

**Titre de l'action :**

**IDESOC : Identification et caractérisation des sources de contaminants dans des bassins versants d'usage mixte - approche intégrée**

Rapport final

Action n°79 du Programme 2021 au titre de l'accord cadre Agence de l'Eau ZABR

Thème Flux polluants, écotoxicologie, écosystèmes

Site Rivières Cévenoles, Observatoire de Terrain en Hydrologie Urbaine

Marina Coquery. UR RiverLy, INRAE  
Céline Duwig. IGE, Université Grenoble Alpes  
Pauline Dusseux. PACTE, Université Grenoble Alpes  
Benoît Cournoyer. LEM, Université de Lyon

30 septembre 2024

Ont contribué à la réalisation de ce projet :

**RiverLy - INRAE :**

Marina Coquery  
Matthieu Masson  
Flora Branger  
Lysiane Dherret  
Mickaël Lagouy  
Olivier Grandjouan  
Amine Boukra  
Loïc Richard  
Malcie Baduel

**IGE - université Grenoble  
Alpes :**

Céline Duwig  
Guillaume Nord  
Lorenzo Spadini  
Cédric Legout  
Jean Martins  
Nico Hachgenei  
Armelle Crouzet  
Laure Jullien  
Sophie Darfeuil  
Ons Chtiba  
Lionel Elszear

**LEM – VetAgro Sup :**

Benoît Cournoyer  
Laurence Marjolet  
Angélique Dominguez-Lage  
Adrien Meynier-Pozzi  
Baptiste Luton  
Wessam Galia  
Véronica Rodriguez-Nava  
Emmanuelle Bergeron  
Delphine Mouniée  
Sihem Guesmi  
Caroline Wybraniec

**PACTE - université  
Grenoble Alpes :**

Pauline Dusseux  
Nicolas Robinet  
Inès Créti  
Mila Betemps  
Julie Josse



# Sommaire

---

<b>Introduction</b>	5
<b>I. Diagnostic d'occupation du sol et de l'utilisation des produits chimiques sur les bassins versants</b>	7
I.1. Description des bassins versants du Ratier et de la Claduègne	7
I.1.1. Situation générale et caractéristiques du bassin versant du Ratier (Yzeron)	7
I.1.2. Situation générale et caractéristiques du bassin versant de la Claduègne	10
I.2. Matériels et méthodes pour la réalisation des enquêtes et de la cartographie haute résolution	13
I.2.1. Acquisition de données par entretien	13
I.2.2. Acquisition de données par télédétection	15
I.2.3. Création d'une base de données spatialisée	16
I.3. Identification et localisation des sources potentielles de pollution	17
I.3.1. Une base de données spatialisées	17
I.3.2. Des cartographies d'occupation du sol	17
<b>II. Identification des sources et caractérisation des sous-bassins versants</b>	20
II.1. Méthodologie d'identification des sources	20
II.1.1. Bassin versant du Ratier	20
II.1.2. Bassin versant de la Claduègne	22
II.2. Sélection des points de prélèvement	23
II.2.1. Bassin versant du Ratier	23
II.2.2. Bassin versant de la Claduègne	25
<b>III. Cartographie spatiale de la qualité de l'eau</b>	28
III.1. Principe général	28
III.2. Stratégie d'échantillonnage	29
III.2.1. Campagnes de mesure	29
III.2.2. Choix des points de prélèvement	29
III.2.3. Protocoles d'échantillonnage, de conditionnement des échantillons et de mesures in situ	30
III.3. Méthodologies analytiques	31
III.3.1. Spectrophotométrie UV-visible	31
III.3.2. Analyse microbienne par PCR quantitatives en temps réel (qPCR)	31
III.4. Résultats des cartographies spatiales de la qualité de l'eau	32
III.4.1. Bassin versant du Ratier - physico-chimie et UV-vis	32
III.4.2. Bassin versant du Ratier - diversité des contaminations fécales	37
<b>IV. Méthodologie de traçage des sources aux exutoires des bassins versants</b>	42
IV.1. Synthèse des prélèvements et analyses réalisés	42
IV.1.1. Points sources	42
IV.1.2. Echantillons de mélange prélevés aux exutoires des bassins versants	42
IV.1.3. Paramètres analysés	44
IV.2. Principe du modèle de mélange biogéochimique	44
IV.3. Validation de la méthodologie	46

IV.3.1. Prélèvement des sources dans les écoulements à l'exutoire des bassins versants homogènes .....	46
IV.3.2. Validation du modèle de mélange : mélanges numériques et en laboratoire .....	51
IV.4. Choix des traceurs identifiant les types de source .....	54
IV.4.1. Test d'additivité pour les indicateurs UV-visible.....	54
IV.4.2. Elimination des indicateurs non pertinents (bassin versant du Ratier) .....	54
IV.4.3. Sélection des paramètres les plus discriminants (bassin versant du Ratier).....	56
IV.4.4. Application de la démarche au bassin de la Claduègne .....	58
IV.4.5. Synthèse sur le traçage des sources.....	60
IV.5. Exemple de décomposition d'évènements pluvieux aux exutoires des bassins versants .....	60
IV.5.1. Décomposition des mélanges aux exutoires des bassins versants du Mercier et du Ratier .....	60
IV.5.2. Décomposition des mélanges à l'exutoire du bassin de la Claduègne.....	63
<b>V. Contamination bactérienne sur les bassins versants .....</b>	<b>64</b>
V.1. Bactéries pathogènes des sous-bassins versants homogènes et sources ponctuelles sur le Ratier .....	64
V.2. Bassin versant de la Claduègne - données qPCR MST .....	67
<b>Conclusions et perspectives .....</b>	<b>70</b>
<b>Bibliographie .....</b>	<b>72</b>
<b>Annexes .....</b>	<b>75</b>

## Introduction

---

La présence de nombreux contaminants chimiques et microbiologiques dans les écosystèmes aquatiques peut entraîner une dégradation de l'état écologique des eaux et augmenter l'exposition à ces contaminants. Les bassins versants de méso-échelle (10-100 km<sup>2</sup>), caractérisés par une utilisation mixte des sols et des géologies hétérogènes, sont particulièrement sensibles aux changements d'occupation et d'usage du sol et au changement climatique. Les petits cours d'eau sont souvent intermittents et peuvent être impactés par le développement urbain, par les activités touristiques et certaines pratiques agricoles. Ces cours d'eau ont une très faible capacité de dilution, exacerbée par des étés secs plus longs, et ils réagissent souvent rapidement à de forts épisodes de pluie, qui deviennent également plus fréquents. Dans un avenir proche, l'artificialisation croissante des surfaces ainsi que le changement climatique pourraient aggraver ces impacts et entraîner une dégradation critique de la qualité de l'eau dans ces bassins versants.

L'objectif du projet IDESOC est de localiser spatialement les sources d'eau et de contaminants associés, et d'identifier et tester des traceurs « low-cost » pour estimer l'origine de l'eau et son cheminement dans le bassin versant.

Cette approche originale est appliquée sur deux bassins versants de méso-échelle : l'Yzeron (sous-bassin versant du Ratier) (69), qui fait partie de l'[OTHU](https://www.ozcar-ri.org/fr/observatoire-othu/)<sup>1</sup> et la Claduègne (07), inclus dans l'[OHMCV](https://www.ozcar-ri.org/fr/observatoire-ohmcv/)<sup>2</sup>. L'originalité de ces recherches exploratoires est d'être pluridisciplinaires (sciences humaines et sociales, géographie, chimie, microbiologie, hydrologie). C'est un travail au long cours qui se déroule en plusieurs étapes, mobilisant à chaque fois des méthodes et outils spécifiques, mais tous complémentaires.

En pratique, dans un premier temps, une méthodologie d'analyse spatiale, combinant géomatique et enquêtes sur les usages et pratiques, a été mise en œuvre afin d'identifier les sources potentielles de contaminants et leur localisation. En complément, comme il n'est pas possible de multiplier les sites de prélèvement pour des raisons logistiques et économiques, nous avons également évalué la variabilité spatiale de la qualité de l'eau sur les cours d'eau de l'ensemble des deux bassins versants étudiés avec des techniques analytiques dites « low-cost » (analyse des caractéristiques de la matière organique dissoute par spectrophotométrie UV-visible, paramètres microbiens par qPCR). Dans un deuxième temps, ces sources ont été échantillonnées et analysées pour définir des empreintes biogéochimiques (ou signatures) sur les sites (ou points) sélectionnés. La variabilité temporelle des empreintes de chaque site a été prise en compte en échantillonnant les sites lors de conditions hydro-climatiques variées. Enfin, un modèle de mélange biogéochimique est appliqué sur des données issues de suivis d'événements hydrologiques à l'exutoire de sous-bassins emboîtés sur les sites d'étude.

Ce rapport présente l'avancée des travaux réalisés dans le cadre du projet IDESOC (janvier 2021 - juin 2024), en lien avec les avancées obtenues en parallèle grâce au financement du projet CHYPSTER (ANR-21-CE34-0013) qui a démarré quelques mois plus tard (octobre 2021 - 2025).

---

<sup>1</sup> Observatoire de Terrain en Hydrologie Urbaine ; <https://www.ozcar-ri.org/fr/observatoire-othu/>

<sup>2</sup> Observatoire Hydrométéorologique Méditerranéen Cévennes-Vivarais ; <https://www.ozcar-ri.org/fr/observatoire-ohmcv>

Le Chapitre I présente la méthodologie de diagnostic d'occupation du sol et de l'utilisation des produits chimiques sur les bassins versants, et le Chapitre II explique la suite de la méthodologie avec l'identification des sources et caractérisation des sous-bassins versants. La cartographie spatiale de la qualité des eaux sur les cours d'eau de l'ensemble des deux bassins versants étudiés est présentée dans le Chapitre III. Le Chapitre IV synthétise les méthodes et présente les principaux résultats de l'application et validation de la méthodologie de définition des traceurs et des empreintes biogéochimiques des sources, puis de l'estimation des contributions des sources aux exutoires des deux bassins versants étudiés. Le Chapitre V complète ce rapport avec la présentation des résultats de contamination bactérienne observée sur les bassins versants.

# I. Diagnostic d'occupation du sol et de l'utilisation des produits chimiques sur les bassins versants

---

Une méthodologie originale d'identification et de localisation des principales sources potentielles de pollution (urbaine, agricole, élevage...) sur les bassins du Ratier (Yzeron) et de la Claduègne a été élaborée en se basant sur la superposition de couches d'informations socio-économiques (résultats d'enquêtes conduites auprès des agriculteurs sur leurs pratiques et modes de gestion à l'échelle du bassin versant), et géographiques (géologie, pédologie, occupation et usage du sol). Ainsi, une méthode d'enquête commune aux deux bassins versants étudiés a été mise en place et conduite auprès des acteurs socio-économiques des deux territoires. En parallèle, des données spatiales d'usage des sols et des images de télédétection ont été mobilisées pour produire une cartographie à haute résolution de l'occupation et de l'usage du sol à l'échelle des deux bassins versants étudiés.

Plusieurs résultats sont attendus suite à ces travaux : la constitution d'une base de données géoréférencée et détaillée des sources de contaminants (intégrant les cartographies à haute résolution d'occupation et d'usage du sol), ainsi que des cartes de sources de contamination potentielle en fonction des occupations et usages du sol. Un guide méthodologique des enquêtes sera également établi (Pradier, 2023).

## I.1. Description des bassins versants du Ratier et de la Claduègne

### I.1.1. Situation générale et caractéristiques du bassin versant du Ratier (Yzeron)

Le bassin versant du Ratier est situé dans l'ouest Lyonnais, dans le département du Rhône en région Auvergne-Rhône-Alpes. C'est un sous-bassin versant du bassin versant de l'Yzeron. Le bassin du Ratier couvre une superficie d'environ 18.9 km<sup>2</sup> ; le bassin du Mercier est un sous-bassin versant imbriqué dans le bassin du Ratier, qui s'étend sur une superficie d'environ 6.6 km<sup>2</sup> (Branger et al., 2013). La Figure 1 présente la carte de localisation et les délimitations des bassins versants de l'Yzeron, du Ratier et du Mercier.

