mais améliore nettement la prévision du débit lors de la descente de crue (fig. 39). Il correspond à des surfaces d'altitude non pâturées par le bétail et n'a pas été intégré dans le calcul du transfert bactérien.

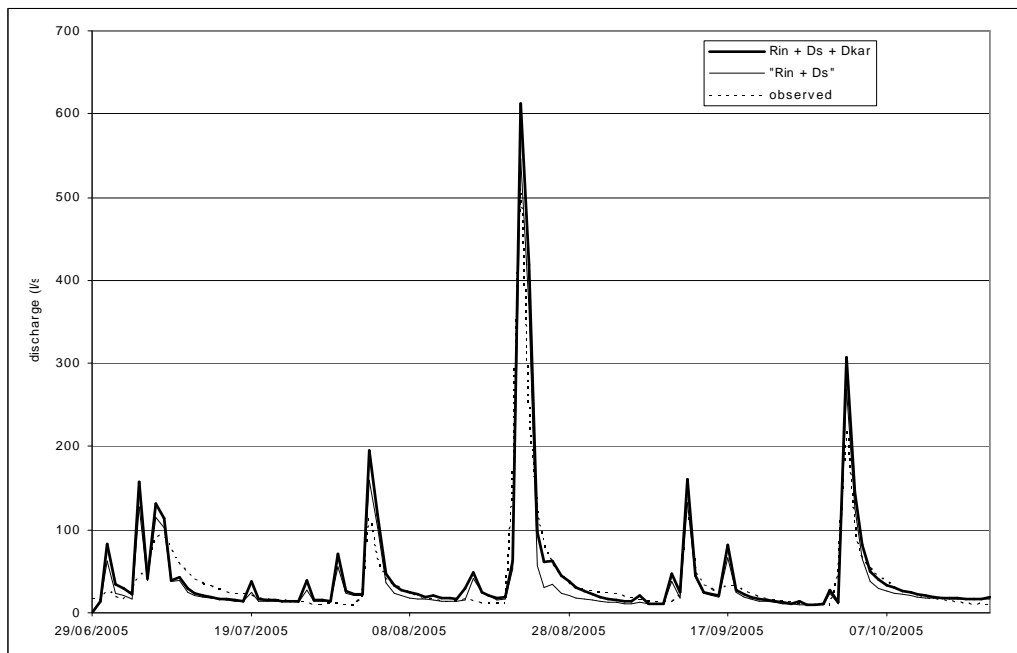


Figure 39. Débit mesuré et débits calculés.

Rin : Débit de ruissellement ; Ds : drainage des sols ; Dkar : débit karstique.

### **6.6.2. Flux bactériens**

Un total de neuf averses permet d'ajuster par moindres carrés les calculs aux observations et de déterminer les valeurs des paramètres du transfert (fig. 40). Ces derniers sont reportés dans le tableau 16.

Pour le modèle 9 (Equation 9 voir 5.4.4), les résultats sont décevants car c'est seulement 18% des flux observés qui sont reproduits. L'hypothèse « absence de rétention » ne permet pas donc d'estimer correctement les flux observés et ceci introduit l'idée que la rétention bactérienne est effective lorsque le ruissellement traverse un tapis herbacé. Pour rendre compte de l'atténuation de la rétention avec la longueur du trajet, le modèle non linéaire (11) est introduit. Il rend compte de 87% des flux, avec des résidus centrés et ne montrant pas de biais. Cependant, les stocks mobilisables sont très élevés avec des valeurs qui, à notre connaissance n'ont jamais été mises en évidence pour les fèces de bovins. Le modèle (11) ne peut donc être retenu dans sa forme actuelle. Pour (10), l'ajustement est également hautement significatif mais avec des valeurs des stocks mobilisables des bouses comparables aux données de la littérature<sup>148,149</sup>. Ce modèle montre qu'une part prépondérante de bactéries est

<sup>148</sup>Sinton L. W., Braithwaite R. B., Hall C. H., Mackenzie M. L., 2007. Survival of indicator bacteria in bovine feces on pasture, App. Environ. Microbiol., 73(24): 7917- 7925.

susceptible d'être retenue dans les premiers mètres du trajet de ruissellement. On pense que la forte rétention des premiers mètres résulte d'une intense sédimentation des bactéries lors des premiers instants du ruissellement, durant la phase transitoire du ruissellement, là où les lames d'eau sont organisées en fins filets d'eau et où les points de contacts avec les premiers millimètres de la surface du sol sont nombreux. Lorsque les flux d'eau s'intensifient, la rétention serait très faible, voire négligeable, comme cela est mis en évidence par Muirhead, 2006<sup>150</sup>.

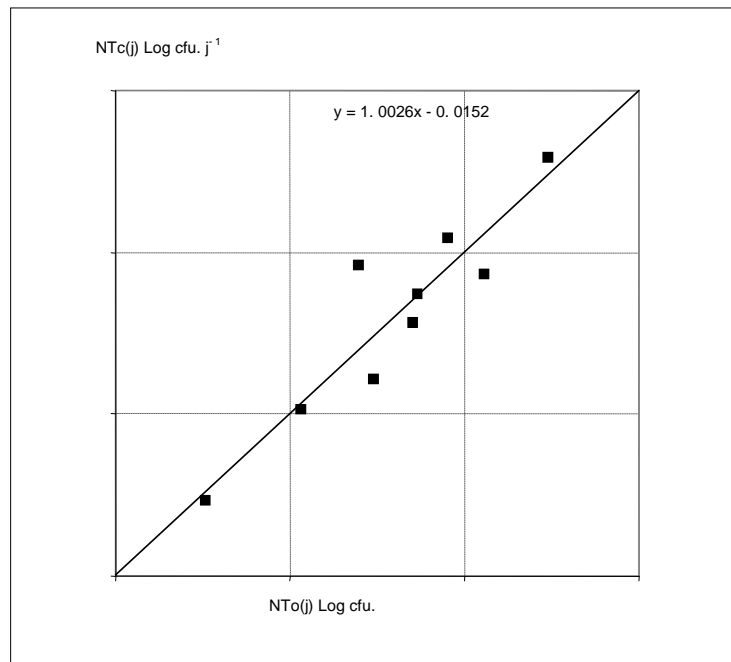


Figure 40. Flux bactérien observé et calculé.

modèle	$\beta$ m- 1	$\omega$ s. d.	$\lambda$ s. d.	$\bar{E}_1$ cfu	$r^2$
$\frac{dn}{dL} = 0$ [9]	-	-	-	$10^{7.7}$	0.18
$\frac{dn}{dL} = -\beta n$ [10]	0.17	-	-	$10^{9.2}$	0.84***
$\frac{dn}{dL} = \frac{-\omega}{1 + \lambda L} n$ [11]	-	4.2	1.5	$10^{11.5}$	0.87***

Tableau 16. Valeurs ajustées des paramètres. E1 : stock potentiel mobilisable des boues « fraîches ».

<sup>149</sup> Van Kessel, J. S., Pachepsky Y. A., Shelton D. R., Karns J. S., 2007. Survival of Ecscherichia coli in cowpats in pasture and in laboratory conditions, J. Appl. Microbiol., 103:1122- 1127.

<sup>150</sup> Muirhead R. W., Collins R. P., Bremer P. J., 2006. The association of E. coli and soil particles in overland flow. Wat. Soil. Science and Technology, 54(3): 153- 159.

### 6.6.3. Zones sources critiques

A l'échelle du bassin, on peut calculer que 95 à 98% du flux total de bactéries est exporté par les 7 premiers mètres de trajet du ruissellement, longueur correspondant à la diagonale des pixels du modèle numérique de terrain. Si, par simulation, on supprime les bouses des premiers pixels jouxtant le réseau hydrographique, la réduction en flux et la teneur moyenne à l'exutoire sont hautement significatives. Avec une absence de bouses dans la première couronne de pixels jouxtant le cours d'eau (soit une absence de bouses sur une distance de 5 m de part et d'autre du cours d'eau), la teneur moyenne des averses passe de 2500 à 62 cfu. 100 ml<sup>-1</sup>. Avec une distance de 10 mètres, elle n'est plus que de 6 cfu. 100 ml<sup>-1</sup>. Si on supprime les bouses <15 jours des 5 premiers mètres, la teneur moyenne de l'exutoire est de 20 cfu. 100ml<sup>-1</sup>, avec uniquement des bouses > 1 mois, il n'y a plus que 4 cfu. 100ml<sup>-1</sup>. On peut calculer que près de 70 % du volume de ruissellement du bassin versant concerne des pixels jouxtant le réseau hydrographique.

Si on analyse le devenir des bactéries mobilisées à l'échelle du pixel, avec par exemple une hauteur  $R_j$  de ruissellement de 50 mm et une distance parcourue de 5 mètres, on obtient des valeurs de concentration bactérienne du ruissellement assez élevées, de 10<sup>7.2</sup>, 10<sup>5.2</sup> et 10<sup>4.2</sup> cfu. 100 ml<sup>-1</sup> pour les trois classes de bouses considérées. Ces valeurs sont assez comparables à celles de réponses relevées lors d'averses artificielles<sup>151,152</sup>.

Les bactéries des bouses déposées dans la proximité immédiate du cours d'eau sont donc intensément mobilisées par les forts écoulements de surface qui traversent ces zones. Les pixels jouxtant le cours d'eau constituent des surfaces critiques de première importance, dans la mesure où le ruissellement y est responsable d'une forte mobilisation et où le trajet est trop court pour que la rétention aboutisse à une réduction drastique du transfert (fig. 41). Le régime hydrologique du cours d'eau et notamment son allongement longitudinal et latéral, conduisent à une augmentation déterminante du transfert des bactéries des bouses vers l'exutoire. Pour les averses dont la période de retour T est inférieure à 5 ans, ce sont les berges du cours d'eau qui correspondent aux zones critiques. Lors des averses où T>5, les pixels critiques incluent les berges mais aussi les fonds de talweg recevant l'eau d'aires situées plus en amont, dont le périmètre contributif équivalent est > 3000m.

---

<sup>151</sup> Muirhead R. W., R. P. Collins, P. J. Bremer, 2005. Erosion and subsequent transport state of Escherichia coli from cowpats. Appl. Environ. Microbiol. 71(6): 2875- 2879.

<sup>152</sup> Collins R., Elliott S., Adams R., 2005. Overland flow delivery of faecal bacteria to a headwater pastoral stream, J. Applied Microbiol. 99 : 126- 132.

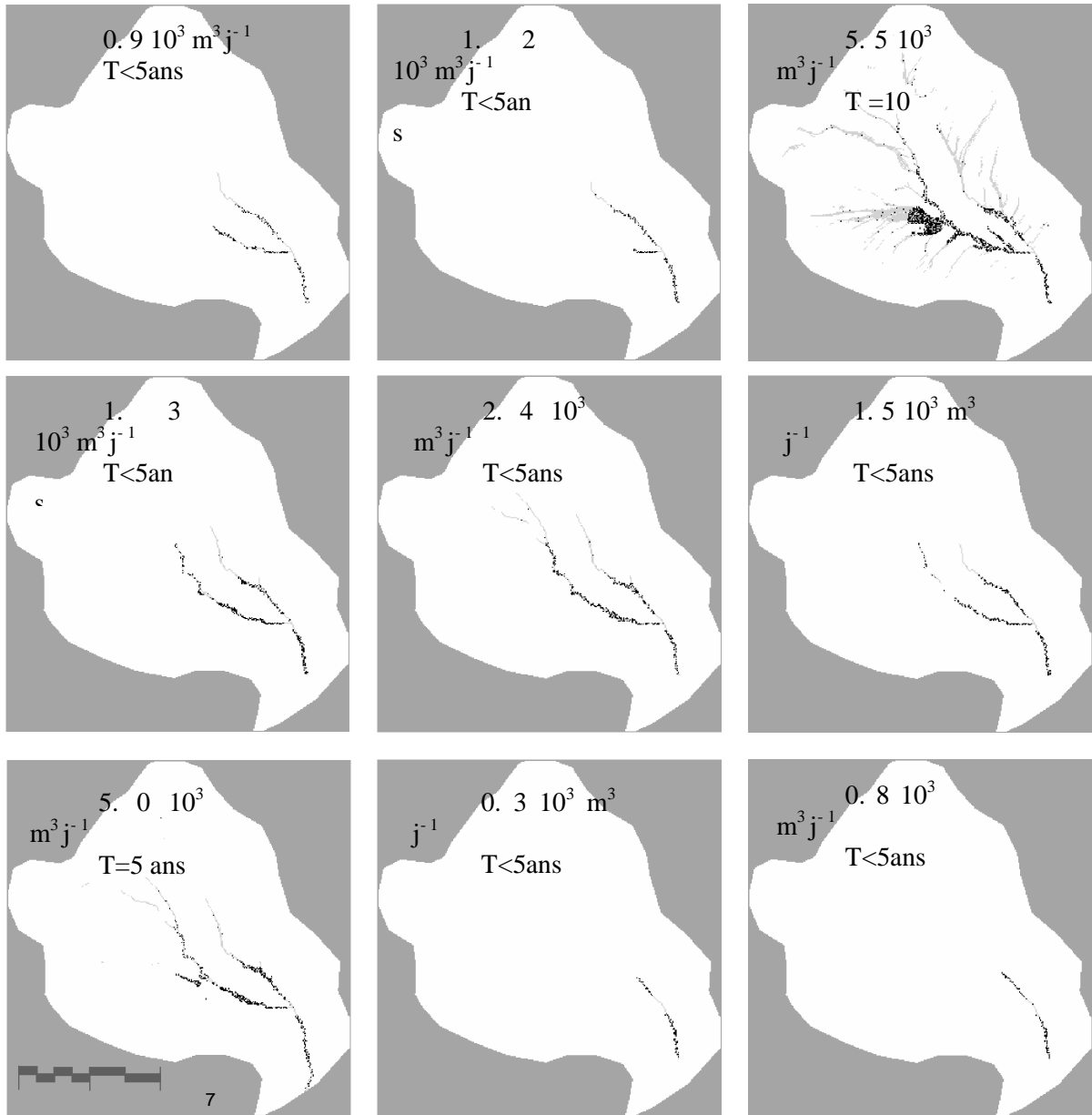


Figure 41. Zones critiques pour différentes périodes T de retour des averses et débits d'exutoire. Pixels noirs : pixels distants de 5 mètres du réseau hydrographique. Pixels gris : réseau hydrographique.