**Les données topographiques** du bassin du Ratier sont détaillées dans la thèse d'Olivier Grandjouan (2024). Ces données ont permis de calculer une carte des pentes qui montre un gradient similaire, de la partie ouest avec les monts du Lyonnais qui présente des pentes plus importantes, à la partie est avec des pentes faibles. Plus de 30% de la superficie totale du bassin présente des pentes supérieures à 10%. Des pentes importantes ont également été calculées sur les bordures des cours d'eau principaux correspondant à la ripisylve.

**Les données géologiques et hydrogéologiques** sont également décrites dans la thèse de Granjouan (2024). Le bassin du Ratier est caractérisé par une géologie plutôt homogène avec des formations cristallines couvrant 96% de la surface totale (Figure 2). Ce bassin versant présente en général une faible capacité de stockage des eaux souterraines. A l'est du bassin, dans les dépôts colluvionnaires recouvrant les gneiss, un aquifère de faible capacité a été identifié. Les capacités de cet aquifère sont inconnues à cause du manque d'information concernant la profondeur des colluvions, mais les observations de terrain ont montré un apport constant provenant de cet aquifère dans l'année.



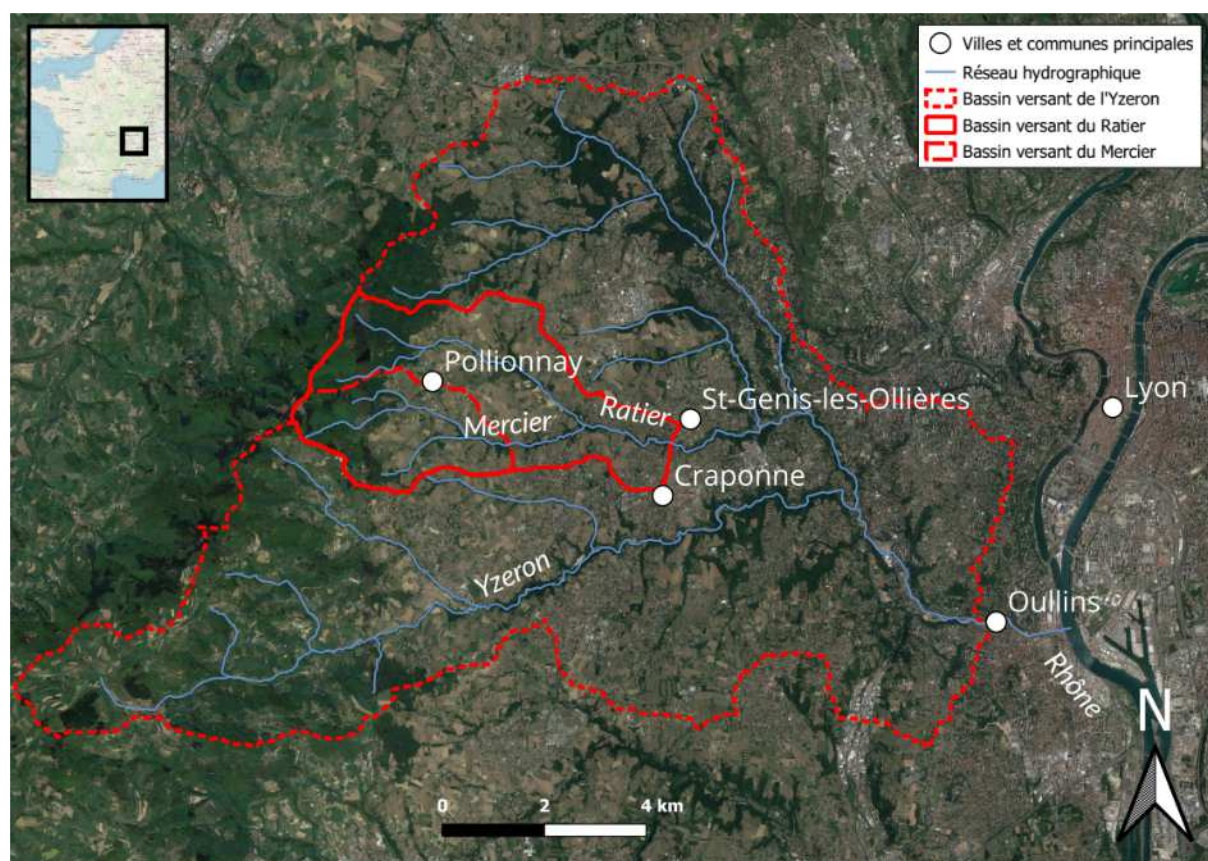


Figure 1 : Carte de localisation des bassins versants de l'Yzeron, du Ratier et du Mercier. Sources : Images satellites BD ORTHO@2020 ; Réseau hydrographique BD CARTHAGE@2006.

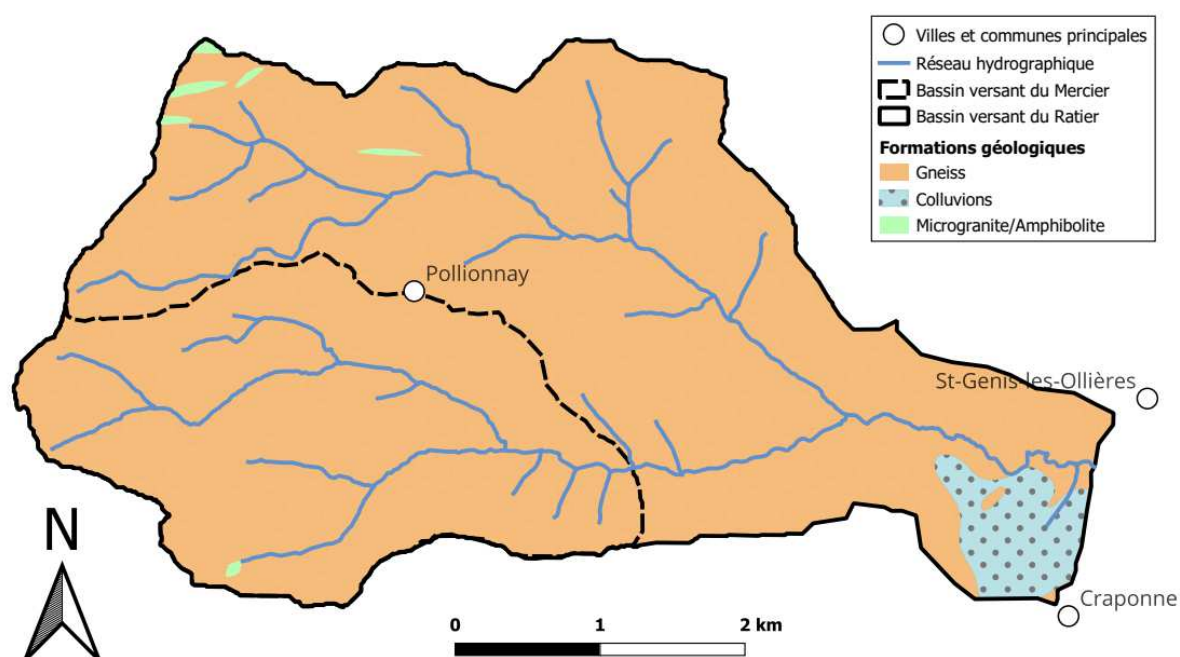


Figure 2 : Carte géologique du bassin versant du Ratier (Grandjouan, 2024).



**Les informations pédologiques** proviennent du programme Inventaire, Gestion et Conservation des Sols (IGCS) du Groupement d'Intérêt Scientifique sur les Sols (GIS Sol) mis en place dans les années 90 dans le but de rassembler les données pédologiques à l'échelle de la France. Des cartes des textures de sol et des classes de capacité au champ des sols sur le bassin versant du Ratier synthétisent les données disponibles dans la thèse de Grandjouan (2024). A partir des profondeurs et des textures de sol, Labbas (2015) a calculé des capacités au champ qui correspondent à la capacité de stockage d'eau dans les sols. Ces capacités de stockage sont généralement moyennes à faibles sur les versants et fortes en fond de vallée.

**En terme d'occupation du sol**, le bassin versant du Ratier est un bassin versant typiquement péri-urbain. Principalement agricole au XIX<sup>ème</sup> siècle, le bassin a vu progressivement ses vignes et céréales remplacées par des surfaces forestières sur la partie amont, et des surfaces urbaines sur la partie aval avec l'extension rapide de l'agglomération Lyonnaise. L'occupation du sol du bassin est aujourd'hui particulièrement hétérogène. Elle est composée de surfaces naturelles forestières sur la partie amont à l'ouest du bassin, de surfaces agricoles sur la partie centrale du bassin et de surfaces urbaines sur la partie aval à l'est du bassin, ainsi qu'au centre du bassin sous forme de petits noyaux urbains appartenant à la commune de Pollionnay (Figure 3). Cette carte a été remise à jour dans le cadre du projet IDESOC (Cf. § 1.2).

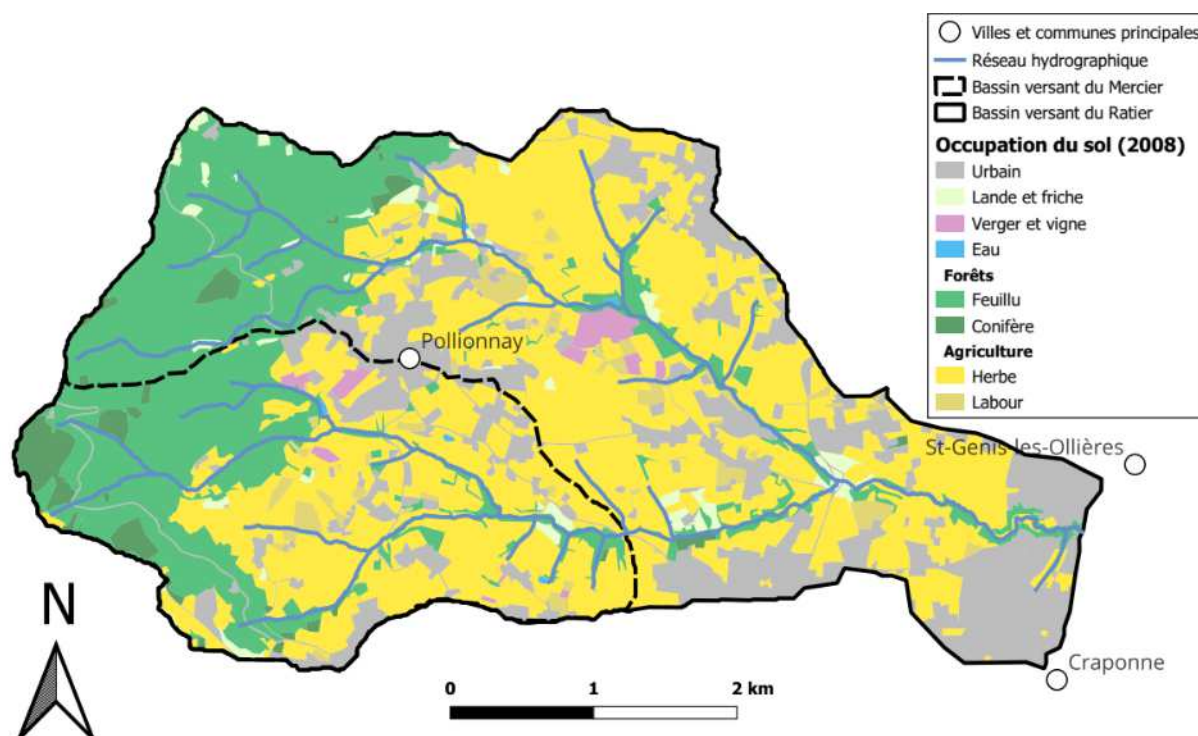


Figure 3 : Carte d'occupation du sol du bassin versant du Ratier pour l'année 2008. Afin de simplifier la représentation, 6 classes représentant des zones urbaines ont été regroupées en une unique classe « Urbain ». D'après Jacqueminet et al. (2013).