## 7. DISCUSSION

Toutes les eaux de la zone d'alpage étudiée (ruisseaux, sources, ruissellements) sont quelque soit l'époque de l'année, très pauvres en nutriments. Teneurs et flux se situent dans la gamme du bruit de fond naturel et les classiques cycles saisonniers de N et COD sont à peine perceptibles. En outre, les transferts de MES sont limités malgré les signes d'érosion visibles sur le terrain. Les activités pastorales, bien que concentrées dans le temps et dans le territoire, n'affectent donc pas significativement la qualité physique et chimique des eaux.

La situation est toute autre au plan microbiologique: la présence de troupeaux sur le bassin versant est associée à une nette contamination fécale des eaux de surface. Au cours de la saison pastorale, les teneurs en *E.coli* à l'exutoire sont largement au-delà des standards (avec un niveau de base autour de 20 UFC 100 ml<sup>-1</sup>, des pics atteignant 5.10<sup>3</sup> UFC 100 ml<sup>-1</sup>). Par contraste, hors territoire pâturé ou hors période d'exploitation des bovins, les teneurs sont toujours respectivement basses (<10 UFC 100 ml<sup>-1</sup>) ou négligeables.

Le constat d'une dégradation de la qualité microbiologique des eaux en relation avec des activités de pâture, est couramment mis en avant par les professionnels de l'eau comme un problème majeur rencontré dans nombre de territoires voués à la protection des ressources en eau potable<sup>153</sup>. Même quand il s'agit de territoires utilisés comme parcours extensifs, cette pollution s'avère actuellement difficile à maîtriser si bien qu'il est souvent envisagé de soumettre les systèmes pastoraux à des contraintes difficilement acceptables, voire globalement de remettre en cause l'élevage dans les zones de protections (qui par ailleurs représentent de vastes surfaces souvent à entretenir). Des progrès de connaissance sur les risques, les déterminismes et les mécanismes de ce type de pollution diffuse, sont attendus pour fournir matière à des diagnostics plus affinés et à des pistes d'action plus adaptées. Le projet PASTOR s'inscrit dans cette perspective. Conjuguant des approches d'écologie microbienne, d'hydrologie et d'agronomie, et combinant des suivis, des expérimentations et des modélisations, Pastor cherche à apporter un fond de connaissance interdisciplinaire. Le niveau de synthèse des études entreprises est le bassin versant, échelle opérationnelle pour les questions de qualité des eaux<sup>154</sup>.

Les divers acquis de ce projet seront discutés dans ce chapitre ainsi que certaines valorisations en termes de réduction et de traçage des impacts du pâturage sur la qualité des eaux. En préalable à cette discussion, un premier développement est consacré à la construction de la stratégie scientifique et de l'interdisciplinarité.

### 7.1. Construction de la stratégie de recherche et de l'interdisciplinarité

#### 7.1.1. Une stratégie basée sur un couplage innovant d'approches

La contamination des eaux par des bactéries fécales provenant de troupeaux suppose une survie minimum de ces populations après leur émission dans l'environnement, et des **stockages** dans des **réservoirs environnementaux**, notamment sur et dans les sols, plus ou moins durables et susceptibles d'entretenir la contamination de l'eau. La contamination

---

<sup>153</sup> N Schaffter 1999 Impact de l'exploitation des Alpes sur la qualité des eaux Thèse EPFL Lausann).

<sup>154</sup> Gril J.- J., Dorioz J.- M., 2004 - Des bassins versants de recherches aux bassins opérationnels : quels bassins versants pour connaître et maîtriser les pollutions diffuses ? *Ingénieries*, 39 p. 3- 16. (84)



nécessite par ailleurs l'existence d'**extractions à partir de ces réservoirs et de transferts hydriques**, c'est-à-dire de processus couplant, émissions, stockages, écoulements d'eau et créant ainsi des flux et in fine, des exportations à l'exutoire. L'intensité des exportations dépend de cette chaîne de phénomènes « macroscopiques » qui se développent jusqu'à l'échelle paysage.

D'autres phénomènes plus « microscopiques », affectant l'état des populations microbiennes fécales, interviennent. Les bactéries entériques libérées dans l'environnement subissent un stress lié au passage dans un milieu forcément oligotrophe, correspondant à des conditions biotiques et abiotiques éloignées de leur optimum de croissance et moins favorables que celles de leur habitat primaire (tractus digestif des animaux à sang chaud). Le maintien de populations entériques dans l'environnement –surtout dans la durée– dépend en conséquence de la mise en place de processus de survie<sup>155</sup> et de stratégies adaptatives qui peuvent aboutir à des changements dans la **structure génétique des populations**.

La principale innovation apportée par Pastor résulte du **couplage d'approches** permettant une étude conjointe de ces deux catégories de phénomènes de nature et d'échelle différentes. Sont ainsi pris en compte simultanément:

1) d'une part, les dynamiques associées au transfert de *E.coli* à l'échelle bassin versant; les études reposent sur des suivis quantifiés du devenir des populations d'*E.coli* dans l'environnement de montagne, depuis leur introduction par les déjections, leurs réservoirs environnementaux, jusqu'aux transferts vers l'exutoire du bassin ; cette approche apporte des connaissances spécifiques sur les transferts et leurs régulations ;

2) d'autre part, les processus de sélection et d'adaptation microbiens révélés par des changements de structure des populations d'*E.coli* au cours de la chaîne de phénomènes et d'étapes assurant le transfert.

Les changements de structure génétique observés permettent de générer des hypothèses relatives au fonctionnement écologique de ces populations microbiennes dans les écosystèmes prairiaux de montagne. Dans le détail, nos résultats contribuent à caractériser les évolutions de structure des populations d'*E.coli* dans les différents compartiments du bassin versant et à comprendre le rôle du milieu et des durées de stockage vis-à-vis de la sélection et/ou adaptation de certaines populations lors des transferts. Ils fournissent aussi une « **signature génétique** » spécifique de certains stocks, signature que nous avons cherché à utiliser comme indicateur de l'origine fine des populations de *E.coli* exportées à l'exutoire.

Ce couplage est au cœur de notre stratégie de recherche et de la construction de notre démarche interdisciplinaire. D'autres informations complémentaires sont disponibles dans Pastor pour compléter l'analyse des « stratégies écologiques » de *E.coli* dans l'environnement en relation avec la nature fine de ses réservoirs environnementaux. Il s'agit de:

1) la possibilité de comparer partiellement l'évolution des populations d'*E.coli* (considéré comme un modèle type de bactérie fécale) et celle de bactéries telluriques types (*Pseudomonas fluorescents*),

---

<sup>155</sup> Roszak DB, Colwell RR. 1987. Survival strategies of bacteria in the natural environment. Microbiol Rev. 51:365- 379. Aertsen A, Michiels CW. 2004. Stress and how bacteria cope with death and survival. Crit Rev Microbiol. 30:263- 273

2) la prise en considération de souches d'*E.coli* potentiellement pathogènes pour l'homme, les STEC, dont le comportement dans le contexte pastoral est peu connu .

### **7.1.2. Importance de la caractérisation du terrain**

La caractérisation du terrain d'étude participe aussi à l'élaboration de la stratégie de recherche de Pastor et fédère les disciplines. Le terrain est plus qu'un simple support expérimental, c'est un modèle naturel dont la conceptualisation vis- à- vis du phénomène étudié (un transfert de pollution) représente un résultat important et à portée générale. Ce principe se traduit par le choix d'étudier un bassin versant, objet représentatif du problème traité, et par la sélection d'un site à la fois homogène (un seul mode d'entrée des déjections, un seul mode d'occupation de sols, la prairie permanente, une zone inhabitée et sans infrastructure...) et hétérogène en terme de milieux biophysiques, avec notamment une grande diversité et mosaïque de sols et de végétations. L'avantage est de disposer à la fois d'une unité pertinente en termes de gestion et de transfert, et d'une bonne variabilité des conditions et d'intensité de stress physiques, chimiques et biologiques, s'exerçant sur les microorganismes entériques introduits avec les déjections. La difficulté est la relative complexité en matière d'hydrologie (divers types d'aquifères sur un petit bassin). L'exploitation pastorale ajoute de la complexité en induisant des effets en retour des déjections sur les végétations et les sols, à court et moyen termes. Dans ce contexte, la caractérisation du milieu ne peut pas se limiter à une simple description préalable de chaque facteur ayant un effet supposé sur la dynamique des contaminants fécaux; c'est une véritable **analyse systémique** qui est nécessaire pour cadrer les stratégies d'échantillonnage et caractériser les divers niveaux pertinents de variabilités spatiales et temporelles). Un tel diagnostic a permis à nos stratégies d'évoluer au fil du projet pour s'adapter à de résultats inattendus (notamment la survie prolongée des *E.coli* dans certains milieux étudiés et l'abondance de *Pseudomonas* fluorescents dans les déjections).

### **7.1.3. Deux concepts opérationnels**

Deux concepts nous ont permis de structurer un diagnostic du terrain adapté à la stratégie de recherche et au terrain d'étude retenus.

1) La notion de « **faciès pastoral** »; elle sert à définir les stations de référence représentatives des niveaux et modes d'apports de déjections et des contraintes et stress appliqués au niveau des sols, sur les bactéries fécales introduites. Ces stations sont utilisées pour évaluer les stockages dans les réservoirs environnementaux et pour caractériser la dynamique de dispersion des déjections à l'échelle alpage. Concrètement, le « faciès pastoral » représente un milieu type déterminé par des propriétés de sols qui se sont avérées clés vis- à- vis de la survie et du stockage des *E. coli* (pH, texture, dynamique de l'eau et matière organique), par une couverture végétale donnée qui reflète un mode de fréquentation par les troupeaux et se traduit par un taux de déjections donné.

2) La notion de « **système de transfert** »; le territoire du bassin versant est interprété comme un ensemble de compartiments fonctionnels vis- à- vis de la dispersion et de la dynamique de transfert d'*E.coli*: entrées et stockages; connexions hydrauliques, transport et exportations. Ces compartiments sont le siège des divers phénomènes physiques (écoulement, extraction, rétention...) et biologiques (croissance, survie, adaptation...) qui contrôlent l'intensité et la nature (structure génétique des populations) des flux exportés. Les phénomènes associés aux transports par les écoulements se caractérisent par des cinétiques

rapides : la bactérie n'est alors qu'un colloïde relativement inerte. Les phénomènes de stockage permettent le développement de processus beaucoup plus lents, les processus biologiques évoqués précédemment, adaptations et sélections modifiant la structure génétique des populations.

## **7.2. Dynamiques d'*E.coli* dans l'environnement**

### **7.2.1. Dispersion des déjections et entrées de *E.coli* dans le bassin versant: modalités et aspects agronomiques**

Le troupeau est l'agent principal d'introduction et de dispersion d'*E.coli* dans le territoire pastoral. Les entrées s'effectuent via ses déjections qui sont émises soit directement dans l'eau de surface, soit sur les sols et la végétation. Dans ces derniers cas le contenu organique des bouses et la cohésion du substrat, protègent temporairement les bactéries entériques des stress physico- chimiques et biologiques (compétitions, antagonismes...) inhérents à l'environnement terrestre.

Les apports directs s'effectuent en des lieux précis, ceux où le troupeau traverse les ruisseaux (sous la conduite du berger) et où il s'abreuve. Ce mode de contamination des eaux de surface est souvent considéré empiriquement comme significatif<sup>156</sup>. Dans le contexte étudié, ce mode d'apport ne semble pas prédominant et ne détermine que de petits pics de contamination, de courtes durées et bien identifiables, à l'exutoire, lors des étiages. L'effet protecteur du substrat organique des bouses sur *E.coli* est moins évident en cas d'apports directs au réseau hydrographique du fait de la désagrégation qui s'opère dans l'eau courante. Le stockage est de ce fait éphémère, ce qui pourrait expliquer la faible durée des épisodes de contamination.

L'apport de déjections sur les sols et les végétations se concentre sur une relativement courte période estivale (différence /plaine) et s'effectue selon une distribution spatiale et temporelle complexe qui n'est que partiellement aléatoire. Les quantités et la dispersion, constituent les déterminants clés de la variabilité de l'intensité de la contamination des eaux, en période de crue. De ce fait, toute modélisation déterministe des transferts de contaminants fécaux des troupeaux aux sols et aux eaux implique de définir la variable d'entrée « déjections ». La simplification retenue consiste en général à définir un stock de bactérie uniforme et homogène sur la surface pastorale en relation avec la charge à l'hectare. Dans ce cadre, la dispersion et la diversité des interactions locales entre bouses et écoulements, pas plus que l'effet de la dessiccation progressive, ne sont pris en considération alors qu'il s'agit de facteurs importants, contrôlant l'extraction des cellules par l'eau en mouvement (rôle de l'état physique des bouses, de l'énergie cinétique) et le transfert ultérieur des bactéries (connexion hydraulique et effets tampons lors du transport).

Les observations réalisées à Bise confirment que la distribution des déjections est hétérogène et évolutive, avec un patron spatial et temporel bien entendu lié aux parcours des troupeaux. Dans un système extensif, ceux-ci répondent à la fois à des choix en terme de planning global de pâturage et dans ce cadre, au comportement local des animaux en fonction notamment de la nature et de l'état de la végétation, paramètres qui dépendent en retour des taux de déjections antérieurs. Concrètement, on observe donc une distribution des déjections

---

<sup>156</sup> (Meals D. W., D.C.Braun (2006). Demonstration of methods to reduce E. coli runoff from dairy manure application sites. J. Environ. Qual. 35:1088- 1100.)

aléatoire à l'échelle de la station mais organisée à l'échelle alpage et selon les faciès pastoraux. Dans un autre système de pâturage, plus intensif, par exemple avec pâturage tournant, la distribution des déjections serait différente à la fois dans le temps et l'espace, générant en conséquence une toute autre potentialité de transfert.

La modélisation développée dans ce projet intègre la double variabilité de distribution des déjections décrite précédemment, grâce à des cartographies de faciès pastoraux et à des paramètres indiquant l'intensité locale d'introduction et de disparition des bouses. La modélisation prend aussi en compte l'évolution de l'état physique des déjections avec le temps, sous l'effet des remaniements par les insectes coprophages, du dessèchement ou du gel, ou encore de leur dispersion lors des averses. L'évolution physique conduit ainsi en quelques semaines d'été à une réduction du volume des bouses de 90% et fabrique un matériau résiduel sec, plus ou moins hydrophobe et qui s'avère expérimentalement peu apte à contaminer des eaux de surface, malgré un contenu bactérien persistant non négligeable.

### **7.2.2. Les réservoirs environnementaux d'*E.coli***

Nos suivis permettent d'identifier, en vraie grandeur et en conditions de pleins champs, les lieux de stockage clés des populations d'*E.coli*. Deux types de situations différentes représentent ainsi un réservoir assurant une survie et un stockage significatif: (1) sur le sol, les amas organiques constitués par les déjections récentes ; il s'agit de **stocks primaires**, et (2) dans les déjections desséchées et dans la matrice des sols, il s'agit de **stocks secondaires**. Ces 2 types de stocks se différencient par leurs effectifs (teneurs mais surtout quantités totales), leurs dynamiques (évolution au cours du temps), la structure génétique des *E.coli*, la persistance des souches STEC, et leurs potentiels de contamination des eaux (extractibilité des *E.coli* par des écoulements).

#### **7.2.2.1. Les déjections: un stockage transitoire mais significatif en terme de risque de contamination.**

Les déjections, dans l'environnement étudié, sont des lieux de survie et de stockage significatifs mais transitoires d'*E.coli* (1 à 2 mois l'été) avec une persistance hivernale sous le manteau neigeux, hors gel, jusqu'au printemps (soit 5 à 6 mois). A l'inverse, en se référant aux travaux antérieurs portant sur les végétations prairiales de la région, on peut avancer que la survie sur la végétation souillée est très limitée<sup>157</sup>.

**Les conditions topo- climatiques** qui, en montagne, introduisent des contrastes marqués dans l'intensité de certains facteurs de survie reconnus, comme la sécheresse et les UV, ne semblent pas, dans notre contexte, induire de différences significatives d'évolution du contenu bactérien des bouses entre nos sites; à noter qu'aucun véritable extrême (tels qu'adret /ubac, ou combe à neige...) n'a été testé. En fait partout, tant que l'amas organique persiste- même quand il ne s'agit plus que de débris organiques- le contenu en *E.coli* des bouses reste élevé et assez stable - autour de  $10^7$  cellules /g matières sèches, soit autant que dans le rectum des animaux . Cependant, le vieillissement des bouses se traduisant par une perte de masse, les quantités totales de bactéries stockées diminuent progressivement. Une légère réduction de la diversité génétique des sous- populations accompagne cette évolution physique, traduisant

---

<sup>157</sup> (Trévisan et al) TREVISAN D., VANSTEELANT J.Y., DORIOZ J.M., 2002. Survival and leaching of fecal micro- organisms after slurry spreading on mountain hay meadows : consequences for the management of water contamination risk. Water Research, 36, 275- 283.

une première sélection adaptative qui se réalise en quelques semaines. Toutes ces observations soulignent bien que la persistance de *E.coli* dépend étroitement de son association avec le substrat organique des déjections et d'une forme d'**effet protecteur** qui en résulte.

Un comportement analogue est observé pour les *E. coli* STEC et pour les *Pseudomonas* fluorescents: les populations se maintiennent à des teneurs constantes tant que la bouse ne disparaît pas. L'abondance systématique de *Pseudomonas* fluorescents, espèce réputée tellurique, à des teneurs élevées dans les bouses (et le rectum) est une observation inattendue. Plusieurs hypothèses peuvent être formulées. Tout d'abord, on peut supposer que ces populations rhizosphériques puissent être ingérées par les animaux lors du pâturage et seraient capables de survivre à des pH acides lors de leur passage au travers du tractus gastro-intestinal, même si elles présentent un pH optimal neutre. Mais on peut aussi envisager qu'il existe, dans les déjections bovines, des populations particulières de *Pseudomonas* fluorescents (notamment des *Pseudomonas aeruginosa*), différentes de celles retrouvées dans les sols. Une analyse de la structure génétique des *Pseudomonas* fluorescents dans les bouses et dans les sols, permettrait de vérifier s'il s'agit effectivement de populations différentes.

L'importance de **l'état physique des apports organiques** sur la survie des bactéries fécales est signalée par Vansteelant (2003)<sup>158</sup> à propos du lisier et des boues de station d'épuration après épandage sur prairies. La structuration d'amas organiques de taille centimétrique sous l'effet de la dessiccation, s'avère un facteur favorable à la survie des entérobactéries à la surface des sols. Les conditions sont encore plus favorables à la survie en cas d'apports par le pâturage puisque les déjections constituent des amas organiques d'un volume local bien plus important, apportés en particulier lors de périodes de forte dessiccation (été). Cette différence ne suffit pourtant probablement pas, à elle seule, pour expliquer le fait couramment mentionné, parfois expérimenté<sup>159</sup>, que le pâturage induit un risque de contamination supérieur aux épandages. Le pâturage implique des entrées de déjections continues sur de longues périodes associées à des sur-concentrations locales en relation avec le comportement animal, ce qui pourrait accroître la probabilité de transfert des contaminants fécaux vers les eaux.

La stabilité physique des résidus de déjections desséchées et de leurs contenus a d'autres conséquences potentielles. Les souches STEC se maintiennent sur des durées suffisamment longues (2 mois) pour envisager, une fois la bouse desséchée et fragmentée, le risque d'une auto-contamination du troupeau (porteurs sains) par une ingestion involontaire de débris organiques. Ceci attire notre attention sur l'importance des facteurs pouvant favoriser la dispersion et la survie des bactéries fécales, abondance d'animaux coprophages (insectes en particulier) ou conditions météorologiques contrôlant l'évolution de l'état physique des déjections. La persistance hivernale des résidus de déjection et des *E.coli* associés, pourraient être à tester dans ce cadre, en fonction du ralentissement des activités et dynamiques.

L'hypothèse de conditions assez favorables à la survie d'*E.coli* cultivables dans les bouses, en surface du sol est donc validée. Un paramétrage en termes de durée, de quantité et

---

<sup>158</sup> VANSTEELANT J.Y.2004 Risques microbiologiques liés aux épandages de boues de STEP et d'effluents d'élevage.- Thèse- Recherche de référence pour les zones de montagne. (Univ. Chambéry – ADEME). Soutenance dec

<sup>159</sup> Vinten A.J.A., Douglas J.T., Lewis M.N., Aitken M.N., Fenlon D.R., 2004. Relative risk of surface water pollution by *E. coli* derived from faeces of grazing animals compared to slurry application. *Soil use manag.* 20:13- 22.

de dispersion spatiale de ce stock primaire est réalisé pour notre site d'étude. La suite consiste à s'intéresser aux stocks secondaires présents dans les sols, pour notamment comprendre dans quelle mesure et selon quelles modalités cette survie primaire peut servir de sources pour une contamination secondaire des sols et des eaux. Il s'agit aussi de discuter de la possibilité que ce premier stockage soit aussi une étape de sélection de certaines (sous) populations d'*E. coli* adaptées à la persistance dans des milieux plus oligotrophes que les matières fécales.

#### **7.2.2.2. Réservoirs secondaires sols : des populations « naturalisées » et en équilibre avec la capacité biotique des sols rhizosphériques et argileux**

La mise en évidence de la persistance et de la stabilité relative de populations d'*E.coli* cultivables dans les sols étudiés va à l'encontre des connaissances acquises et des hypothèses initiales. Nous enregistrons en effet une véritable « naturalisation » de populations d'*E.coli* dans les sols au niveau : 1) des premiers cm de la surface du sol (rhizosphère) indépendamment de leur état trophique (l'écart trophique testé est important entre la Nardaie sur sol acidifié et le reposoir à Rumex sur sol très eutrophisé) : 2) d'horizons plus profonds, argileux et confinés (à circulation d'eau lente et de ce fait temporairement anoxiques). A l'inverse, dans les horizons profonds et filtrants la présence d'*E.coli* est sporadique, liée à des déjections récentes et probablement contrôlée par les conditions édaphiques. La souche STEC montre un comportement particulier: alors qu'elle persiste dans les déjections, elle ne survit dans aucun sol de façon prolongée. Les STEC ne sont donc détectés dans les réservoirs sols que temporairement et uniquement en dessous de déjections récentes.

Une survie temporaire (souvent quelques semaines) de populations de contaminants fécaux dont *E.coli*, dans les sols à l'issue d'épandages de lisier ou autre produit organique, est bien connue, y compris dans les sols de la région. La survie est très dépendante des conditions d'humidité des sols, des textures... elle est favorisée dans les matériaux à fortes teneurs en matières organiques du fait d'un meilleur état trophique. Avery et al. (2004)<sup>160</sup>, dans une des rares études - à notre connaissance- consacrée à la survie de bactéries fécales en zone pâturée, enregistrent une persistance d'*E.coli* dans le sol pouvant atteindre 5 mois. Il est également bien établi que, d'une façon générale, la présence de végétaux et de racines a un impact majeur sur l'écologie des bactéries du sol<sup>161</sup>, la rhizosphère représentant un habitat microbien spécifique favorable, du fait de l'abondance d'exsudats racinaires qui permettent certes des proliférations de bactéries telluriques mais aussi la survie de certains pathogènes de l'homme ou de l'animal. D'autres propriétés de la rhizosphère semblent au contraire pouvoir limiter cette survie: divers auteurs mentionnent la production d'antibiotiques bactériens (tels que les phloroglucinols) au niveau de la rhizosphère qui affecteraient la survie des entérobactéries notamment d'*E.coli*.

Le résultat inattendu n'est donc pas la survie préférentielle de populations de *E.coli* dans la zone de surface riche en racines et matières organiques et dans les horizons de sub- surface argileux, mais la stabilité des teneurs enregistrées (autour de  $10^4$  cellules  $g^{-1}$  MS sol) et donc des stocks, tout au long de la saison, hiver compris, indépendamment des entrées et de leurs variabilités stationnelles et saisonnières, indépendamment du type de sol et de végétation, de la proximité géographique de déjections récentes (sauf rares exceptions).

---

<sup>160</sup> Avery S.M., A. Moore, and M.L. Hutchison. 2004. Fate of Escherichia coli originating from livestock faeces deposited directly onto pasture. Lett. Appl. Microbiol. 38:355- 359.

<sup>161</sup> Troxler, J., M. Zala, A. Natsch, Y. Moënne- Loccoz, and G. Défago. 1997. Autecology of the biocontrol strain *Pseudomonas fluorescens* CHA0 in the rhizosphere and inside roots at later stages of plant development. FEMS Microbiol. Ecol. 23:119- 130.

La **structure génétique** de ces populations s'avère spécifique et bien différente de celles des populations des bouses, avec notamment dans les stations les moins fréquentées par les animaux, l'existence d'un profil dominant. Tout ceci permet de proposer l'idée que les stocks secondaires sont constitués de *E.coli* naturalisés. Cette possibilité pour *E.coli* de s'installer durablement dans certains sol est un fait relativement nouveau, mentionné par peu d'auteurs<sup>162,163</sup> et caractérisé de façon détaillée dans le cadre du projet Pastor.