**La gestion des eaux d'assainissement** sur le bassin versant du Ratier est partagée entre les communes gérées par la Métropole de Lyon et celles ayant délégué le service au syndicat intercommunal de la haute vallée de l'Yzeron (SIAHVY). Le réseau étant principalement unitaire, la Métropole de Lyon est également en charge de la gestion des eaux pluviales transitant dans le réseau. La tendance est à la

mise en place de réseaux séparatifs depuis 2006 sur le bassin versant de l'Yzeron. Sur la partie amont du bassin, le réseau d'assainissement de la commune de Pollionnay est géré par le SIAHVV. En l'absence de station de traitement des eaux à proximité de la commune de Pollionnay, les eaux transitant dans le réseau géré par le SIAHVV sont connectées en aval au réseau d'assainissement de la Métropole de Lyon qui les transfère ensuite à la station d'épuration de Pierre-Bénite. Les données concernant la localisation du réseau d'assainissement ont été récupérées auprès de la Métropole de Lyon et du SIAHVV.

Les différents types de réseau ont été homogénéisés et simplifiés par Bonneau et al. (2022). Quatre branches principales ont été obtenues à l'échelle du bassin versant du Ratier, chacune correspondant à un réseau d'assainissement indépendant (Grandjouan, 2024). En période de forte pluie, les réseaux d'assainissement peuvent drainer d'importants volumes d'eau qui entraînent un risque de saturation des stations de traitement en aval. D'après les données fournies par la Métropole de Lyon, deux déversoirs d'orage sont localisés en aval du bassin sur la commune de St-Genis-les-Ollières. Le déversement des eaux usées se fait directement dans le cours d'eau du Ratier. En aval du bassin, le sous-dimensionnement du réseau unitaire entraîne le débordement fréquent des eaux d'assainissement dans le milieu naturel pour des pluies modérées à fortes. Des travaux sont en cours depuis 2022 en aval du bassin du Ratier afin d'augmenter la capacité du réseau unitaire. Les données fournies renseignent également sur l'existence de six points de rejets indépendants des réseaux d'assainissement pouvant correspondre à des drains de terrains privés.

### **I.1.2. Situation générale et caractéristiques du bassin versant de la Claduègne**

Le bassin versant de la Claduègne (sous bassin de l'Auzon) est situé dans le Bas-Vivarais entre le massif des Cévennes et la vallée du Rhône, dans le département de l'Ardèche en région Auvergne-Rhône-Alpes. Il couvre une superficie d'environ 42 km<sup>2</sup> (Figure 4).

Ce bassin est représentatif des conditions de Piémont largement présentes sur un axe nord-sud de la région où l'agriculture occupe une place importante (vigne, élevage). Le bassin est relativement représentatif de la région avec la mixité de zones agricoles (prairies, forêts et vignes) et également de zones de sols dégradés sur marnes (apports sédimentaires importants). L'élevage est bien présent sur ces bassins : élevage bovin extensif sur les prairies du plateau du Coiron, élevages porcin, caprin et avicole sur les coteaux marno-calcaires. Les principaux types d'occupation du sol sont les pâturages, les vignes et autres cultures (céréales) et les forêts de feuillus le long des vallées incisées.

**La géologie** du bassin versant de la Claduègne est partagée pour moitié entre roches basaltiques au nord (plateau du Coiron dont l'altitude évolue entre 600 et 800 m) et roches sédimentaires au sud (altitude comprise entre 200 et 500 m), les deux types de géologie étant séparés par un contour de falaises (Hachgenei 2022 ; Uber, 2020 ; Nord et al., 2017) (Figure 5). Cette géologie impacte la topographie des terrains : le plateau basaltique et les collines sédimentaires forment des paysages vallonnés ; tandis qu'au centre du bassin versant, au pied des escarpements, les cours d'eau ont creusé de profondes gorges. On y retrouve des pentes importantes ainsi que la formation de ravines marneuses.

Les types de sols sont fortement influencés par la géologie (Figure 5). Ce bassin versant présente des cours d'eau intermittents soumis à des événements hydrologiques intenses et très variables spatialement.

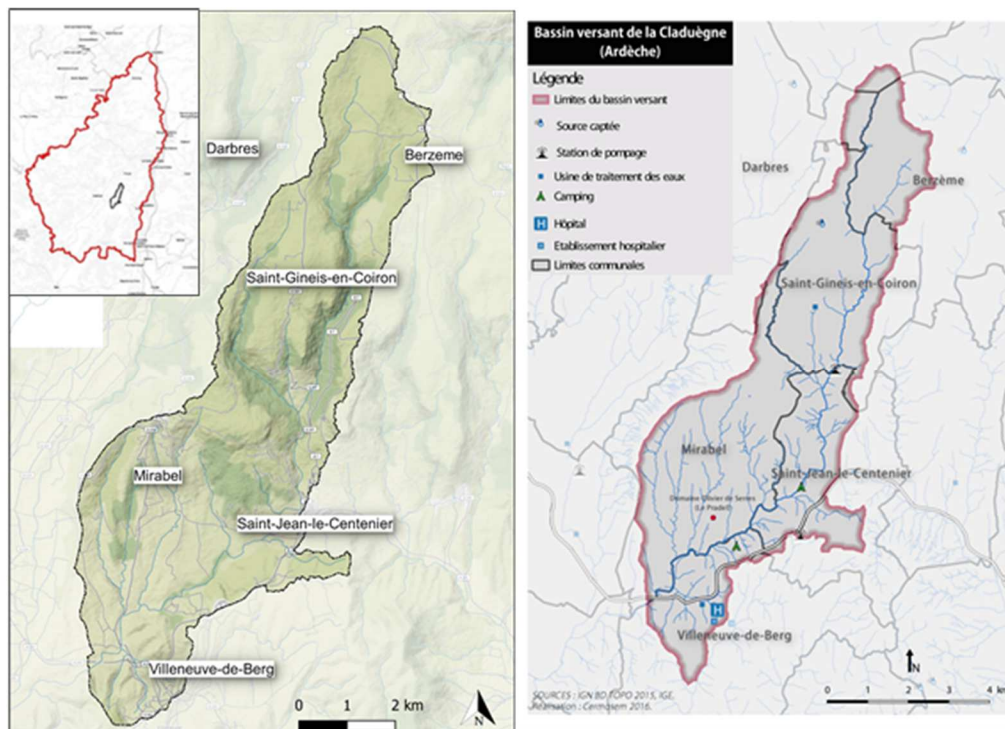


Figure 4 : Présentation du bassin versant de la Claduègne (Source : IGN BD TOPO).

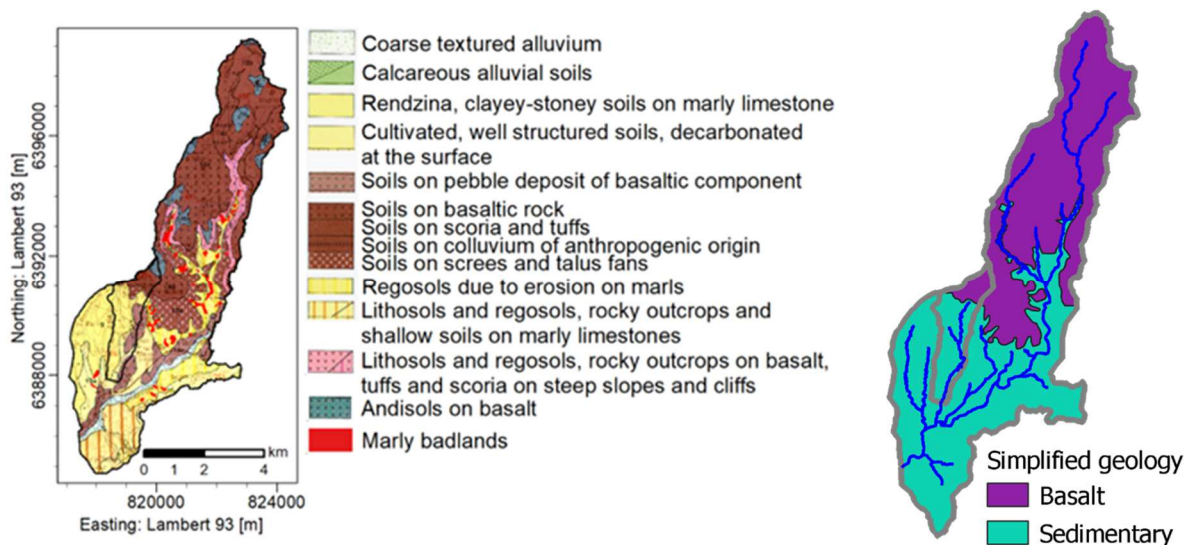


Figure 5 : Carte géologique (à gauche) et carte simplifiée (à droite) du bassin de la Claduègne (le sous-bassin du Gazel est également représenté) – Sources : BRGM, Nord et al. (2017).

**En terme de climat**, le bassin de la Claduègne est situé à mi-chemin entre la plaine du Rhône à l'est et les monts d'Ardèche à l'ouest. Cette région est soumise aux influences climatiques océaniques et méditerranéennes. La précipitation moyenne annuelle est de 1100 mm (Climate Data s.d.).

La région est exposée à différents types de précipitations :

- Les fronts d'ouest apportent des précipitations généralisées d'intensité faible ;
- Des systèmes de convection très localisés provoquent des événements orageux intenses ;

- Enfin, les événements cévenols provoqués par le forçage météorologique des masses d'air humides provenant de la région méditerranéenne, peuvent provoquer des précipitations d'intensité extrêmes (Nord et al., 2017).

Ces précipitations ont lieu notamment à l'automne, puis au printemps dans des quantités moins importantes. Les étés sont très secs, avec des précipitations rares, combinées à des températures élevées. La plupart des cours d'eau s'assèchent ; le bassin versant de la Claduègne a été classé en zone de répartition des eaux (ZRE). Ce classement signale *“une insuffisance chronique des ressources en eau par rapport aux besoins des usagers”* (DREAL – Délégation de bassin, 2017).

La géologie, la topographie et le climat ont un fort impact sur **l'occupation du sol et les activités** dans le bassin versant de la Claduègne.

Sur le plateau du Coiron, l'activité principale est l'élevage extensif de bovins, c'est-à-dire que l'unité de gros bétail (ou gros bovin) (UGB) est minime. Sur ce plateau, on trouve essentiellement des prairies et des pâturages séparés par des haies d'épineux (Figure 6). La densité de population est très faible. D'après les derniers recensements de l'INSEE en 2018, il y avait, par exemple, 169 habitants à Berzème, 115 habitants à Saint-Gineis. Les villages s'apparentent donc plutôt à des hameaux. Les contreforts des escarpements, où l'on trouve les pentes les plus fortes, sont occupés par des espaces naturels de forêts de feuillus et de landes parfois pâturées (Figure 6).

Le sud du bassin versant est aussi très agricole (Figure 6). On y retrouve une pluralité de type de production : des élevages bovins, ovins, caprins, porcins et volailles plein air. Cette pluralité se traduit en termes d'occupation du sol par la présence de parcours pour la volaille, de pâturages et de surfaces de prairies temporaires ou permanentes, destinées à la production de fourrage, et enfin quelques surfaces de cultures de céréales. Mais ce qui marque la différence avec le plateau du Coiron, c'est la forte présence de vignobles ainsi que de quelques vergers. Cette multiplicité dans les exploitations agricoles est due à la nécessité de diversifier leur production. Cela permet aux exploitants ou agriculteurs d'avoir une plus grande stabilité de revenus. De manière générale un producteur cumule :

- des hectares de vignes ;
- l'élevage d'un type de bétail (bovin, ovin, caprin, ...) ;
- l'élevage de volaille (poulets Label Rouge ou pondeuses plein air).

La partie sud du bassin est plus urbanisée. Placés à mi-chemin entre Aubenas et Montélimar sur l'axe de la RN122 (axe traversant entre le Puy en Velay / Clermont-Ferrand et la vallée du Rhône), ces villages profitent de leur situation géographique et les zones résidentielles s'agrandissent. Villeneuve de Berg est la plus grande ville située dans le bassin. Il y a environ 3000 habitants. On y trouve un collège, un hôpital gériatrique et une station d'épuration dont les eaux traitées rejoignent un affluent de la Claduègne.