Le concept de **capacité biotique** semble convenir pour rendre compte de cet état de quasi- stabilité observé durant 2 années consécutives. Il rend compte de l'existence pour certains types de microorganismes d'un équilibre dynamique associé à une capacité d'accueil limitée du milieu. Une inoculation supérieure à cette capacité limite la survie des populations nouvellement introduites (contraintes d'accès aux nutriments, colonisation des macropores ce qui expose au lessivage et à la prédation...). Inversement, au dessous d'une certaine densité, la population ne se maintient plus, d'où la stabilité des teneurs. Un tel comportement contraste avec celui des *Pseudomonas* fluorescents dont les effectifs, qui sont toujours 10 à 1000 plus élevés que ceux d'*E. coli* dans les même situations de milieu, sont très fluctuants, signe d'une stratégie totalement différente, de type « opportuniste ».

La capacité biotique permettant la naturalisation des *E.coli* semble dépendre de caractéristiques bien différenciées des horizons concernés en l'occurrence, fortes teneurs organiques indépendamment de l'acidité, ou texture très argileuse. Ceci suggère une survie durable associée à la combinaison de conditions abiotiques favorables (molécules organiques simples...) et de facteurs structuraux déterminant des microsites permettant d'échapper à la prédation et aux autres interactions biotiques reconnues comme prépondérantes dans le contrôle des populations introduites. L'absence de relation observable dans le cadre des suivis disponibles, entre ce stock naturalisé et la présence récente (mois) ou l'abondance moyenne annuelle de déjections, suggère, soit des transferts peu intenses mais sur le long terme, soit des transferts s'opérant hors de la fenêtre saisonnière d'observation intensive. La dispersion des déjections vers la matrice du sol pourrait en particulier résulter, non seulement de l'activité de la faune<sup>164</sup>, mais aussi de transferts hydriques particulièrement actifs en montagne en période d'imprégnation générale des sols par l'eau de fonte des neiges.

Il existe donc une population de *E.coli* naturalisée et pérenne présente dans tous les horizons de surface des sols de la zone pâturée, qui ne s'observe pas hors de cette zone et ne s'estompe pas pendant l'hiver. Le stock ainsi constitué est quantitativement largement supérieur à celui des déjections (environ 1000 fois plus grand).

La spécialisation et la naturalisation de populations dans le sol semblent nécessiter 1) une inoculation continue de bactéries, 2) la présence de microsites refuges 3) l'apport régulier de substrats organiques et 4) un laps de temps suffisant pour que les populations ainsi protégées et alimentées puissent exprimer un métabolisme adaptatif. Ces conditions sont

---

<sup>162</sup> Y Byappanahalli, M. N., R. L. Whitman, D.A. Shively, M. J. Sadowsky, and S. Ishii. 2006. Population structure, persistence, and seasonality of autochthonous *Escherichia coli* in temperate, coastal forest soil from a Great Lakes watershed. Environ. Microbiol. 8: 504- 513.

<sup>163</sup> Z Ishii, S., W. B. Ksoll, R. E. Hicks, and M. J. Sadowsky. 2006. Presence and growth of naturalized *Escherichia coli* in temperate soils from Lake Superior watersheds. Appl. Environ. Microbiol. 72: 612- 621

<sup>164</sup> Williams A.P., L.M. Avery, K. Killham, and D.L. Jones. 2007. Survival of *Escherichia coli* O157:H7 in the rhizosphere of maize grown in waste- amended soil. J. Appl. Microbiol. 102:319- 326.

réunies dans le cas de prairies pâturées où la bouse est un facteur de co- introduction chronique de bactéries et de substrats protecteurs. Mais les mécanismes de cette naturalisation et l'état de cette population soumise à des stress répétés mais qui reste en partie au moins cultivable, restent à investiguer. La mesure de **l'expression de gènes marqueurs** des phases de croissance et stationnaire des *E.coli* semble, d'après les résultats de notre recherche méthodologique, représenter une piste prometteuse pour l'étude de ces phénomènes.

### **7.2.3. Analyse de la structure génétique des populations d'*E.coli* : mise en évidence de populations présentant des comportements écologiques différents dans les réservoirs primaires et secondaires**

L'étude de la structure génétique des populations d'*E.coli* dans les différents compartiments étudiés confirme la complexité généralement reportée<sup>146</sup> des populations naturelles d'*E. coli* : 22 allèles *uidA* différents sont observés par PCR DGGE, autant dans les matières fécales initiales que dans les divers réservoirs environnementaux. Une **diversité** importante des populations pathogènes d'*E.coli* est également décrite puisque, sur 75 isolats STEC, 8 clones différents appartenant à 6 sérotypes distincts sont obtenus.

La diversité est plus faible dans les matières fécales d'animaux sauvages (bouquetins, marmottes, renards). Tous les allèles *uidA* observés chez ces animaux sauvages sont présents chez les bovins voisins ce qui permet d'envisager l'échange de populations d'*E.coli* entre animaux à sang chaud dans l'alpage, via l'ingestion accidentelle de débris de matières fécales.

La structure génétique des populations d'*E.coli* varie selon les conditions et lieux de survie. Comme signalé précédemment, la diversité infraspécifique des populations cultivables d'*E. coli* diminue déjà légèrement au cours du vieillissement de la bouse, probablement en relation avec un premier niveau de sélection conduisant au déclin de certains clones et/ou leur entrée dans un état viable mais non cultivable (VBNC). La comparaison de la structure des populations d'*E.coli* issues de matières fécales, suite à une extraction directe de l'ADN ou à une culture d'enrichissement, suggère d'ailleurs que certaines sous- populations d'*E.coli* seraient dans un état VBNC dès le rectum puis, de façon plus fréquente, lors du vieillissement de la bouse.

Nos travaux mettent aussi en évidence la capacité de certaines sous- populations d'*E.coli* à s'établir durablement dans des sols. Dans les stations peu pâturées (marais, nardaie) où l'apport de bouses en surface est très limité, une structure similaire de population naturalisée est observée dans tous les échantillons de sols, suggérant l'existence de mécanismes de sélection/adaptation d'*E.coli* aux conditions oligotrophes de ces sols. Les sous- populations STEC à l'inverse, ne persistent pas ailleurs que dans les déjections (1/4 des bouses est contaminé). Elles sont fréquentes dans les eaux recueillies en été à l'exutoire du bassin versant (signal positif par PCR sur les gènes *stx* sur l'ensemble des échantillons). Toutefois, la caractérisation moléculaire de souches STEC isolées sur l'alpage a révélé qu'aucune ne présente les gènes de virulence *eae* et *ehx* qui semblent requis pour l'expression de la pathogénie.

### **7.3. Acquisition de la charge en *E.coli* des eaux de surface: des réservoirs environnementaux (stocks) aux eaux, à l'exutoire du bassin versant.**

Le transfert d'*E.coli* des stocks à l'exutoire résulte de mouvements latéraux (ruissellements) et de mouvements verticaux (infiltrations, percolations) de l'eau,



mouvements qui transfèrent des flux d'eau et de bactéries différents. Ainsi, durant la saison pastorale, l'écoulement de base du bassin de Bise associé à des mouvements verticaux d'eau, représente environ 80% du volume acheminé à l'exutoire, pour une contribution au transfert de bactéries d'à peine 5%.

### **7.3.1. Flux verticaux**

Plusieurs états du système étudié traduisent l'existence de transferts verticaux de bactéries, associés à des flux de percolation de l'eau.

- 1) Au niveau du sol : les évolutions des stocks de bactéries fécales dans les horizons profonds sont différents selon le comportement hydrique des sols.

- Les seules situations de notre site d'étude où des populations d'*E. coli* se maintiennent durablement en profondeur dans le sol, dans une dynamique de stock pilotée par la capacité biotique du milieu, sont des horizons argileux à fonctionnements confinés (donc relativement riches en matières organiques et en eau, donc minimum en termes de stress trophiques et hydriques).

- Dans les situations d'horizons profonds drainant, à fonctionnement ouvert (tels les matériaux à forte porosité d'assemblage du cône de déjection, ou encore les horizons de sols acidifiés et perméables) les stocks bactériens sont transitoires et ne s'observent que lorsque les bouses sont présentes à la surface des sols. Les populations présentes dans le sol offrent des caractéristiques enzymatiques pour la  $\beta$ - D glucuronidase voisines de celles des déjections. D'autres approches confirment l'existence de transferts verticaux des *E. coli*, des bouses récentes vers ces horizons : la comparaison génétique des *E. coli* (clonage séquençage) ; la DGGE- uidA et la comparaison des profils PFGE de souches STEC isolées de fèces et de sols drainants sous- jacents. Les *E. coli* STEC, utilisées comme traceur des mouvements bactériens, sont clairement mises en évidence dans ces situations particulières d'horizons profonds connectés à la surface par les mouvements d'eau, tant que des matières fécales sont présentes à la surface des sols.

Tout ceci atteste l'existence de mouvements verticaux de *E. coli* attribuables à un transfert hydrique à partir des déjections. Dans ces horizons profonds les conditions de survie sont moins bonnes que dans les milieux confinés équivalents (substrats carbonés plus limités, stress hydriques et/ou toxicité aluminique). Les colonies bactériennes introduites en profondeur par les lames d'eau de drainage, ne peuvent donc pas y persister, car ne rencontrant probablement ni les microsites ni les conditions minimum requises pour leur activité métabolique.

- 2) Au niveau bassin versant : certaines évolutions teneurs en *E. coli* - débits semblent liées à des transferts verticaux. C'est le cas des pics de teneurs en *E. coli* enregistrés à l'exutoire en fin de tarissements, plusieurs jours après les crues estivales. Ces pics sont quantitativement significatifs puisqu'ils représentent environ 10% du flux total de coli de la période estivale. Leur développement dans le temps (à débit constant ou un peu décroissant) est analogue aux variabilités bactériennes observées, en condition de laboratoire, en sortie de lysimètres ou de colonnes de sols<sup>165</sup>. La forme du phénomène est d'ailleurs assez typique des

---

<sup>165</sup> S. - B. Kim, M. Y. Corapcioglu, 2002. Contaminant transport in dual- porosity media with dissolved organic matter and bacteria present as mobile colloids Journal of Contaminant Hydrology 59 267–289.

transferts colloïdaux par advection – dispersion (montée et descente progressives)<sup>166</sup>. Dans la mesure où ces transferts nécessitent une porosité du matériau suffisante pour permettre le libre passage des colloïdes et cellules bactériennes et limiter ainsi les phénomènes de rétention bactérienne<sup>167</sup>, on peut raisonnablement penser que les secteurs contribuant à ces transferts correspondent aux terrains les plus perméables de la zone pastorale (cône de déjection, éboulis grossiers fixés). C'est précisément dans cette situation que les fluctuations quantitatives des populations bactériennes des horizons profonds et leur signature génétique, indiquent des mouvements verticaux d'eau.

### **7.3.2. Flux latéraux**

#### **7.3.2.1. Effets du ruissellement sur les divers types de stocks et relation flux- stocks**

Les mouvements latéraux de l'eau sont à l'origine de l'essentiel du flux bactérien à l'exutoire. Ils correspondent majoritairement à des transferts associés aux ruissellements de surface et sub- surface, fonctionnement assez typique des contextes de prairie<sup>168</sup>.

L'importance quantitative de la contribution du ruissellement au débit en période de crue, est clairement mise en évidence par le suivi et le traçage géochimique de l'écoulement à l'exutoire. Les flux de bactéries associés sont cependant d'intensités très différentes selon l'origine du ruissellement, du à la fonte des neiges ou lié à l'activité hydrologique de sources variables à la faveur de pluies estivales. Une analyse détaillée montre qu'il n'existe pas de relation directe simple entre flux de *E.coli* à l'exutoire et stocks sur le bassin.

Dans le cas des masses d'eau transférées lors de la fonte des neiges, les concentrations sont faibles, de 1 à 10 / 100ml un ordre de grandeur 1000 à 10 000 fois inférieur à celui des crues de la période pastorale. Ces faibles teneurs des eaux ne sont pas liées à un effet dilution (les teneurs sont du même ordre de grandeur depuis la fin de l'automne précédent et le débit en période de fonte est inférieur à celui des crues estivales). Les teneurs s'expliquent non plus par l'absence de stocks mais par la faible labilité de ceux- ci.

- Les stocks de bactéries naturalisées dans tous les horizons rhizosphériques de surface des stations pastorales, sont peu mobilisables, malgré leur importance quantitative, malgré l'imprégnation générale d'eau et la généralisation du ruissellement lors de la fonte des neige. Ils ne semblaient pas l'être non plus par percolation dans les sols drainants. Notons enfin que pour des surfaces de sols exemptes de déjections, le ruissellement expérimental obtenu sous pluie simulée, s'est également révélé très peu chargé en *E.coli* (en moyenne seulement quelques cellules pour 100ml). Seule une fraction infime du stock situé dans les premiers centimètres de sol est donc susceptible d'être remobilisée par le ruissellement.