De plus, durant la saison estivale, la région profite très largement de l'activité touristique. Ainsi au sud du bassin versant se trouvent deux campings étoilés : à Saint-Jean-le centenier et à Villeneuve de Berg. Fermés en hiver, durant la saison estivale ils accueillent respectivement jusqu'à 800 et 3 000 personnes.

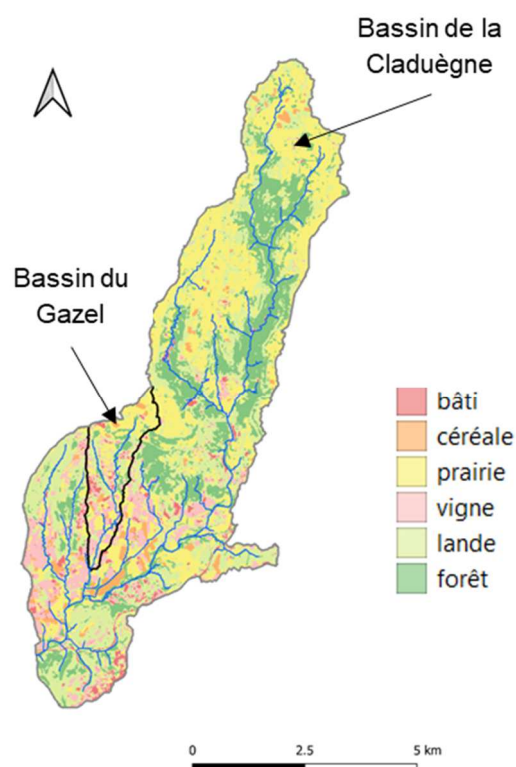


Figure 6 : Carte du bassin de la Claduègne avec les usages de sol (le sous-bassin du Gazel est également représenté) (d'après Josse, 2021).

## I.2. Matériels et méthodes pour la réalisation des enquêtes et de la cartographie haute résolution

### I.2.1. Acquisition de données par entretien

Un travail de remise à jour des occupations du sol a été mené par Bétemps (2021) dans le cadre de ce projet pour préciser les occupations du sol, en particulier pour les surfaces agricoles. Ce travail a consisté en des enquêtes de terrain auprès des principaux acteurs des territoires afin de préciser les occupations du sol à l'échelle de la parcelle. Les enquêtes étaient menées sous la forme d'un entretien semi-directif : un certain nombre de points à aborder ont été identifiés en amont, laissant également la place à des discussions plus larges avec les enquêtés.

**Sur le bassin versant du Ratier**, les enquêtes ont été menées auprès de 17 agriculteurs et 5 centres équestres. Les parcelles enquêtées représentent 70% de la surface totale du Registre Parcellaire Graphique (RPG) et 25% de la surface totale du bassin versant. Les données récoltées pendant ces enquêtes ont permis d'obtenir une classification plus précise de l'occupation du sol définie comme agricole selon Jacqueminet et al. (2013), comprenant les classes culture, maraîchage, verger, prairie permanente, pâturage bovin, équin et ovin, carrière, décharge et autre (Figure 7). Les prairies permanentes correspondent à des parcelles qui ne sont pas utilisées dans les rotations de culture. La classe culture regroupe les zones de fourrages et de céréales, mais également les prairies temporaires utilisées dans les rotations de culture.



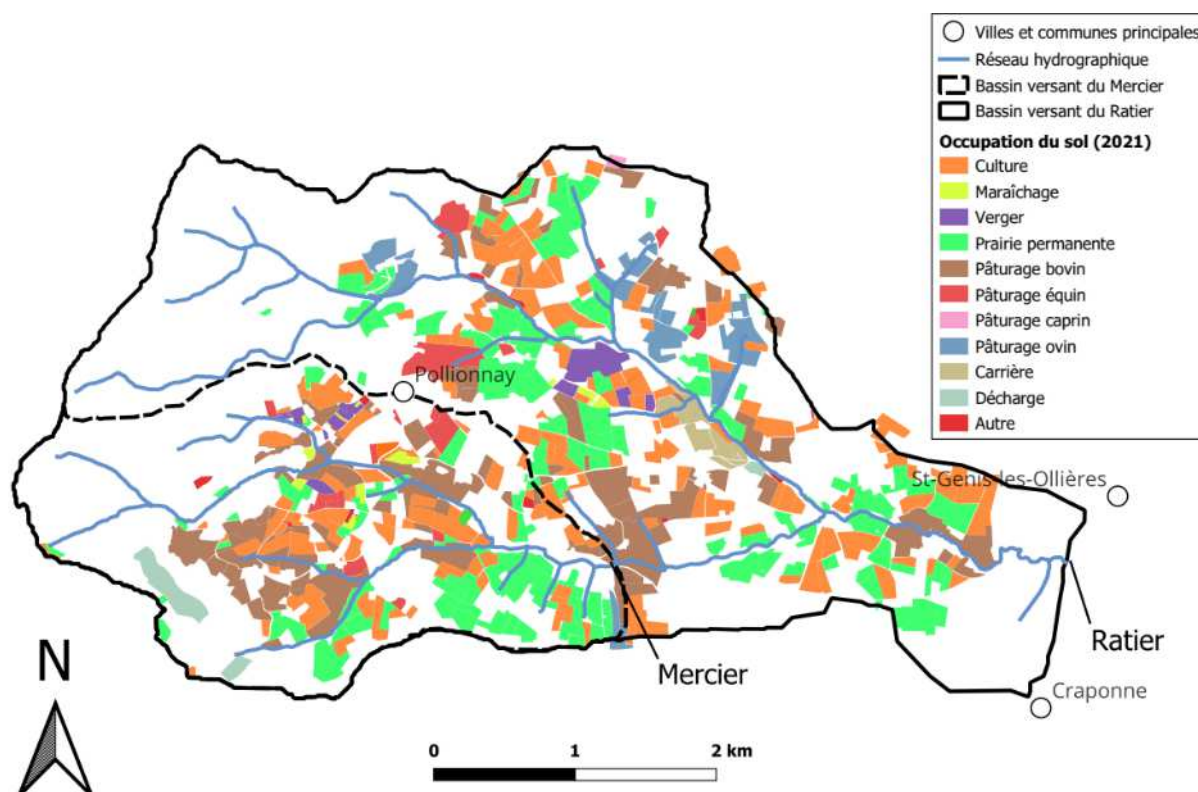


Figure 7 : Carte d'occupation du sol pour les parcelles enquêtées sur le bassin versant du Ratier pour l'année 2021, d'après le travail mené par Bétemps (2021).

**Sur le bassin versant de la Claduègne**, à la suite de la campagne menée durant l'été 2021 pour réaliser des entretiens auprès des acteurs socio-économiques, 28 producteurs ont été enquêtés, soit environ 25% du bassin versant ou 40% du RPG (Figure 8) ; 2 campings ont été enquêtés et les 3 mairies concernées par les STEP ont été contactées.

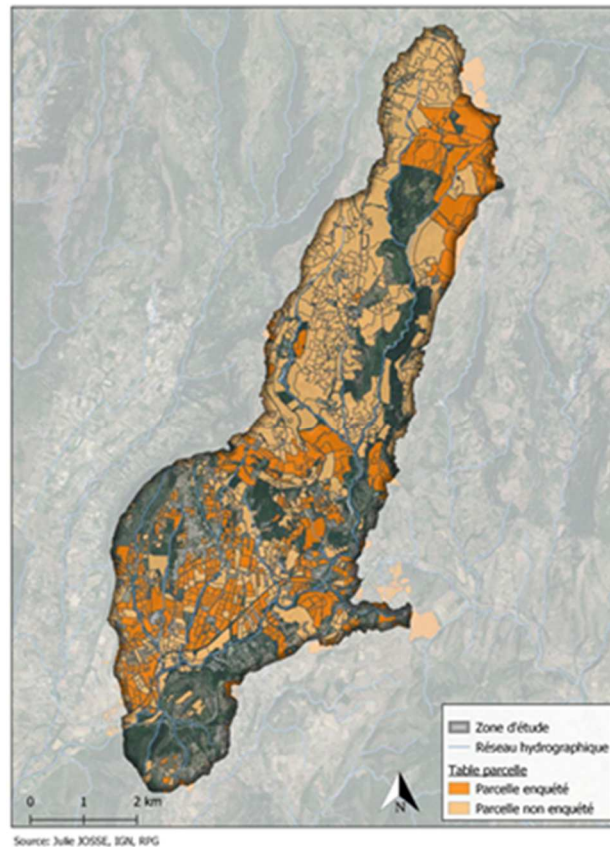


Figure 8 : Localisation des parcelles enquêtées et non enquêtées sur le bassin versant de la Claduègne (source : Josse, 2021)

### I.2.2. Acquisition de données par télédétection

Une série d'images satellites Sentinel-2 a été utilisée pour la cartographie de l'occupation du sol à l'échelle des deux bassins versants. Les images utilisées dans le cadre de ce projet ont été acquises sur l'année 2020. Les images sont disponibles sur le site Theia (<https://www.theia-land.fr/>), le pôle de données et de services surfaces continentales.

Les images Sentinel-2 présentent des caractéristiques intéressantes pour la cartographie de l'occupation agricole en milieu agricole et périurbain :

- une haute résolution spatiale (10 m de résolution spatiale pour les bandes du visible et du proche infrarouge et 20 m de résolution spatiale pour les bandes du red-edge et de l'infrarouge moyen) ;
- une fréquence de revisite élevée : passage tous les 5 jours ;
- une acquisition multispectrale avec 13 bandes spectrales du visible au moyen infrarouge ;
- un accès facilité pour la recherche.

Les images Sentinel-2 sont des images optiques, elles sont donc sensibles aux conditions atmosphériques et à la présence de nuages. L'acquisition réelle peut donc varier en fonction des conditions d'ennuage. Un masque des zones de nuage accompagne chaque image satellite.

Concernant le bassin versant du Ratier, pour l'année 2020, 25 images (Tuile T31TFL) sont disponibles. En fonction de la couverture nuageuse, finalement 20 images sont conservées (Figure 9).



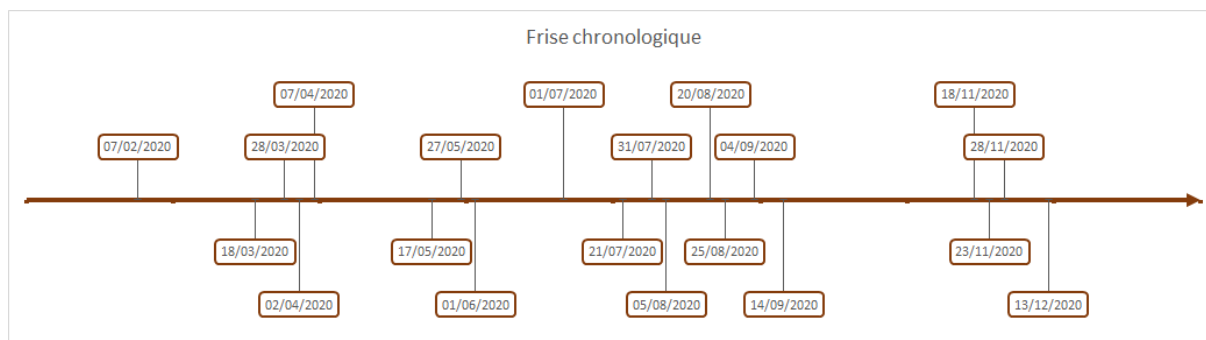


Figure 9 : Répartition des images satellites Sentinel-2 utilisées pour l'année 2020 sur le bassin versant du Ratier.

Concernant le bassin versant de la Claduègne, sur l'année 2020, 38 images claires (Tuile T31TKD) ou présentant une couverture nuageuse très faible sont disponibles. Afin d'optimiser les traitements, seulement 14 images sont conservées. Ces images se répartissent de manière régulière dans l'année permettant de suivre l'évolution temporelle de la couverture des sols (Figure 10).

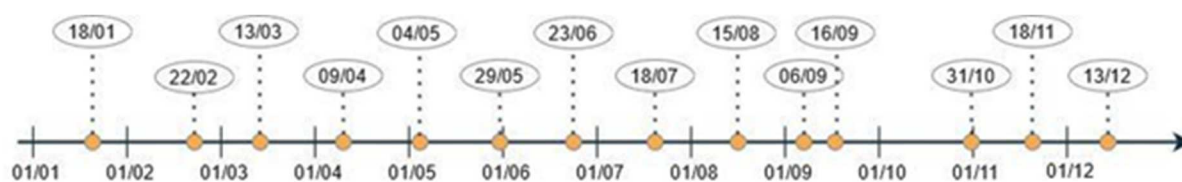


Figure 10 : Répartition des images satellites Sentinel-2 utilisées pour l'année 2020 sur le bassin versant de la Claduègne.

Le logiciel open source Orfeo Tool Box (OTB), dédié au traitement d'images satellites et développé par le CNES (<https://www.orfeo-toolbox.org/>), a été utilisé conjointement avec QGIS (<https://www.qgis.org/fr/site/>) pour le traitement des données et la production des cartes d'occupation du sol. Plusieurs types d'indices sont calculés sur chacune des images, permettant ainsi l'étude de l'évolution intra-annuelle de chaque pixel constituant l'image. A travers l'analyse et la classification automatique des profils temporels issus de ces indices, nous obtenons pour chacun des bassins versants une cartographie fine de l'occupation et de l'usage du sol.

### I.2.3. Création d'une base de données spatialisée

Plusieurs étapes ont été menées pour la construction de la base de données pour les deux bassins versant étudiés :

- 1- Récolte des données : entretiens, RPG, BD Topo, DatARA, parcellaire...
- 2- Définition des informations à rentrer dans la base : parcelles, occupation du sol, exploitant, fumiers, produits phytosanitaires, animaux, produits vétérinaires, bâtiments, périodes...
- 3- Regroupement d'informations en classes. Par exemple, pour les occupations du sol, nous nous sommes basés sur les informations du RPG et nos observations de terrain. Les classes sont détaillées dans les détails de la base de données.

4- Construction des tables sous Qgis et Excel. Certaines sont différentes selon les spécificités des bassins versants.

5- Remplissage des tables avec les informations. Nous avons dû faire certains choix pour permettre la lisibilité des informations. Par exemple pour le nombre d'animaux, nous avons pris le nombre de mères, ou le nombre donné par l'exploitant s'il n'avait pas précisé. Ces choix sont explicités dans les détails de la base de données.

6- Essais de requêtes SQL.

### **I.3. Identification et localisation des sources potentielles de pollution**

#### **I.3.1. Une base de données spatialisées**

La base de données permet d'organiser et de rendre plus accessibles les données récoltées. Les informations sont stockées dans différentes tables reliées entre elles. Les données sont spatialisées, et il est alors possible de requêter les informations nécessaires dans la base et d'avoir une sortie visuelle sous Qgis.

Plus précisément, la base de données est organisée :

- Par type d'occupation du sol ;
- Par type de polluant.

De plus, il y a une localisation des informations par parcelle ou bâtiment agricole.

La base de données s'organise selon le schéma relationnel illustré par la Figure A1 (Annexe 1). Les classes d'occupation du sol retenues sont détaillées dans le Tableau A1 (Annexe 1).

#### **I.3.2. Des cartographies d'occupation du sol**

Pour chacun des bassins versants, nous avons obtenu une cartographie fine de l'occupation du sol à partir des séries temporelles d'images satellites (Figure 11 et Figure 12).

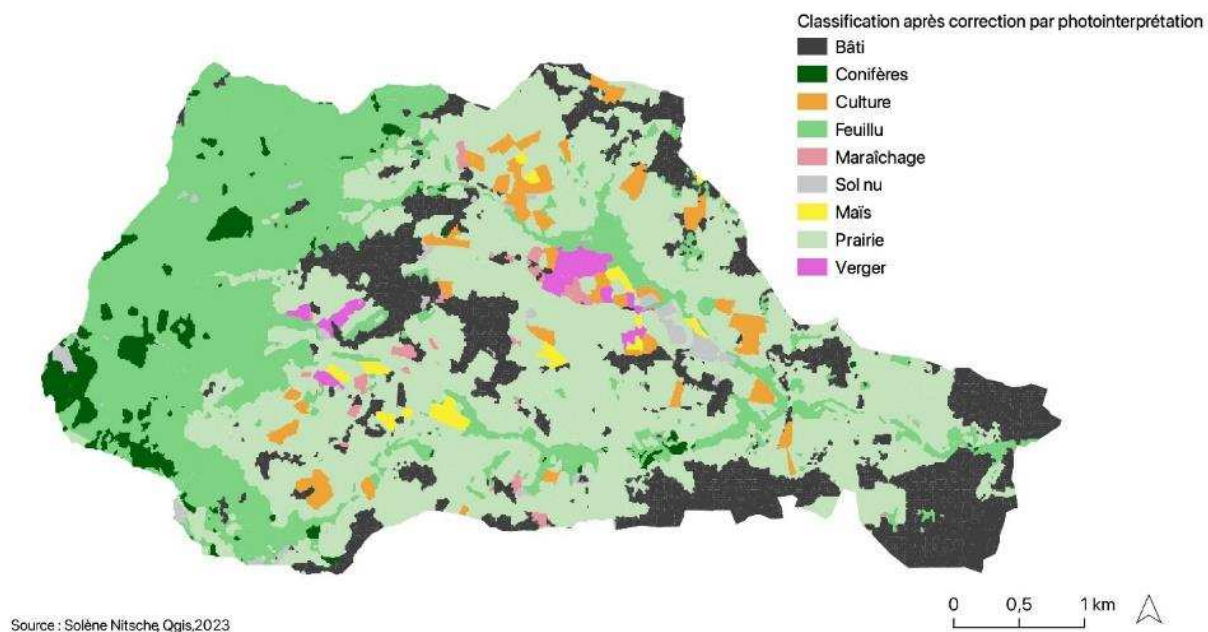


Figure 11 : Carte de l'occupation du sol du bassin versant de l'Yzeron en 2020 (réalisée à partir de données de télédétection corrigées par photointerprétation) (source : Betemps, 2021).

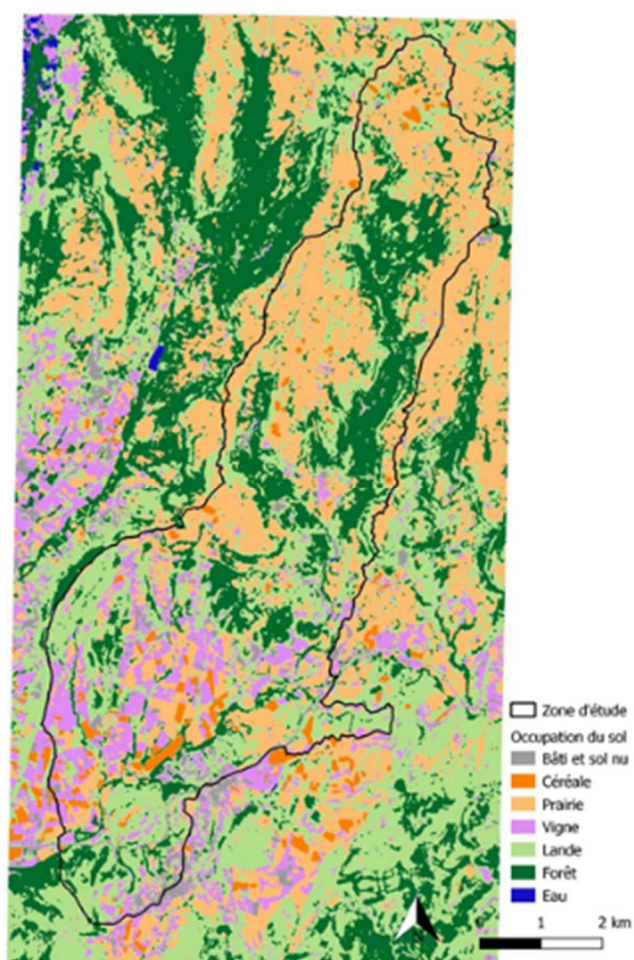


Figure 12 : Carte de l'occupation du sol du bassin versant de la Claduègne en 2020 (réalisée à partir de données de télédétection) (source : Josse, 2021).

A partir de ces cartes, nous pouvons extraire les occupations du sol majoritaires en proximité des cours d'eau et des zones de prélèvements (eau et sol) qui seront réalisés dans le projet. Un exemple est présenté avec la Figure 13.

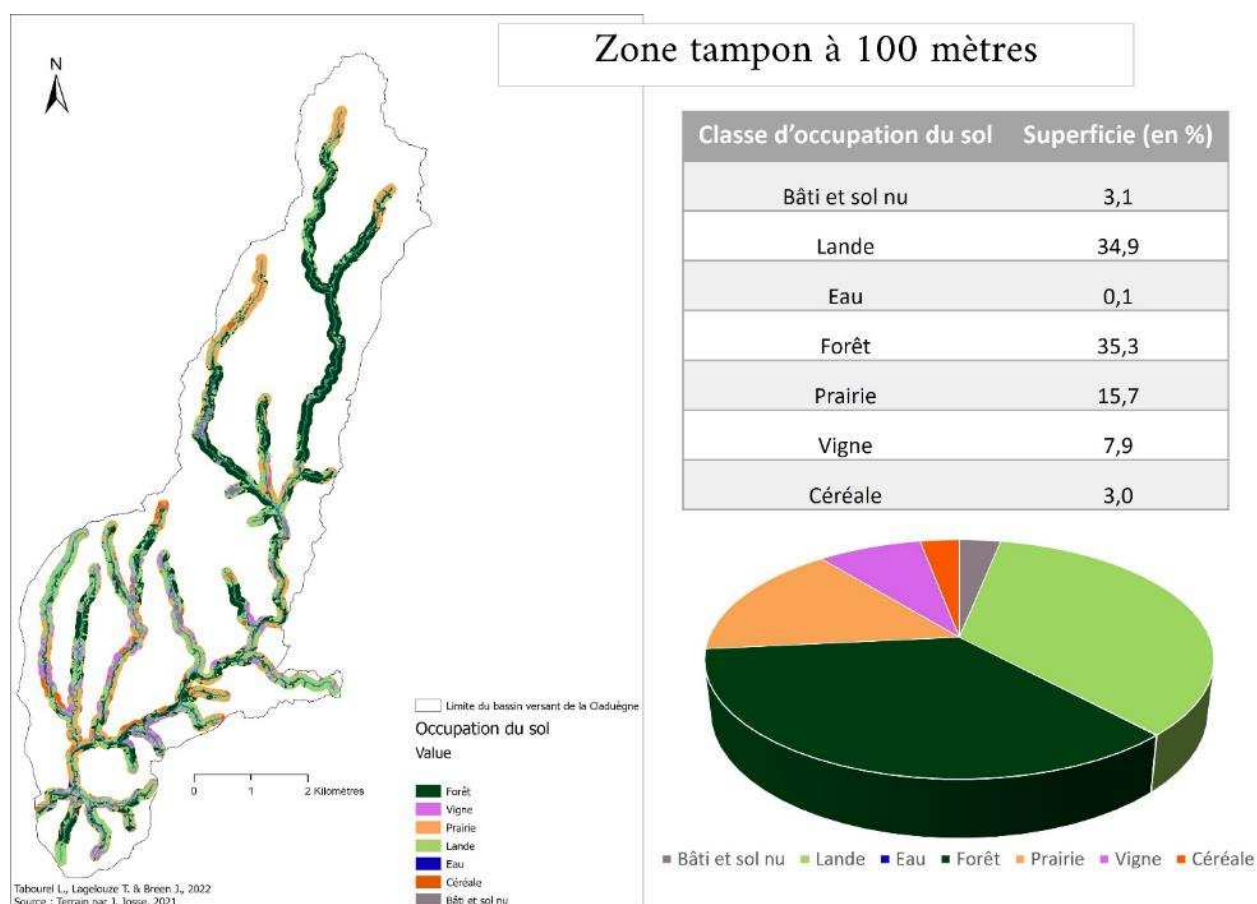


Figure 13 : Exemple d'extraction en lien avec la proximité au cours d'eau, pour le bassin versant de la Claduègne.