- Les stocks bactériens des résidus de bouses de fin d'hiver sont également peu mobilisables, bien que celles- ci renferment une quantité d'*E.coli* non négligeable. C'est probablement l'évolution de l'état physique des dépôts fécaux avant l'hiver, qui rend leur contenu en *E.coli* peu extractible par le ruissellement.

---

<sup>166</sup> Hendry, M. J., Lawrence, J. R., Maloszewski, P., 1999. Effects of velocity on the transport of two bacteria through saturated sand. *Ground Water* 37 (1), 103– 112.

<sup>167</sup> Coats, K. H., Smith, B. D., 1964. Dead- end pore volume and dispersion in porous media. *Soc. Pet. Eng. J.* 4, 73– 84.

<sup>168</sup> Collins R., 2003. Fecal contamination of pastoral wetlands. *J. Environ. Qual.*, 33:1912- 1918.

En fait, les seuls **stocks labiles** significatifs se trouvent dans les bouses fraîchement déposées. Nos calculs issus de la modélisation montrent que ces bouses expliquent l'essentiel du flux bactérien. Plusieurs autres faits corroborent ce résultat, notamment la relation établie expérimentalement, entre intensité des exportations bactériennes fécales et vieillissement des bouses. La progression aval amont de la contamination par *E.coli* des eaux courantes lors de l'arrivée des troupeaux, parallèlement à l'accroissement de la zone pâturée, constitue un autre élément de démonstration. Enfin et surtout, nous disposons des informations fournies par l'étude des signatures génétiques: les *E.coli* de l'exutoire offrent toujours des profils DGGE très proches de ceux provenant de déjections récentes (quelques semaines) qui de ce fait apparaissent bien comme la principale source de contamination de l'eau à l'exutoire.

### **7.3.2.2. Zones contributives hydrologiques et « sources critiques » du bassin versant.**

Une part seulement du bassin versant, les sources critiques, contribue au transfert d'*E.coli* vers l'exutoire lors des épisodes clés que sont les crues. Ces sources critiques présentent à la fois du ruissellement et un stock de bactéries fécales extractibles, deux caractéristiques qui varient selon l'époque de l'année, la topographie et la météorologie. Il peut d'ailleurs exister un lien entre ruissellement et stock extractible puisque le fonctionnement hydrique est, dans une certaine mesure, un facteur de qualité des herbages et donc de distribution des déjections.

La quantité totale de bactéries susceptibles d'être extraites par les écoulements évolue fortement dans le temps et dans l'espace. Elle demeure très élevée durant toute la période estivale en relation avec un apport quotidien en bouses fraîches par le troupeau mais décroît rapidement dès le départ du troupeau, avec le croûtage des bouses. Le stock perdurant pour toute la saison froide jusqu'à la période de fonte printanière est peu labile. Le facteur labilité du stock associé aux déjections est crucial : il explique la forte réponse du bassin étudié à la présence ou absence du troupeau, en l'occurrence l'accentuation des exportations à l'exutoire de bactéries fécales dès la mise en pâture des surfaces et un retour rapide à des teneurs faibles dans la quinzaine qui suit le départ des troupeaux, ainsi que le faible niveau de contamination en fonte des neiges malgré un ruissellement quasi généralisé. Ce comportement est probablement typique des systèmes extensifs.

Les simulations réalisées dans le cadre de l'alpage de Bise montrent que, lors des crues estivales types, la quantité de bactéries extraites et mobilisées, i.e. la quantité de bactéries mises en suspension dans les lames de ruissellement et exportées, ne représente en fait qu'une part infime du total des bactéries extractibles de l'ensemble des bouses, de l'ordre de quelques % à ‰ soit quelques dizaines à quelques centaines de bouses (environ une à deux journées de déjection du troupeau). La surface des zones contributives est restreinte (à peine quelques Ha). Elles sont situées soit dans l'environnement proche (quelques dizaines de mètres) des berges des cours d'eau permanents avec de faibles périodes de retour et sont plutôt concentrées dans les secteurs avals du bassin versant, soit associées aux exutoires de talwegs plus en amont, de période de retour plus forte. Le facteur crucial pendant la saison pastorale est l'extension des zones contributives dans la zone pastorale (zones hydrologiquement actives du fait de la saturation en eau des sols).

Les mesures correctives pour le contrôle et la limitation des flux doivent être adaptées en fonction de ces connaissances sur les zones contributives et leur évolution saisonnière (extension, distribution et de densité de bouses fraîches...). Pour le bassin de Bise les zones contributives déterminantes et qui probablement fixent le niveau de la contamination moyen,

sont celles qui présentent la probabilité la plus élevée de ruissellement et la fréquentation la plus régulière par les animaux.

## **7.4. Essai de synthèse: régime d'exportations et système de transfert.**

### **7.4.1. Le système de transfert d' *E.coli* à l'échelle bassin versant.**

La base de connaissance disponible, à partir de Pastor et de la bibliographie est suffisante pour tenter de conceptualiser le fonctionnement d'un bassin versant pastoral en tant que système de transfert d'un polluant bactérien, *E. coli*. Cette opération consiste concrètement à construire une représentation simplifiée de l'objet bassin versant qui permette d'associer qualitativement, fonctionnements clés (tels que les processus impliqués dans le stockage et le transfert), compartimentation fonctionnelle et régime d'exportation à l'exutoire (intensité durée, fréquence, type de signal...). Le schéma proposé intègre à la fois les fonctionnements mis en évidence à Bise et les hypothèses construites à partir de la littérature disponible.

Quelque soit la pollution considérée, le système de transfert (fig 35) résulte principalement du couplage entre: des processus qui assurent la dispersion et la répartition du polluant dans l'espace et dans le temps, des processus qui contrôlent son stockage, sa transformation éventuelle, et des processus réalisant le transfert vers l'exutoire. Dans ce cadre, la structure du bassin versant est interprétée comme un ensemble de compartiments de stockage du polluant, avec des localisations préférentielles, par exemple au niveau des sols et/ou des sédiments. Les divers stocks sont plus ou moins mobilisés par les diverses modalités d'écoulements des eaux et plus ou moins connectés hydrologiquement à l'exutoire, selon leurs positions vis à vis des zones hydrologiquement actives du bassin. Le signal enregistré à l'exutoire est le résultat combiné de la dispersion, des dynamiques de stockage, de l'action extractante des écoulements sur les stocks et des effets du transport dans le réseau hydrographique. Ces composantes du fonctionnement sont indépendantes mais leurs variabilités peuvent relever en partie de déterminismes communs (saison...). En outre, pour nombre de polluants, le transport n'est pas un phénomène passif: il existe souvent des possibilités de rétentions (sédiments, biofilms...) et de transformations de la charge polluante. L'intensité de ceux ci dépend du temps de transfert et de l'hydrodynamique.

Dans le cas de pollution étudiée (fig 36), la circulation et le comportement des troupeaux pilotent les **entrées** de *E.coli* associées aux déjections. Le bassin versant accueille divers **stocks durables de *E.coli*** dans divers types de réservoirs environnementaux (déjections, rhizosphère, certains sols, aquifères). Pendant ces stockages, divers processus biologiques à cinétique lentes (mois) se développent (survie, adaptations écophysiologicals, modifications de la structure génétique des populations...). Les stocks semblent interconnectés par des transferts hydriques et biologiques. Enfin, les phénomènes associés aux transports par les écoulements se caractérisent par des cinétiques rapides (jours); la bactérie n'est alors qu'un colloïde relativement inerte et plus ou moins agrégé à des éléments organiques et minéraux.

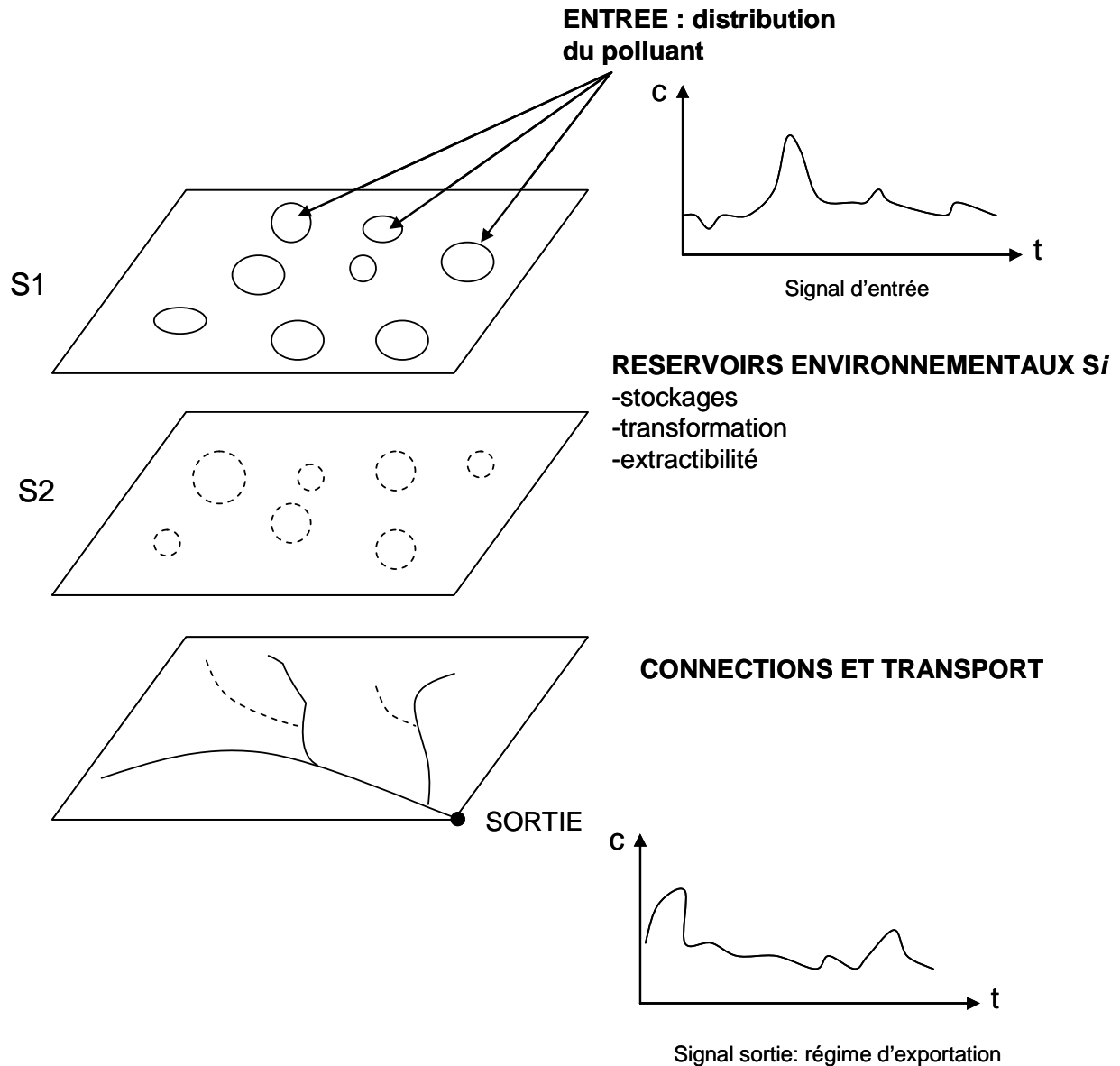


Fig. 35. Organisation générale du système de transfert d'un polluant.

#### 7. 4.2. Facteurs de variabilités du fonctionnement et couplages de processus.

La **matière organique** fraîche ou humifiée joue un rôle clé dans l'élaboration et l'évolution des stocks environnementaux de *E. coli*. Elle permet les stockages de relativement longues durées (mois) au niveau des déjections et contrôle en partie la capacité biotique de certains horizons de sols pour les stockages de très longues durées (années). De nombreux points restent à éclaircir au sujet de ces mécanismes de stockages mais il semble qu'une attention particulière devrait être portée à : 1) l'évolution de l'état physique des substrats organiques constituant les déjections qui conditionne l'extractibilité par les écoulements 2) l'effet du gel et de la couverture neigeuse (qui pourrait rallonger la durée de certains stockages). Enfin, la contamination des sols d'alpage (et probablement des eaux) existant

depuis des siècles, on peut s'interroger sur un possible effet spécifique due à l'ancienneté de la présence de troupeaux.

Le **stockage dans l'environnement** de *E. coli* n'est pas un phénomène homogène: il existe des différenciations en termes d'époques, de localisation et de propriétés (fig.36). Nous avons distingué à Bise: les **stocks éphémères** dus à l'injection directe de bactéries fécales dans les eaux courantes (accès des animaux à la rivière), des **stocks primaires**, transitoires, associés aux déjections sur les sols, abondants seulement pendant la saison pastorale, relativement facilement mobilisables surtout peu après leurs dépôts, mais décroissant et peu durables, et enfin des **stocks secondaires** abondants, stabilisés mais peu labiles, situés dans certains horizons des sols. Un stock significatif pourrait également, en théorie, exister au niveau des sédiments et des biofilms dans les situations où l'hydrodynamique s'y prête, c'est-à-dire hors régime torrentiel. Tous ces stocks de *E.coli* bien qu'ayant une origine commune, ne présentent pas exactement les mêmes sous- populations bactériennes puisqu'un stockage durable s'accompagne d'une évolution de la **structure génétique** des populations.