## II. Identification des sources et caractérisation des sous-bassins versants

---

Les données d'enquêtes et de cartographie, couplées à des reconnaissances de terrain (cf. Chapitre I), ont permis de définir une dizaine de sites d'échantillonnage appelés « sources » dans les cours d'eau en aval de sous-bassins élémentaires considérés comme « homogènes » en termes de géologie, pédologie, occupation et usage du sol, sur le bassin de la Claduègne et du Ratier. L'objectif est d'échantillonner des eaux drainées représentatives de ces sources à l'exutoire de chaque sous-bassin élémentaire homogène. Ces sites sont représentatifs des principaux types de sources de pollution pouvant être rencontrées sur les bassins versants et qui vont influencer la qualité des eaux le long des cours d'eau et aux exutoires des bassins versants.

### II.1. Méthodologie d'identification des sources

#### II.1.1. Bassin versant du Ratier

Un travail d'identification des sous-bassins « sources » a été effectué à partir des facteurs suivants :

- les classes de formations géologiques (gneiss et colluvions ; Grandjouan, 2024 ; Figure 2) ; les classes de capacité au champ du sol décrivant les capacités de stockage du sol (Labbas, 2015 ; Grandjouan, 2024) ; les classes d'occupation du sol définies en 2008 (conifère, feuillu, herbe, labour, lande et friche, verger et vigne, jardin et maraîchage, urbain et eau ; Jacqueminet et al., 2013 ; voir Figure 3) ; et les classes d'occupation du sol précisées en 2021 (culture, maraîchage, verger, prairie permanente, pâturage bovin, équin, caprin, ovin, carrière, décharge et autres ; Bétemps, 2021 ; voir Figure 7).

Pour identifier les sous-bassins « homogènes » avec ces caractéristiques, ces données sont croisées avec les sous-bassins constituant le bassin versant du Ratier. Ces sous-bassins sont délimités à partir d'un Modèle Numérique de Terrain (MNT) (Grandjouan, 2024). Ce MNT a une résolution initiale de 1 m ; il a été redéfini à 5 m de résolution de façon à obtenir des sous-bassins aux surfaces assez grandes pour permettre un écoulement de surface des eaux drainées, mais assez petites pour garantir une homogénéité des sous-bassins pour les différents facteurs descriptifs. Un total de 309 sous-bassins a été obtenu, avec des surfaces comprises entre 1 et 30 ha pour une moyenne de 6 ha. La Figure 14 (gauche) présente les données géologiques, de capacité au champ, et d'occupation du sol croisées avec ces sous-bassins.

Chacun des sous-bassins est ensuite associé à une classe parmi celles décrites pour la géologie, la capacité au champ, et l'occupation du sol, pour laquelle le sous-bassin est considéré comme « homogène ». Cette association est effectuée seulement si une classe représente plus de 50% de la surface du sous-bassin correspondant. Ce seuil a été défini de manière arbitraire pour identifier les sous-bassins selon les classes majoritairement représentées. Si aucune des classes ne représente plus de 50% de la surface du sous-bassin, ce dernier n'est pas considéré comme homogène. La Figure 14 (droite) présente les sous-bassins « homogènes » obtenus pour la géologie, la capacité au champ, et l'occupation du sol, respectivement.



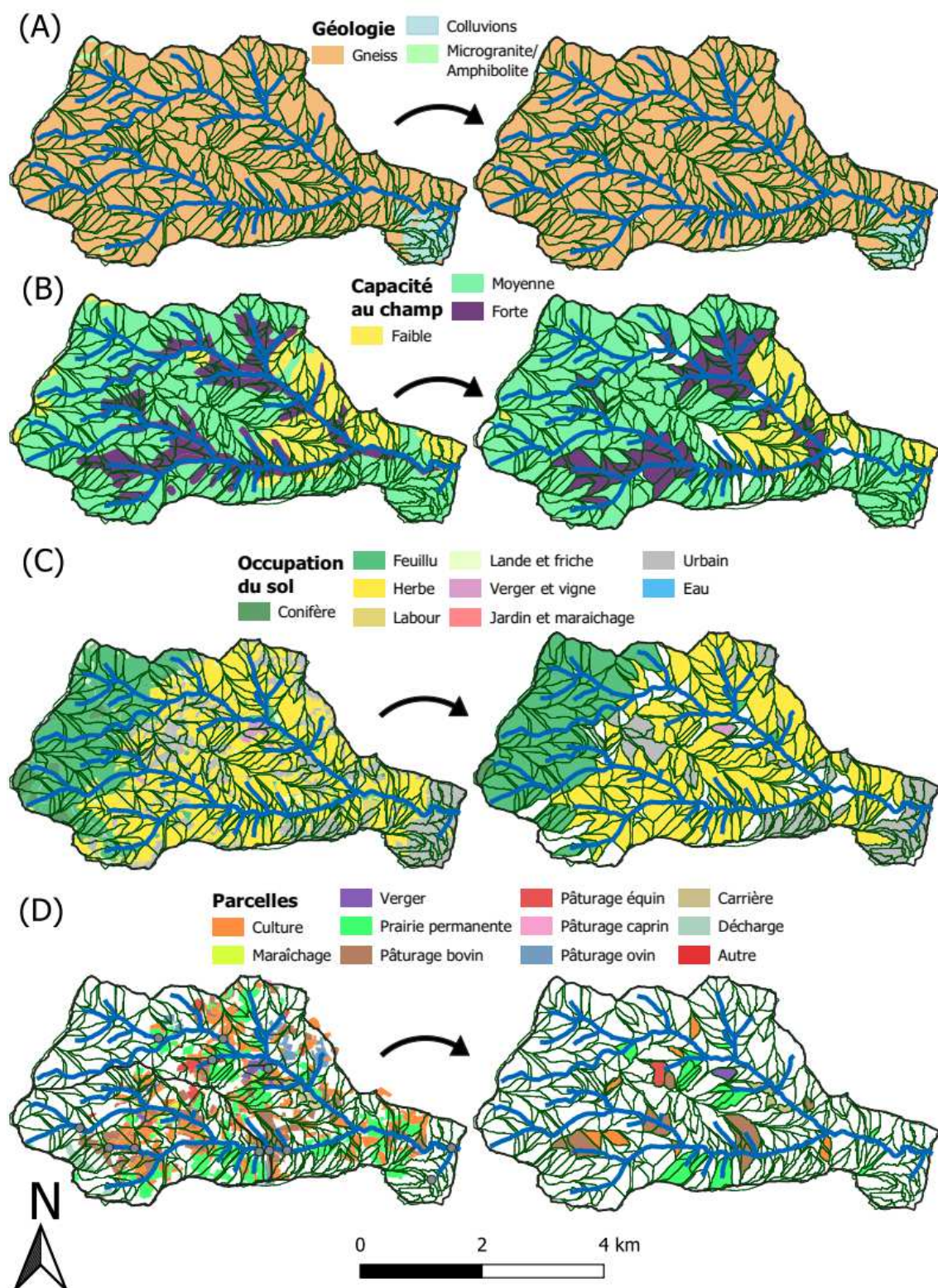


Figure 14 : Croisement des cartes (A) géologique, (B) de capacité au champ, (C) d'occupation du sol 2008 et (D) d'occupation du sol 2021, avec les sous-bassins générés à partir d'un Modèle Numérique de Terrain à 5 m. Les sous-bassins sont associés à une classe si elle représente au moins 50% de sa surface. La partie droite de la figure présente les résultats de ces associations. Les sous-bassins en blanc ne sont pas considérés comme homogènes.

Les sous-bassins « homogènes » obtenus ont ensuite été superposés pour obtenir les combinaisons de facteurs existant sur le bassin. Enfin, à partir de ces combinaisons, les sources identifiées comme principales sur le bassin et qui ont été ciblées pour les prélèvements sont :

- les surfaces forestières liées à une capacité au champ moyenne et à des gneiss ;
- les prairies permanentes liées à une capacité au champ moyenne et à des gneiss ;
- les pâturages bovins liés à une capacité au champ faible et à des gneiss ;
- les pâturages bovins liés à une capacité au champ moyenne et à des gneiss ;
- les pâturages équins liés à une capacité au champ moyenne et à des gneiss ;
- les cultures liées à une capacité au champ moyenne et à des gneiss ;
- les eaux de ruissellement urbain ;
- l'exutoire canalisé de l'aquifère des colluvions ;
- les eaux d'assainissement du réseau unitaire.

### **II.1.2. Bassin versant de la Claduègne**

Un travail d'identification des sous-bassins « sources » a été effectué à partir des facteurs suivants : les classes de formations géologiques et les sols (basaltique et sédimentaire, Figure 5), et les classes d'occupation du sol calculées à partir d'images satellites et corrigées par des visites de terrain (Figure 12).

La géologie du bassin de la Claduègne est composée pour moitié de basalte et pour moitié de séries marno-calcaires. L'usage du sol est lié à la géologie et les sols qui en dérivent. Donc le milieu a été simplifié à deux grands types de sols (voir Figure 5 droite). Les usages de sols sur le bassin sont les suivants : cultures (céréales), vignes, prairie d'élevages (permanentes et plantées), landes, forêt et urbain. En croisant la géologie (x2) et les usages de sols (x6), on obtiendrait au maximum 12 catégories différentes.

Pour sélectionner des sous-bassins « source », les possibilités sont en réalité assez réduites si l'on tient compte des contraintes suivantes :

- le sous-bassin doit être un bassin de tête, ce qui signifie que la surface drainée converge vers un cours d'eau central où il est possible de définir un exutoire dont les eaux prélevées sont représentatives de toute la surface drainée ; par opposition au bassin de parcours dont la surface drainée est située d'un seul côté du cours d'eau récepteur en apportant de l'eau de façon diffuse le long de ce cours d'eau récepteur sans qu'il soit possible de définir un point de prélèvement représentatif uniquement du sous-bassin ;
- l'usage doit être soit le plus homogène possible au sein du sous-bassin ;
- l'accès jusqu'au point de prélèvement doit être facile en voiture (et à pied) et sur chemin public.

En dessous de 0.15 km<sup>2</sup> de surface drainée, on ne peut pas identifier dans le paysage un réseau hydrographique prenant l'apparence d'un cours d'eau avec un lit mineur et des berges caractéristiques. Il n'est donc pas possible de prélever des sources de types « eau de rivière » dans des sous-bassins d'usage unique en dessous de cette surface. Cependant, au-delà de 0.15 km<sup>2</sup> de surface drainée, il est difficile voire impossible de trouver des sous-bassins versants dont l'usage soit



homogène, à l'exception de la lande et de la forêt sur les séries marno-calcaire. **Dans les coteaux marno-calcaires** de cette région d'Ardèche, les exploitations agricoles sont de type poly-activité avec de l'élevage, de la vigne et des céréales sur des petites parcelles. Souvent, les fumiers sont épandus localement sur des parcelles cultivées (vignes, céréales, prairies semées). Sur les séries marno-calcaires, on rencontre donc tous les usages (vignes, culture, prairie, forêt et urbain), et les prairies sont principalement destinées à l'élevage (porcin, ovin, caprin et avicole). **Sur le plateau basaltique**, les activités dominantes sont l'élevage (ovin et bovin) et un peu de culture de céréales. La forêt est cantonnée aux parties de gorges incisées le long de la rivière principale et ne remontent pas en tête de bassin sur le plateau basaltique. Il n'y a pas de zone urbaine ni de vignes. Par conséquent, nous avons identifié deux usages dominants sur le plateau basaltique : prairie et forêt.

Les principaux rejets ponctuels ont également été sélectionnés pour échantillonner les rejets urbains (sortie de station d'épuration, rejet ponctuel de laiterie et rejet de filtres plantés de roseaux d'un camping).