Le **ruissellement** notamment sur zone imperméabilisée du fait du piétinement et sur sol saturé en eau, apparaît comme l'agent essentiel d'extraction des bactéries fécales. Les stocks labiles dans ce contexte sont situés en surface des sols. Le mécanisme présumé est un détachement et une mise en suspension de bactéries fixées ou non sur un support. La prédominance du ruissellement n'exclut pas une contribution de l'**infiltration** dans le cas de sols perméables.

D'une façon générale, l'**efficacité des extractions** dépend de la relation bactéries-supports et donc de la nature et de l'état physique de celui-ci. L'extraction peut être très faible malgré des stocks élevés: dans la zone étudiée c'est le cas des stocks des horizons rhizosphériques ou des bouses desséchées. La microporosité des sols, les phénomènes d'adhésion, la cohérence physique et la mouillabilité des matériaux, sont autant de phénomènes susceptibles d'expliquer des faibles rendements d'extraction par les écoulements. La baisse de l'extractibilité observée lors du vieillissement des déjections est décrite dans d'autres contextes<sup>169</sup>. L'effet est peut être exacerbé en conditions de montagne, compte tenu du fort rayonnement UV, par ailleurs bien connu comme facteur de mortalité des bactéries à la surface des végétations<sup>170</sup>, des sols<sup>171</sup> et des bouses<sup>172</sup>.

Les **facteurs de variabilité** du fonctionnement de système de transfert (fig. 36) relèvent donc de 3 grandes catégories : circulation des troupeaux, état des divers types de stocks, nature des écoulements préférentiels. Les conditions hydrologiques constituent une source de variabilité supplémentaire car elles pilotent l'**extension des zones saturées** et de ce fait, l'intensité globale du ruissellement et la connexion hydraulique avec l'exutoire. Lors du transport par les eaux de ruissellements, des rétentions peuvent se produire, mais ce type d'effet tampon est encore mal documenté.

---

<sup>169</sup> Collins R., Elliott S., Adams R., 2005. Overland flow delivery of faecal bacteria to a headwater pastoral stream, J. Applied Microbiol. 99,126- 132.

<sup>170</sup> Knudsen G. R., 1991. Models for the survival of bacteria applied to the foliage of crops plants. In. Modelling the environmental fate of microorganisms, J. Hurst Ed, Am. Soc. for Microbiol., 191- 217.

<sup>171</sup> Vansteelant J. Y., 2004. Evaluation des risques de contamination microbiologiques liés aux épandages de matières organiques sur prairie de montagne, Thèse Doc. Univ. Savoie, Chambéry, 171p.

<sup>172</sup> Kress, M., G. F. Gifford, 1984. Fecal coliform release from cattle fecal deposits. Water Resour. Bull. 20:61-66.

### 7.4.3. Régime d'exportations.

#### 1. Distribution de la pression pastorale

#### 2. Distribution et états des Stocks primaires

S1. Déjections récentes

#### 3. Distribution états des Stocks secondaires (stocks stabilisés)

S2<sub>1</sub>. Déjections évoluées

S2<sub>2</sub>. Rhizosphères

S2<sub>3</sub>. Horizons profonds argileux

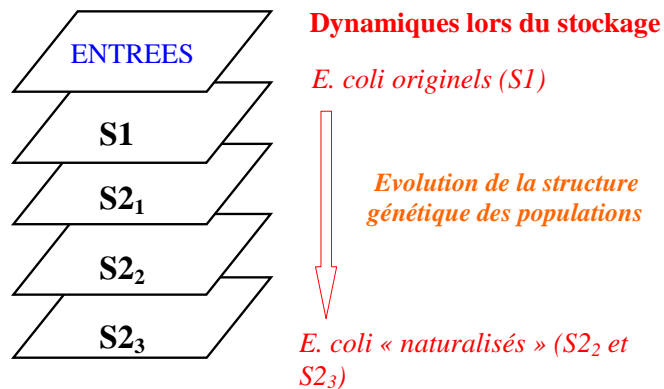


Fig.36. Organisation générale du système de transfert de *E. coli* à l'échelle faïens pastoral.

A l'exutoire, malgré les nombreuses sources de variabilité du système de transfert, le **régime des exportations** n'est pas aléatoire. Il s'organise en fait autour d'un petit nombre d'épisodes types (crue, tarissement, fonte des neiges...) qui représentent les états les plus fréquents du système de transfert (fig.37) et une certaine synchronisation saisonnière des variables clés pilotant son fonctionnement (hydrométéorologie, sols, troupeaux). Ces variables déterminent l'extension et la distribution des sources critiques du bassin au temps  $t$  c'est à dire des surfaces présentant à la fois des stocks significatifs de contaminants bactériens mobilisables, un potentiel de ruissellement et des connexions hydrologiques.

La localisation des zones contributives varie au cours du cycle saisonnier. En période pastorale, dans le site étudié, elles sont situées : (1) en période d'étiage, dans le réseau hydrographique lui-même, avec ses stocks éphémères; (2) lors des crues, dans les zones imperméabilisées et ou saturées, avec des signaux à l'exutoire variables en intensité. Hors saison pastorale et particulièrement en automne et à la fonte des neiges, les sols se saturent et c'est l'ensemble de la zone pastorale qui est active avec une contamination très faible mais fréquente qui s'explique par des stocks non négligeables mais peu labiles, et du bruit de fond naturel. La portée générale de ces scénarios reste à vérifier dans d'autres conditions pédoclimatiques.

## 8. Portée opérationnelle des résultats obtenus.

Le travail réalisé apporte des éléments de réflexion pour des développements opérationnels relatifs à (1) l'analyse de la valeur indicatrice d'*E.coli* en tant que traceur environnemental des contaminations fécales (2) l'importance des systèmes pastoraux dans l'exposition humaine aux STEC (3) la définition des moyens de lutte et de prévention des contaminations microbiologiques associées au pâturage. Dans l'état actuel, notre présentation se limite à un

premier cadrage sur la détermination des périodes à risques et la délimitation des zones contributives et des perspectives de recherche sur les indicateurs.

## 1. FONCTIONNEMENTS ESTIVAUX

## 2. AUTRES FONCTIONNEMENTS

(FONTE DES NEIGES, AUTOMNE, HIVER)

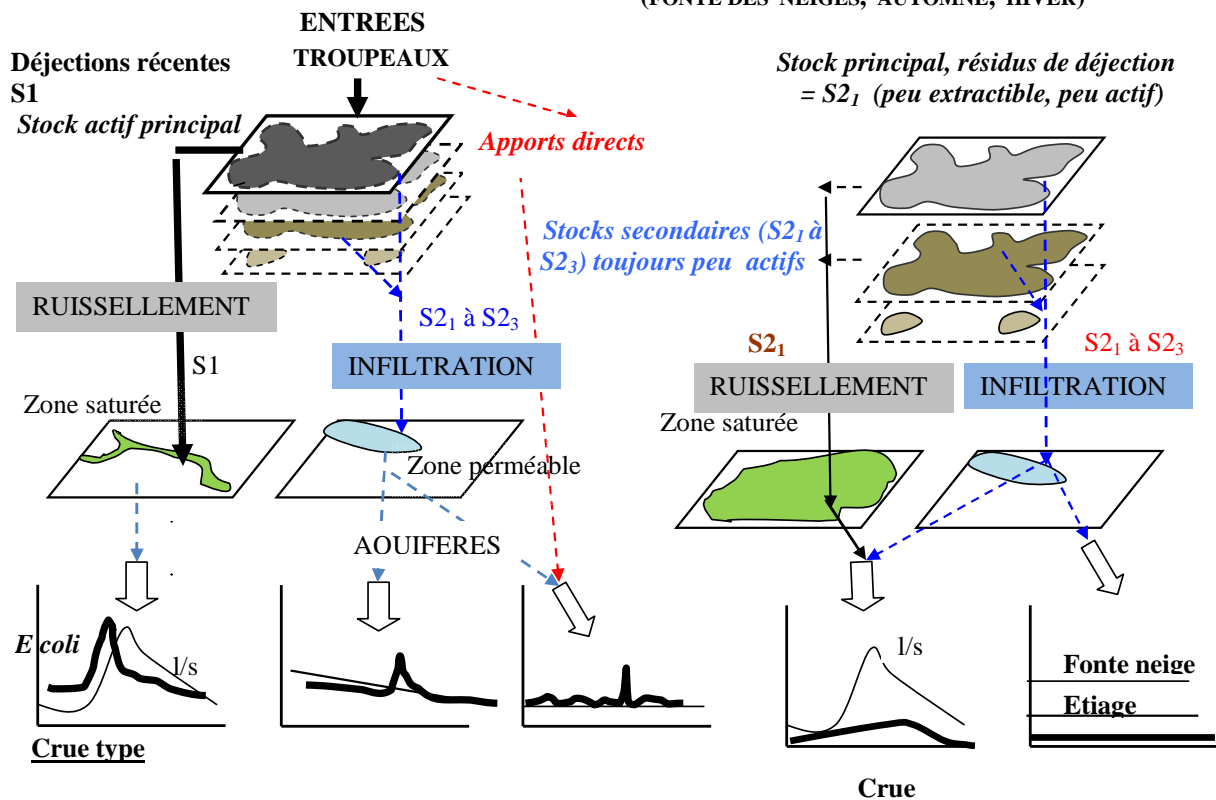


Fig. 37. Fonctionnements types du système de transfert de *E.coli*, référence au site étudié.

### 8.1. Principaux modes de transmission et rôle des systèmes pastoraux dans l'exposition humaine aux STEC

En période estivale, les eaux recueillies à l'exutoire du bassin versant sont fréquemment contaminées par des STEC. Bien que les niveaux de populations soient toujours inférieurs à 200 UFC ml d'eau, la qualité microbiologique des eaux de montagne est à nouveau remise en question par ces résultats et les risques sanitaires associés à leur consommation réels, car les doses infectieuses pour ce type de pathogènes sont faibles (inférieures à 10 pour les *E. coli* 0157:H7).

Ces résultats complétés par la bibliographie disponible (AFSSA, 2003), aident à construire une **analyse de risque** spécifique des systèmes pastoraux de type alpage, présentée figure 38. Les principaux flux de STEC entre le réservoir animal et l'homme représentés sur cette figure, sont des potentiels qui n'ont pas fait l'objet de mesures particulières dans notre site d'étude.



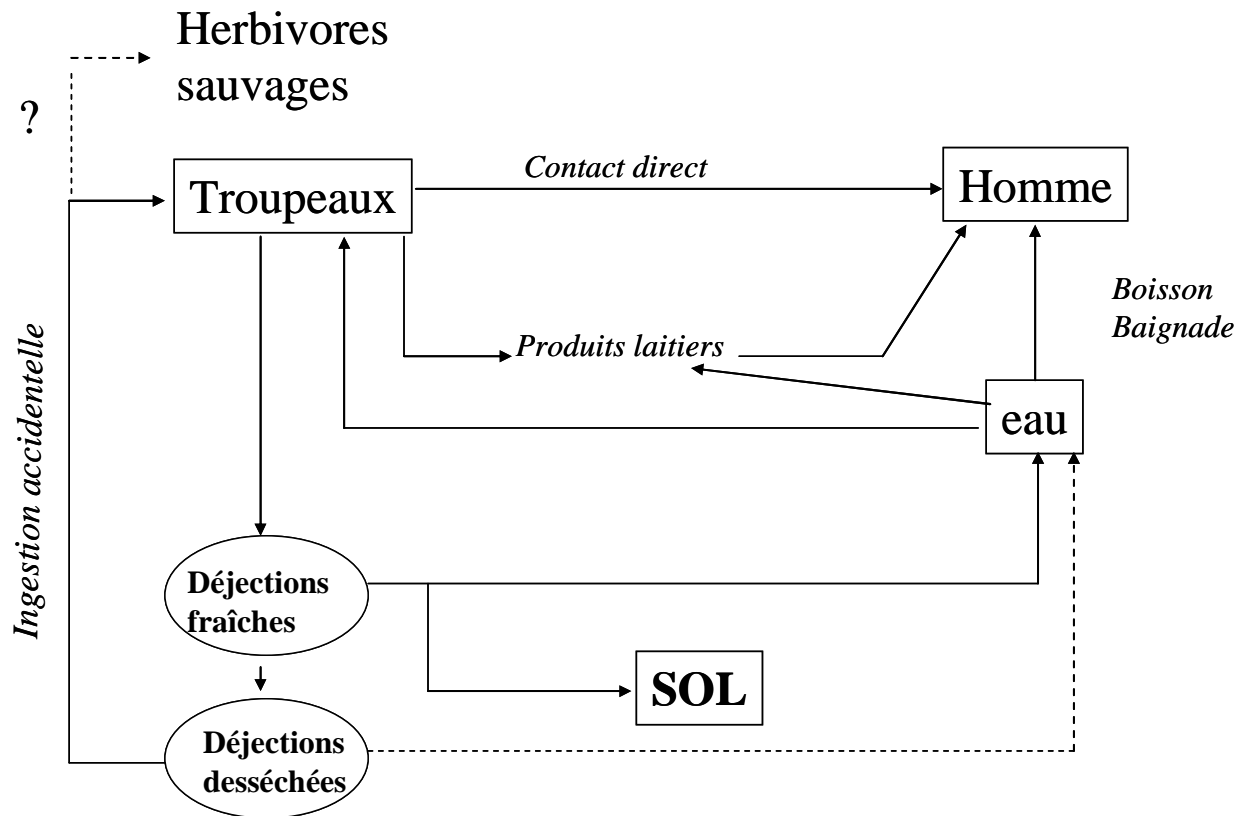


Fig.38. Rôle des systèmes pastoraux; flux potentiels de STEC entre réservoirs environnementaux et l'homme.

Les connaissances générales sur les modes de transmission et les sources de contamination à STEC reposent principalement sur des études d'épidémiologie analytique et des investigations d'épidémie. A l'heure actuelle, les 4 principales voies d'infection connues sont : l'ingestion d'aliments, la transmission hydrique, la transmission inter- humaine et le contact avec les animaux de ferme et leur environnement.

Les divers risques théoriques associés au système pastoral résulteraient donc de :

- la consommation d'eau de surface ; la littérature décrit des cas d'infections à partir de puits, d'eau de source privée et d'eau de distribution non traitée ou d'ingestion accidentelle d'eau lors de baignades<sup>173</sup> ; l'hypothèse d'un risque de cette nature pour randonneurs semble plausible ;
- la transmission de STEC par contact direct ou indirect avec des animaux de ferme ou leurs déjections<sup>174</sup> ; les bovins sont des porteurs sains ;

<sup>173</sup> Mannix, M., O'Connell, N., McNamara, E., Fitzgerald, A., Prendiville, T., Norris, T., Greally, T., Fitzgerald, R., Whyte, D., Barron, D., Monaghan, R., Whelan, E., Carroll, A., Curtin, A., Collins, C., Quinn, J., O'Dea, F., O'Riordan, M., Buckley, J., McCarthy, J. et Mc Keown, P. 2005. Large *E. coli* O157 outbreak in Ireland, October- November 2005. Euro Surveill 10, 51222- 51223.

<sup>174</sup> Mannix, M., O'Connell, N., McNamara, E., Fitzgerald, A., Prendiville, T., Norris, T., Greally, T., Fitzgerald, R., Whyte, D., Barron, D., Monaghan, R., Whelan, E., Carroll, A., Curtin, A., Collins, C., Quinn, J., O'Dea, F., O'Riordan, M., Buckley, J., McCarthy, J. et Mc Keown, P. 2005. Large *E. coli* O157 outbreak in Ireland, October- November 2005. Euro Surveill 10, 51222- 51223.

- contacts avec des sols contaminés par les déjections ; nos observations montrent pourtant une très faible persistance de cette souche dans les sols, ce qui nous incite à penser que ce risque est plutôt négligeable dans notre contexte.
- la consommation de produits laitiers contaminés, en relation avec l'usage d'une eau contaminée ou de lait contaminé lors de la traite; l'eau privée étant considérée comme facteur de risque de contamination par les STEC, l'évaluation de ce risque est à faire ;

A noter également, l'exposition des troupeaux à l'auto- contamination notamment à partir de l'eau de boisson mais peut être aussi de la consommation involontaire de fragments de déjections desséchées (survie assez longue des STEC dans les déjections et à des effectifs de l'ordre de  $10^4$ -  $10^5$  g de MS). Dans ce contexte, un contrôle du portage de STEC au niveau des ruminants sauvages serait pertinent.

Dans l'ensemble la maîtrise de ces risques ne semble, ni hors d'atteinte ni nécessiter des mesures exceptionnelles. Une information raisonnable du public, même si elle remet en cause l'image montagne/eau pure, paraît faisable et souhaitable (les usagers ne prennent pas en considération les risques associés aux troupeaux). Les actions au niveau exploitation agricole sont déjà partiellement en cours ; elles relèvent du contrôle qualité au niveau des productions et de la protection des captages d'eau à usages agricoles.

## **8.2. Valeur indicatrice d'*E.coli* en tant qu'indicateur de contamination fécale.**

Des faits convergents montrent l'aptitude des populations d'*E.coli* à survivre durablement (plusieurs années) dans les conditions spécifiques des premiers centimètres de la surface des sols ce qui tendrait à priori à remettre en cause l'utilisation d'*E.coli* comme indicateur de contamination fécale. Dans les conditions étudiées à Bise, ces populations de *E.coli* sont naturalisées dans le sol et peu extractibles par les écoulements de surface ou les eaux d'infiltrations, peut être parce qu'associées à des microsites. Nos observations expérimentales et plusieurs essais réalisés sur colonnes de sol<sup>175</sup> démontrent l'efficacité de la rétention. En conséquence, les bactéries stabilisées dans le sol ont une faible probabilité d'être transférées vers les nappes ou eaux de surface, si bien que ce stock environnemental, malgré son importance quantitative, n'affecte pas fondamentalement la valeur indicatrice d'*E.coli* .

En fait, dans nos conditions de transfert d'eau, qui sont assez représentatives des conditions usuelles des prairies (écoulements de surface non érosifs, ruissellement sur sols saturés), les propriétés physiologiques et génétiques des populations de *E.coli* des eaux sont similaires à celles des bactéries des bouses. Ceci confirme que *E. coli* rend bien compte d'une présence probable et potentielle d'agents infectieux, y compris des sérotypes pathogènes.

Un dernier cas est cependant à envisager. Il s'agit des événements plus exceptionnels marqués par une forte turbidité due en partie à l'érosion de surface des sols prairiaux dégradés par un sur- piétinement (chargement excessif). Pour de tels événements, des populations naturalisées sont probablement exportées en association avec les agrégats et particules de terre mais ces transferts s'accompagnent en général également de cellules d'*E.coli* primaires provenant du délavage des matières fécales qui recouvrent ces zones piétinées contributives.

---

<sup>175</sup> Harvey R. W., 1991. Parameters involved in modeling movement of bacteria in groundwater. In. Modelling the environmental fate of microorganisms, J. Hurst Ed, Am. Soc. for Microbiol., 89- 114.

Finalement la valeur indicatrice d'*E.coli* nous semble donc assez robuste dans la plupart des circonstances.

Les sous- populations telles que les STEC, souches qui représentent un risque sanitaire réel, semblent ne pas présenter l'inconvénient de persister durablement dans certains sols. Elles ne sont en effet détectées dans les sols uniquement lorsque des matières fécales contaminées par ces populations sont présentes directement au-dessus du site échantillonné. Il s'agit donc de bons candidats indicateurs de contaminations fécales. En cas de doute ou pour appliquer le principe de précaution, il est toujours possible, pour les contrôles de qualité microbiologique de l'eau, d'associer au dénombrement des coliformes fécaux une détection moléculaire des gènes de virulence stx.

### **8.3. Caractériser des périodes à risques**

L'altération de la qualité des ressources en eau lors des périodes pluvieuses<sup>176</sup> est une tendance générale, marquée par une élévation de l'ensemble des indicateurs de contamination fécale. Pour les techniciens hygiénistes chargés de la maintenance des unités de distribution d'eau, ces périodes sont donc considérées comme critiques et font l'objet d'une attention particulière.

Notre site d'étude est typique de ce point de vue : plus de 95% des exportations annuelles de bactéries sont associés à des événements pluvieux estivaux. L'essentiel se manifeste lors des crues en relation avec le ruissellement sur des surfaces récemment pâturées. Mais il existe aussi un transfert secondaire dû à des infiltrations et des transferts profonds, qui gagne l'exutoire en fin de tarissement (le délai retard observé est probablement spécifique de la configuration et de l'hydrodynamique locale). Dans un contexte de suivi de qualité en relation avec une alimentation en eau potable, la détection de ces contaminations retardées est difficile du fait de l'absence de lien avec une variation hydrologique. Il importe donc probablement de considérer que la période critique associée aux événements pluvieux est plus longue que la simple période de crue. Les situations où des transferts profonds retardés sont susceptibles d'être générés étant mal connues, des études supplémentaires sur les dynamiques en cause et facteurs en jeu devraient être menées pour apporter des indicateurs spécifiques (traceurs chimiques ?).

### **8.4. Délimitation des zones sources critiques, conséquence en terme de maîtrise.**

Dans le site étudié, les zones contributives responsables de forts niveaux de contaminations à l'exutoire, sont variables dans la saison (localisation, extension) mais toujours de superficies relativement restreintes. Elles coïncident partiellement avec des espaces qui ont des fonctions essentielles pour le troupeau. Il s'agit alors de zones très fréquentées, soit comme accès à l'alimentation en eau, soit pour la fourniture de ressources fourragères. Un régime hydrique estival favorable à l'herbe est associé au ruissellement et signifie souvent un faciès pastoral dont la valeur et l'appétence se maintiennent tout au long de la saison et en conséquence une pression de pâture particulièrement forte. Dans ces conditions, la présence de déjections récentes est continue sur toute la saison d'où un risque maximum lors des pluies estivales. Ce type de situation est probablement assez courant

---

<sup>176</sup> DRASS Rhône Alpes, 2007. Rapport 2005. L'alimentation en eau potable des bassins rhône – méditerranée et corse, DRASS Rhône Alpes, Lyon, 27p.

puisque'il existe un lien assez général, dans les Alpes, entre valeur pastorale et régime hydrique<sup>177</sup> (Dorioz et van Oort, 1993). En montagne, un sol un peu engorgé (sauf extrêmes) est même plutôt favorable à la qualité des pâturages du fait d'une lixiviation et acidification limitées

Dans le contexte d'une exploitation extensive ou semi- extensive qui, comme à Bise, laisse une large part aux choix du troupeau, il existe probablement fréquemment une contradiction entre utilisations des ressources fourragères et risque pour la qualité microbiologique des eaux. La mise en œuvre de modalités de gestion du pâturage compatible avec une utilisation durable des ressources en eau peut soulever en conséquence de réels problèmes.

Un premier type de mesure repose sur des aménagements ciblés. Les zones contributives à aménager correspondant à des secteurs où le dépôt des bouses relève à la fois de déplacements individuels des animaux pour l'abreuvement et de déplacements collectifs pour la traite ou l'accès aux quartiers supérieurs. Dans de telles situations, l'installation d'abreuvoirs, dont on a par ailleurs mesuré l'efficacité<sup>178</sup>, devrait permettre de contrôler une partie des problèmes. On peut aussi envisager, pour limiter les apports directs de déjections, d'organiser avec des sortes de passerelles, le franchissement des sections les plus importantes du réseau hydrographique. Compte tenu des longueurs de rives concernées, du caractère collectif des déplacements et de la hauteur des moyens à mettre en œuvre pour empêcher les contacts troupeau – cours d'eau, il n'est cependant pas envisageable de protéger ce types de zones critiques par des fils de ceinture. Les seules exceptions envisageables, sont les zones humides de type bas marais tourbeux (aucune valeur fourragère).

Dans les talwegs critiques situés à l'amont des bassins, des dispositifs de ceinturage peuvent être parfois suggérés, si toutefois les surfaces concernées sont restreintes et si leur isolement n'affecte pas substantiellement le travail des bergers et les ressources fourragères. Une modification globale des itinéraires de parcours pourrait aussi contribuer à limiter les risques. L'objectif est alors d'éloigner au maximum les animaux des zones contributives lors de la période d'étiage sévère (peu de dilution) tout en maintenant un bon potentiel fourrager global. Ceci suppose de remplacer les surfaces pastorales attenantes au réseau hydrographique, par des faciès pastoraux à haute valeur pastorale créés hors des zones contributives estivales. La technique consisterait à modifier les parcours de début de saison pour obtenir une coupe précoce sur des versants tout en apportant une fertilisation (le recours aux engrais chimique serait alors recommandé !). Bien entendu de tels scénarios sont difficiles à mettre en œuvre car ils supposent de profondes modifications des pratiques de gardiennage, main d'œuvre ect.... Ils nous aident à élaborer un diagnostic global et à identifier les indicateurs clés dans une perspective de gestion, en partant de cas concrets. L'état d'avancement de cette réflexion en cours est présenté par le tableau 17.

Les mesures de protection sont donc très dépendantes de l'organisation et des conditions d'utilisation des surfaces pastorales. Elles demandent à être déduites de diagnostics portant, non seulement sur la localisation des zones contributives mais aussi d'éléments relatifs aux

---

<sup>177</sup> DORIOZ J.M., Van OORT F., 1991 - Approche agropédologique des zones pastorales sur calcschistes sédimentaires (Beaufortain- Alpes du Nord). 2 Répartition des sols et des valeurs d'usage pastoral. *Agronomie*, 11, p. 395- 409.

<sup>178</sup> Godwin, D. C., J. R. Miner, 1996. The potential of off- stream livestock watering to reduce waterquality impacts. *Bioresour. Technol.* 58:285- 290.

différents niveaux d'organisation du système pastoral (main d'oeuvre disponible, répartition des ressources fourragères, aménagement des secteurs concernés)..