## **II.2. Sélection des points de prélèvement**

### **II.2.1. Bassin versant du Ratier**

Pour chacune des sources identifiées, au minimum un point de prélèvement a été sélectionné sur le bassin du Ratier. Les sous-bassins et points de prélèvement définitifs ont été choisis à partir de reconnaissances sur le terrain. En effet, les occupations du sol peuvent évoluer d'une année à l'autre, en particulier pour les surfaces agricoles. Pour certaines sources, deux points de prélèvement ont été définis, dans le but de comparer les compositions biogéochimiques obtenues pour des eaux issues de sous-bassins homogènes similaires (ex : deux sous-bassins forêt sur gneiss avec une capacité de champ moyenne). Le Tableau 1 présente les caractéristiques des points de prélèvement sélectionnés, et la Figure 15 la localisation de ces points et les sous-bassins correspondants. La Figure 16 présente les photos des points de prélèvement sélectionnés. Finalement, 11 points de prélèvement ont été définis pour représenter i) des sources diffuses associées à des occupations forestières (BOU et VRY), de prairie permanente (VRN), de pâturages bovins (PNC et REV), de pâturage équin (GAR), et de cultures (BID et BAL), ii) l'eau de la nappe des colluvions (COR), iii) des sources ponctuelles de ruissellement urbain (PLR et PLU) et du réseau unitaire d'assainissement (RES).

Pour la source du pâturage équin (GAR), l'impact de l'élevage équin a été considéré comme principal car les écoulements sur surfaces imperméabilisées (65%) devraient être théoriquement captés par le réseau unitaire de Pollionnay. Les indicateurs déployés dans l'étude permettront de vérifier cette hypothèse. Pour la source pâturage bovin (PNC), aucune occupation du sol spécifique ne dépasse 50% de la superficie du bassin. L'impact de l'élevage bovin a été considéré comme principal car ces zones se situent au plus proche des écoulements observés sur le bassin, même si le nombre de bovins observés sur ces prairies reste relativement faible.

Tableau 1 : Sources principales identifiées sur le bassin versant du Ratier selon les combinaisons de facteurs et caractéristiques des sous-bassins et des points de prélèvement sélectionnés. Les coordonnées X et Y sont représentées dans le système Lambert 93.

Sources			Sous-bassins et points de prélèvement					
Géologie	Capacité au champ	Occupation du sol	Nom du point de prélèvement	Surface sous-bassin (ha)	Occupation du sol primaire	Occupation du sol secondaire	X	Y
Gneiss	Moyenne	Forêt	Bouillon (BOU)	151	Forêt (100%)	-	828785	6520413
			Verdy (VRY)	88	Forêt (100%)	-	827467	6518881
Gneiss	Moyenne	Prairie permanente	Varennnes (VRN)	18	Prairie (70%)	Forêt (30%)	830467	6518478
Gneiss	Faible	Pâturage bovin	Revay (REV)	13	Pâturage bovin (70%)	Forêt (30%)	830934	6518499
Gneiss	Moyenne	Pâturage bovin	Ponce (PNC)	28	Pâturage bovin (30%)	Décharge (20%) Forêt (40%) Culture (5%)	827954	6518547
Gneiss	Moyenne	Pâturage équin	Garnière (GAR)	36	Pâturage équin (20%)	Urbain (65%)	829683	6520042
Gneiss	Moyenne	Culture	Balmes (BAL)	6	Culture (56%)	Labour (38%)	829865	6520400
			Baillardières (BID)	5	Culture (100%)	-	830643	6519909
-	-	Urbain	Ruissellement urbain (PLR)	-	Urbain (100%)	-	830636	6518494
Colluvions	-	-	Corlevet (COR)	40	-	-	833351	6518000
Réseau d'assainissement			Réseau d'assainissement (RES)	-	-	-	833682	6518544

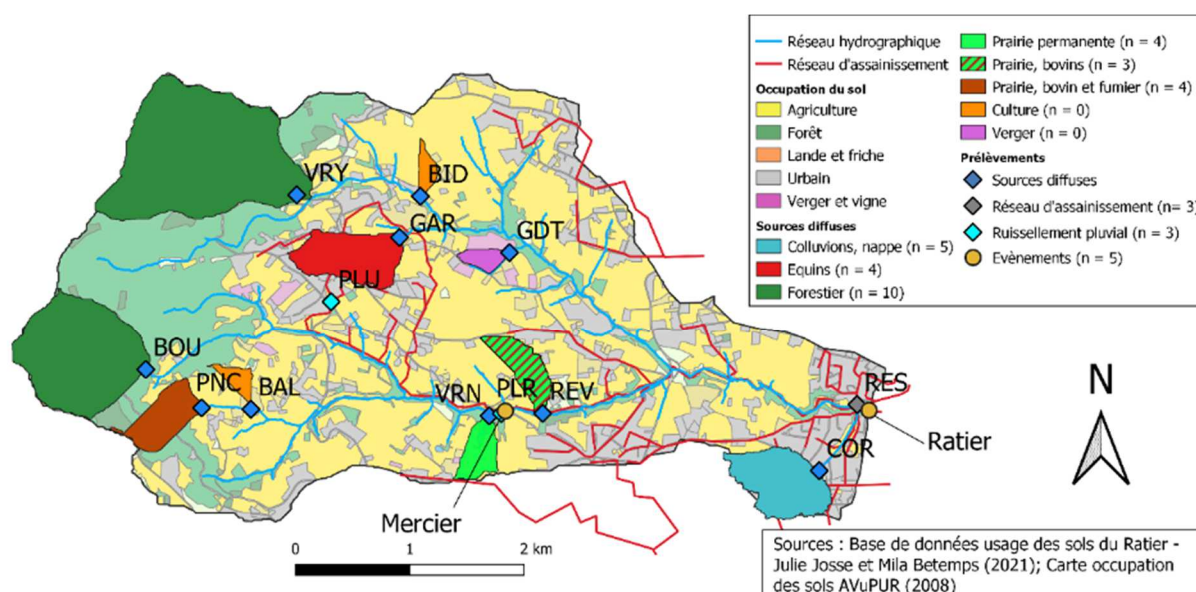


Figure 15 : Localisation des points de prélèvement pour les sources identifiées sur les bassins versants du Mercier et du Ratier, ainsi que des sous-bassins drainés correspondants. BOU : Bouillon ; VRY : Verdy ; VRN : Varennnes ; REV : Revay ; PNC : Ponce ; GAR : Garnière ; BAL : Balmes ; BID : Baillardières ; GTD : Grandes Terres ; PLR : Ruissellement urbain ; COR : Corlevet ; RES : Réseau d'assainissement. Les points BID (culture), BAL (culture) et GTD (verger) n'ont pas pu être échantillonnés faute d'écoulement.



Figure 16 : Photographies des points de prélèvement sur le bassin versant du Ratier, correspondant au (A) Bouillon (BOU), (B) Verdy (VRY), (C), Varennes (VRN), (D) Revay (REV), (E) Ponce (PNC), (F) Garène (GAR), (G) Corlevet (COR), (H) Ruissellement urbain (PLR) et (I) Réseau d'assainissement (RES).

### II.2.2. Bassin versant de la Claduègne

Dans les travaux de Nord et al. (2017) et Martins et al. (2019), un travail d'identification de bassins de tête aux usages homogènes et au réseau hydrographique existant avait déjà été mené. Nous avons donc valorisé 8 points de prélèvement ou sous-bassins des projets antérieurs (Cf. Annexe 2). Nous avons ajouté 5 sous-bassins sur les séries marno-calcaire pour échantillonner l'ensemble des usages. Ces sous-bassins ont été choisis car ils ont un usage dominant, alors que beaucoup de sous-bassins élémentaires sur les séries marno-calcaire ont des usages mixtes avec aucun usage prédominant.

- MI6 et SJ4 : élevage de porcs sur prairie ;
- MI7 : lande (ancienne terre agricole abandonnée) ;



- VB3 : vignes et culture ;
- STF : rejet ponctuel de la laiterie de la ferme caprine. Cette ferme a plus que doublé son nombre de chèvres dans les deux dernières années.

Le récapitulatif des 13 points de prélèvement source échantillonnés pour la Claduègne (10 sources diffuses associées à des occupations du sol et géologies définies, et 3 sources ponctuelles de rejets) est présenté dans le Tableau 2 ; ces points sont illustrés sur les Figure 17 et Figure 18.

*Tableau 2 : Récapitulatif des 13 sources échantillonnées pour la Claduègne (10 sources diffuses et 3 sources ponctuelles), avec la répartition de l'occupation du sol, la géologie et les usages dominants et secondaires.*

	% d'occupation des sols						Géologie	usage dominant	usage secondaire
	urbain*	culture	Prairie	Vigne	Lande	Forêt			
MI1	1.8	12.9	71.2	0	8	6	basalte	prairie ovin bovin	culture
SG1	0.4	1.3	80	0	16.7	1.5	basalte	prairie ovin bovin	culture
SG2	1.5	6.3	37.4	0	27.8	27	basalte	forêt	prairie
MI2	13.4	1.6	41.5	0	32.6	11	marno-calcaire	lande ouverte	urbain assainissement individuel + volailles
VB2	28.6	0	13.7	0	44.1	13.6	marno-calcaire	lande ouverte	urbain+hopital assainissement collectif
MI6	1.7	0	44.9	0	49.4	4.1	marno-calcaire	prairie porcine	lande ouverte
SJ4	4.6	0	12.9	0	80.4	2.1	marno-calcaire	lande ouverte	prairie porcine
MI7	3.3	0	12.9	1.6	75.2	7	marno-calcaire	lande ouverte	
VB1	0.1	0	0	0	53.1	46.8	marno-calcaire	forêt	lande fermée
VB3	11.4	21.5	6.3	44	16.8	0	marno-calcaire	vignes	culture
STV								rejet ponctuel urbain (STEP)	
STF								rejet ponctuel laiterie caprine	
STC								rejet ponctuel station filtres plantés de roseaux camping	

\* urbain = surface bâtie et sol nu

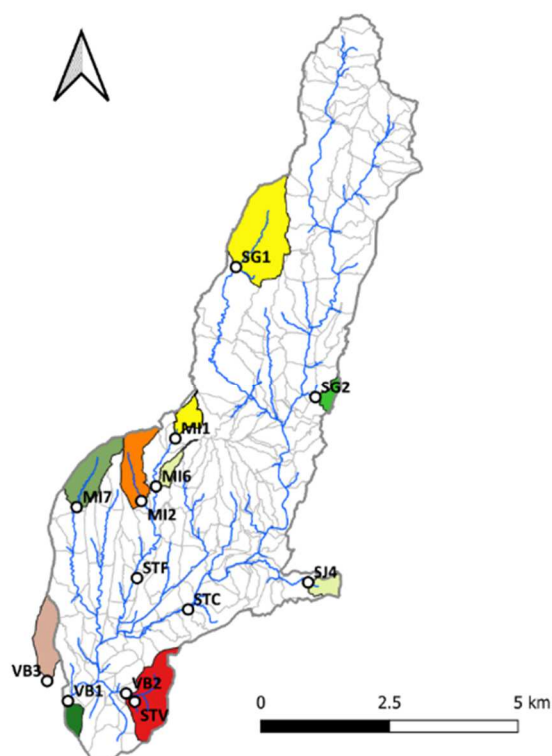


Figure 17 : Localisation des 13 points de prélèvement des sources et sous-bassins, cours d'eau et codes stations pour le bassin de la Claduègne.