Composantes du système		Variables clés	Paramètre du diagnostique
<b>Eau</b>	Eau à l'exutoire (sortie)	Régime hydrique Débits d'étiages	Dilution moyenne des contaminations : - durant la période d'étiage sévère - durant la saison pastorale en période de crue ; - durant la saison pastorale post crue ; - durant la période post saison pastorale ;  Disponibilité des ressources Niveau de traitement prévisible
<b>Bactéries</b>	<i>E. coli</i>	Teneur- Doses infectantes Types	Dénombrement et Profils génétiques uidA en relation avec l'hydrologie Identification des STEC
<b>Bassin versant pâturé</b>	Zones contributives  Parcours des troupeaux (itinéraire et plan de pâturage)	Détermination des zones de ruissellement estival (zones saturées)  Relation parcours réseau hydrographique	Risques de contamination en période de crue Localisation des interventions prioritaires
<b>Utilisation</b>	Distribution spatiale et saisonnière des ressources fourragères	Charge animale Date de première coupe	Contraintes pastorales (cf outils du diagnostic pastoral)

Tableau 17: les composantes du diagnostic : premières propositions.

## CONCLUSIONS

Les recherches réalisées dans « Pastor » portent sur :

- 1) la dynamique et l'évolution des structures génétiques des populations de *E. coli*, y compris les souches pathogènes STEC,
- 2) la nature et le fonctionnement des zones contributives aux contaminations fécales des eaux de surface du bassin versant pâturé.

Les résultats obtenus mettent en évidence des fonctionnements inattendus. En premier lieu, il existe un stockage à long terme d'*E.coli* dans les premiers centimètres organiques de la surface des divers sols sous pâturage, avec des effectifs constants quels que soient, la saison, la proximité d'une bouse, l'intensité du pâturage ou le contexte bioclimatique. Cette dynamique correspond à celle d'une population naturalisée ; elle est expliquée par référence au concept de capacité d'accueil. Les *Pseudomonas* fluorescents pris comme bactérie tellurique type présentent dans les mêmes contextes une dynamique totalement différente marquée par une forte variabilité, représentative de stratégies opportunistes.

Plus en profondeur, la présence durable de populations naturalisées ne s'observe que dans les situations de sols particuliers, peu drainants (confinés) et de ce fait riches en matière organique. Dans le cas des sols drainants, les effectifs bactériens sont fugaces ; ils semblent résulter de transferts advectifs et dispersifs ; les temps de résidence sont faibles ; les populations répondent à des contrôles biotiques et abiotiques (exportations par l'eau, oligotrophie, pH).

Les déjections constituent d'autres lieux de stockage. Elles sont susceptibles d'inclure des souches potentiellement pathogènes porteuses de facteurs de toxicité (telles que des shigatoxines). Le stockage des *E. coli* y est limitée pendant la saison pastorale, par l'évolution physique (dessiccation) surtout par la disparition physique et biologique des bouses (pluie, coprophages) ; en fin de saison un stock non négligeable se maintient sous la couverture neigeuse.

Les variations de la structure génétique des populations d'*E. coli* dans les différents réservoirs environnementaux du bassin versant expriment des dynamiques adaptatives. Les populations naturalisées de la rhizosphère de surface ou des milieux confinés s'avèrent spécifiques et très différentes de celles des dépôts fécaux. Ces dernières présentent, à l'inverse des précédentes, un fort degré de similarité avec les populations isolées du rectum des bovins ou retrouvées en profondeur dans les sols drainants. Les stocks diffèrent aussi en terme de propriétés et notamment de susceptibilité vis-à-vis de l'extraction par les écoulements, ruissellement ou infiltration. Les déjections récentes sont les stocks les plus extractibles. La dessiccation des bouses se traduit pas une baisse de ce potentiel de contamination des eaux, alors que la teneur en *E. coli* reste stable. Les stocks d'*E. coli* naturalisées des sols, bien qu'assez élevés, sont eux aussi peu mobilisables par le ruissellement.

« Pastor » propose aussi une analyse du fonctionnement du bassin versant pâturé en tant que système de transfert de contaminants fécaux et une modélisation de ces flux bactériens. Les connaissances acquises concernent les régimes d'exportation à l'exutoire, les facteurs de transfert et les zones contributives.

Le traitement des données bassin versant montre que le milieu étudié présente un très fort potentiel tampon vis- à- vis des entrées microbiologiques puisque c'est une part infime et momentanée, de quelques ‰ à quelques % du stock total de bactéries fécales des bouses, qui est transférée à l'exutoire. Les écoulements de surface lors des crues estivales représentent le mécanisme dominant de contamination des eaux à l'exutoire. La présence de bouses fraîches est déterminante, ce qui explique les évolutions rapides des niveaux de contamination des eaux de surface, avec l'arrivée ou le départ des troupeaux. En étiage et en fonte des neiges, les teneurs restent faibles en tous points du bassin, exutoire compris.

Les secteurs contributifs actifs, critiques en terme de contamination, sont restreints et localisés au niveau des zones de production de ruissellement, c'est- à- dire dans l'environnement immédiat des berges des cours d'eau ou les fonds de talwegs où se concentrent les écoulements latéraux et la pression pastorale. Les sols drainants alimentant des nappes profondes (complexes alluviaux à forte porosité de constitution) sont à l'origine de pics d'exportations post crues, mais de faible ampleur comparativement à ce qui est généré par le ruissellement des versants. Dans notre contexte, les apports directs dans le réseau semblent négligeables. La signature génétique des bactéries retrouvées à l'exutoire est en général celle de populations ayant une structure proche de celles des déjections récentes, situation révélatrice de courtes durées de passage dans le bassin versant et ses zones contributives. Le fonctionnement global du système de transfert à l'échelle du bassin versant se traduit donc par une spécialisation des populations d'*E. coli* stockées avec, d'une part des populations naturalisées, peu mobilisables par les flux d'eau, à transfert lent voire nul et d'autre part, une population primaire, non ou peu modifiée par son passage dans l'environnement, caractérisée par des cheminements courts et rapides et finalement impliquée dans la contamination des ressources en eau.

Les conséquences opérationnelles de « Pastor » concernent la reconnaissance des sources critiques, la prévention des pollutions fécales des eaux de surface, les risques associés à la présence de STEC, et l'utilisation d'*E. coli* comme indicateur. Il s'agit pour l'essentiel de mesures lourdes à mettre en œuvre et qui font ressortir le caractère paradoxal des pollutions microbiologiques diffuses: une proportion très réduite de contaminants transmise aux aquifères, ayant des conséquences lourdes tant en termes de santé humaine et animale, et dont la maîtrise (partielle) suppose des moyens financiers et humains relativement élevés.

## VALORISATION- PUBLICATIONS

### Thèses.

TEXIER S. Dispersion et survie des populations de bactéries fécales bovines dans le sol des écosystèmes pâturés subalpins : conséquences sur le transfert bactérien dans les bassins versants. Université de Savoie, soutenance : septembre 2008. (Avis favorables des rapporteurs)

FREMAUX B., 2007. Écologie des *Escherichia coli* producteurs de Shiga- toxines (STEC) dans les effluents d'élevages bovins et le sol Université Claude Bernard Lyon1 et INSA-Lyon.

### Articles acceptés

Frémaux B., Prigent Combaret C., Vernozzy Roland C., (sous presse). Long term survival of shiga Toxin- producing *Escherichia coli* in cattle effluents and environment : an updated review. *vet Microbiol.*

S. Texier<sup>1</sup>, C. Prigent- Combaret, M.- H. Gourdon, M.- A. Poirier, P. Faivre, J.- M. Dorioz, J. Poulenard, L. Jocteur- Monrozier, Y. Moëgne- Loccoz, D. Trevisan, 2003. Persistence of Culturable *Escherichia coli* Fecal Contaminants in Dairy 1 Alpine Grassland Soils, J. Environ. Qual. (sous presse)

Gascuel- Odoux C. et Dorioz J.M., Merot P., Massa F., Grimaldi C., Poulenard J. Rôle des prairies dans les pollutions diffuses. Effet de la localisation et des bordures (haies, dispositifs enherbés, berges) 2008, Fourrages n°192 (p 409, 422) *cet article utilise en partie les résultats Pastor*

### Articles en cours de soumission

D.Trevisan, Ph. Quetin, L. Jocteur Monrozier, J. Poulenard, Ph. Merot, J.M. Dorioz. Analyse inverse des pollutions bacteriennes fecales diffuses et delimitation des zones critiques dans les bassins versants patures extensifs. *Wat. Research.*

B. Fremaux, C. Prigent- Combaret, L. Beutin, A. Gleizal, D. Trevisan, P. Quetin, L. Jocteur- Monrozier, C. Vernozzy- Rozand. Survival and spread of Shiga- toxin producing *Escherichia coli* in a high mountain pastured watershed. *Applied and Environ. Microbiol.*

S. Texier, L. Jocteur- Monrozier, M.- A. Poirier, P. Faivre, D. Trevisan, Y. Moëgne- Loccoz, C. Prigent- Combaret. Tracking of naturalized *Escherichia coli* populations and potential sources of water contamination in the different compartments of a French dairy watershed by *uidA* PCR- DGGE. *Environ. Microbiol.*

### Communications

S. Texier, C. Prigent- Combaret, M.H. Gourdon, L. Jocteur- Monrozier, J. Poulenard, P. Quetin, Y. Moëgne- Loccoz, P. Faivre, J.M. Dorioz, D. Trevisan - 2006- Survie et transfert de populations d'*Escherichia coli* d'origine bovine dans les sols de prairies subalpines pâturées :



comparaison avec une population de bactéries rhizosphériques, les *Pseudomonas* fluorescents. AFES, Journées Nationales d'Etudes des sols, Angers 2006.

Dorioz JM et Trevisan D - 2006 - Pratiques pastorales et qualité des eaux à l'échelle bassin versant Role de sfacteurs pédoclimatiques et hydrométéorologiques dans la survie l'état physiologique et le transfert des populations de bactéries fécales bovines –Journée MEDD ADEME, GESSOL un support à la directive cadre sur la protection de sols. Paris nov 2006

S. TEXIER, C. Prigent- Combaret, M.H. Gourdon, L. Jocteur- Monrozier, Y. Moëgne-Locco, P. Faivre, J.M. Dorioz, D. Trevisan - 2006 - Survie de bactéries fécales bovines (*Escherichia coli*) dans la rhizosphère des prairies alpines 7èmes rencontres plantes- bactéries Aussois 2006.

S. Texier, D. Trevisan, L. Jocteur- Monrozier, Y. Moëgne- Locco, P. Faivre, J.M. Dorioz, C. Prigent- Combaret 2006 Dynamique de transfert de coliformes fécaux dans la rhizosphère des prairies alpines et dans l'eau par analyse moléculaire de la typologie des populations d'*Escherichia coli* dans les différents compartiments du bassin versant de l'alpage de Bise. Oct 2006 exposé Journée GomeBio, Lyon

S Texier, D Trevisan, M- H Gourdon, L Jocteur- Monrozier, J Poulénard, Marie- Andrée Poirier, P Quétin, Y Moëgne- Locco, P Faivre, J- M Dorioz, C Prigent- Combaret- 2007 La rhizosphère des prairies subalpines pâturées constitue- t- elle un réservoir environnemental en *Escherichia coli* bovins ? Colloque AFEM, 2007. La Grande Motte.

S. Texier, D. Trevisan, M.H. Gourdon, L. Jocteur- Monrozier, J. Poulénard, M.A. Poirier, P. Quétin, Y. Moëgne- Locco, P. Faivre, J.M. Dorioz, C. Prigent- Combaret - 2007 - Does the rhizosphere of dairy alpine grasslands constitute an environmental reservoir for *Escherichia coli*? Aout 2007 Colloque Rhizosphère Montpellier

D. Trevisan, Ph. Quétin, S. Texier, J. Poulénard, J.M. Dorioz, 2007- Alpines et contaminations microbiologiques de l'eau. in Gestion intégrée des hauts bassins versants. Megève, 2007.

D. Trevisan. 2008- Pâturage extensif et contamination des ressources en eau par *Escherichia coli*. Colloque modélisation des ressources naturelles, INRA Sup Agro, Montpellier 2008.

J. Poulénard, J.- M. Dorioz. D. Trevisan- 2008 Fonctionnement d'un système agropastoral d'alpage : effet sur les propriétés et la distribution spatiale des sols. Transfert hydrique : mesures et modélisation. Dynamique des bactéries fécales dans les sols d'alpage et transfert à l'échelle du bassin versant. Excursion- Société Suisse de pédologie et de l'AFES, Bise sept 2008.

Vertes F, Gascuel- Odoux C., D Trevisan et Dorioz J. M- 2008- Capacities and limits of two French grassland systems (intensive and extensive) to comply with WFD - Developing tools between science and policy to improve grassland management- International Conference: "Sustainable grassland systems in Europe and the EU Water Framework Directive" Johnstown Castle Research Centre, Wexford, Ireland- November 2008 (Conf. invité, *resultats Pastor partiellement repris pour cette conférence* )

## **Compte rendu des travaux auprès des praticiens .**

D. Trevisan., Dorioz JM, J. Poulenard. Qualité microbiologique de l'eau à Bise : premiers résultats. Rencontre élus, professionnels agricoles, agriculteurs et Chambre d'agriculture de Haute Savoie. Vacheresse, 2006.

D. Trevisan. J. Poulenard. Qualité microbiologique de l'eau à Bise. Rencontre élus, professionnels agricoles, agriculteurs et Chambre d'agriculture de Haute Savoie. Vacheresse, 2008.

**Dec 2008.**