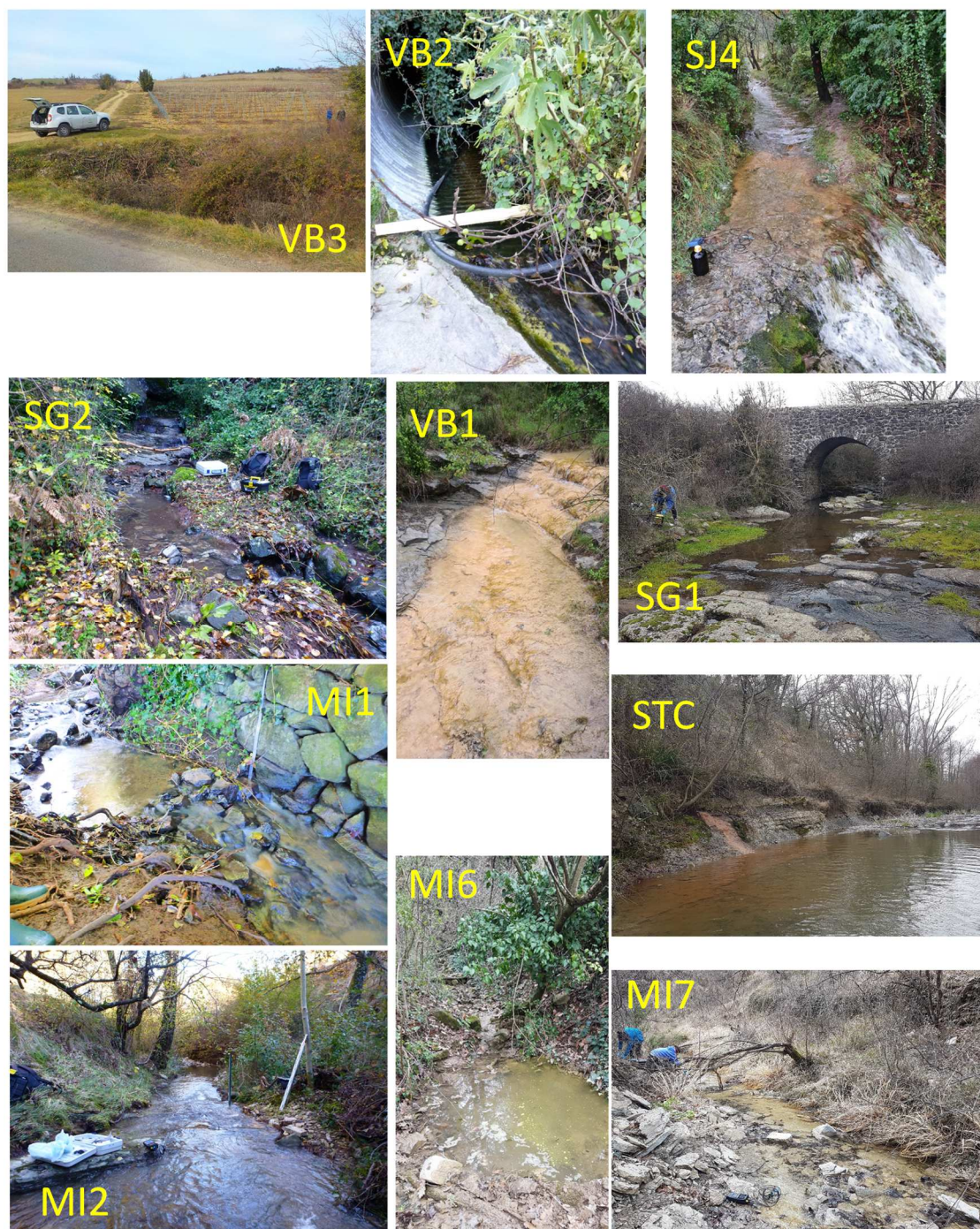


Figure 18 : Photographies des points de prélèvement sur le bassin versant de la Claduègne, correspondant à Saint Jean Le Centenier 4 (SJ4) ; Villeneuve de Berg 1, 2 et 3 (BV1, VB2, VB3) ; Saint Gineys en Coiron 1 et 2 (SG1, SG2) ; Station phytoépuration camping (STC) ; Mirabel 1 sur plateau basaltique (MI1) ; Mirabel 2, 6 et 7 (MI2, MI6, MI7) ; (stations d'épuration - STF et STV - non illustrés ici).

### III. Cartographie spatiale de la qualité de l'eau

---

#### III.1. Principe général

Comme il n'est pas possible de multiplier les points de prélèvement pour des raisons logistiques et économiques (échantillonnage et analyses en laboratoire pour un grand nombre de paramètres), nous proposons ici d'évaluer la représentativité des sites étudiés au travers de l'étude de la variabilité spatiale de qualité des eaux sur les cours d'eau de l'ensemble des deux bassins versants étudiés. Ces analyses doivent conduire à l'élaboration d'un nouveau jeu de cartes permettant de visualiser des variations de qualité des cours d'eaux ; ces données seront prises en compte pour améliorer la définition des sources. Les techniques analytiques choisies doivent pouvoir être facilement mises en œuvre, être à faible coût et donner une information, même très globale, sur la qualité et l'origine des eaux. C'est pourquoi cette approche et les données produites sont qualifiées de *low-cost*. Les techniques choisies sont :

**1) La spectrophotométrie UV-visible** qui permet d'avoir des informations sur la qualité de la matière organique dissoute (MOD). L'hypothèse est que la nature et la composition de la MOD dans le cours d'eau sont fortement influencées par son origine (e.g. apports diffus terrigènes en lien avec une occupation du sol donnée, apports anthropiques domestiques, apports par les nappes...). Ces analyses peuvent être réalisées *in situ* à l'aide de sondes (temps d'analyse sur le terrain : environ 5 min par point de mesure ; une sonde coûte entre 10 et 20 k€ HT), ou à l'aide de prélèvements et d'analyses au laboratoire (prélèvement d'environ 50 mL dans un tube en polypropylène (PP) ; une analyse au laboratoire coûte environ 5 € HT ; une quinzaine d'échantillons peuvent être analysés en une heure).

**2) L'analyse de paramètres microbiens par diagnostics ADN qPCR** qui permet d'identifier la présence de bactéries propres à certains animaux dans les échantillons d'eau. Il est ainsi possible de faire l'hypothèse qu'une eau prélevée dans un cours d'eau a ruisselé sur des sols impactés par la présence de bovins, de chevaux, de canards/poules, chiens, ou a été impactée par des rejets domestiques humains (dont des surverses de réseaux unitaires ou pompes de relevage). Ces analyses low-cost qPCR MST ont été complétées par des suivis qPCR d'agents pathogènes bactériens précédemment détectés sur le BV Yzeron (Navratil et al., 2020), mais dont les sources restent à préciser : (i) *Pseudomonas aeruginosa*, (ii) *Aeromonas caviae*, et (iii) *Nocardia cyriacigeorgica*. Ces qPCR sont dénommées globalement « qPCR patho » dans la suite du texte (ou respectivement, qPCR-Pae, qPCR-Acav et qPCR-Ncyr). Les tests qPCR Acav et Ncyr ont été développés dans la cadre de ce projet IDESOC. Le développement d'un test qPCR représente un coût d'environ 10 000€ en raison des besoins d'évaluation de la sensibilité et spécificité du crible via l'utilisation d'ADN de référence et collections microbiennes de référence. Le coût de réalisation des tests qPCR est de 7€ par échantillon et nécessite de réaliser une extraction des ADN de l'échantillon d'eau estimée à 7€ ; ce qui donne un coût de 14€ HT par diagnostic qPCR MST ou patho. L'analyse est finalisée sur une période de 3h, et est réalisée par groupe de > 25 échantillons.

**3) La mesure des paramètres physico-chimiques température, conductivité et pH.** Il est préférable de mesurer ces paramètres directement dans le milieu à l'aide de sonde. Il est toutefois possible de collecter 100 mL dans un flacon en PP afin de réaliser les analyses en laboratoire (sauf la température) s'il est difficile (ex : temps disponible) de mettre en place cette analyse à large échelle sur le terrain.

L'étude de la variabilité de ces données chimiques et microbiologiques mesurées dans les cours d'eau sur l'ensemble des deux bassins versants étudiés permet d'observer d'éventuelles anomalies ou *hot*



*spots*. Ces potentielles anomalies pourraient être attribuées à des sources non définies et non identifiées avec la méthodologie initiale mise en place (cf. Chapitre II). Cette approche de cartographie spatiale de la qualité de l'eau est donc complémentaire au travail d'enquête et de cartographie ; elle permet de vérifier certaines hypothèses sur la nature des activités et leurs impacts sur le milieu naturel.

## **III.2. Stratégie d'échantillonnage**

### **III.2.1. Campagnes de mesure**

Pour chaque bassin versant étudié (Ratier/Yzeron et Claduègne), deux campagnes de cartographie spatiale de la qualité de l'eau sont prévues lors de deux périodes hydro-climatiques distinctes :

- i) en période hivernale quand les sols sont humides et les débits dans les petits cours d'eau sont les plus importants, afin d'observer un maximum d'écoulements sur les sous-bassins versants ;
- ii) en période printanière/estivale pendant une pluie lorsque les sols sont plus secs et les débits dans les cours d'eau plus faibles, afin de pouvoir observer plus facilement les rejets anthropiques domestiques potentiels et les écoulements superficiels rapides.

Ainsi, sur le bassin du Ratier, la première campagne a été réalisée le 15 mars 2023 et correspond à une période de pluie printanière sur sols secs. La deuxième campagne a été réalisée le 27 février 2024 et correspond à une période de pluie hivernale sur sols humides.

Une seule campagne a été réalisée sur la Claduègne car les périodes de pluie durant le projet ont été rares et difficiles à anticiper. Cette campagne s'est déroulée le 29 novembre 2023 après une pluie qui a générée des écoulements sur l'ensemble du bassin versant.

### **III.2.2. Choix des points de prélèvement**

Pour chaque campagne, environ 50 points de prélèvement et de mesure ont été planifiés sur chacun des deux bassins versants étudiés (compromis entre le nombre de points idéal pour avoir une forte résolution spatiale pour la cartographie et ce qui est réalisable opérationnellement lors d'une journée de prélèvement). Différentes catégories de points de prélèvements ont été prévus afin d'étudier la variabilité de la qualité des eaux à différentes échelles :

1) Variabilité au sein de sous-bassins homogènes : trois à cinq points de prélèvements ont été réalisés le long du réseau hydrographique de sous-bassins homogènes déjà identifiés (point aval déjà prélevé et analysé comme source ; cf. Tableau 1 et Tableau 2). L'hypothèse posée est que la qualité de l'eau au sein d'un sous-bassin homogène devrait être peu variable (i.e., moins variable que la qualité de l'eau de deux bassins homogènes de types différents).

2) Exploration d'autres bassins-versants de tête de bassin : des prélèvements ont été réalisés a minima aux exutoires (et si possible un ou deux points supplémentaires en amont le long du réseau hydrographique) de sous-bassins versants homogènes mais non-suivis dans le cadre de l'identification et caractérisation des sources. L'objectif est de pouvoir comparer la qualité des eaux de ces bassins à celle des bassins dont le type de source est bien défini.

3) Exploration des mélanges en aval : des prélèvements ont été réalisés sur les cours d'eau principaux de l'amont vers l'aval du réseau hydrographique des sous-bassins versants. L'objectif est d'observer les mélanges d'eau des différents sous-bassins homogènes et aussi d'identifier de potentielles



anomalies le long des cours qui pourraient être attribuées à des sources non identifiées jusqu'à maintenant.

Cette stratégie d'échantillonnage des différentes catégories de points est illustrée sur la Figure A3 (Annexe 3) pour les bassins versants du Ratier et du Mercier.

**Au final, sur le bassin du Ratier**, 52 échantillons ont été collectés lors de la première campagne en mars 2023. Lors de la deuxième campagne, en février 2024, 3 points non collectés l'année précédente faute d'écoulement ont pu être collectés, et 2 points ont été ajoutés ; ce qui porte à 57 le nombre total d'échantillons collectés.

**En ce qui concerne le bassin de la Claduègne**, 50 points ont été échantillonnés sur l'ensemble du réseau hydrographique du bassin versant le 29 novembre 2023 (Cf. Figure A4 en Annexe 3).

### **III.2.3. Protocoles d'échantillonnage, de conditionnement des échantillons et de mesures in situ**

Pour chaque campagne et bassin versant, l'ensemble des points ont été prélevés pour l'analyse de spectres UV-visible, analyse microbienne par qPCR MST et pathogènes, et métaux dissous (excepté pour la première campagne sur le Ratier). Les prélèvements (environ 50) ont été réalisés par plusieurs équipes de préleveurs afin de limiter le temps de prélèvement à quelques heures (typiquement une matinée) et d'avoir des conditions hydro-climatiques comparables sur l'ensemble de la campagne.

Les mesures physico-chimiques (température, pH et conductivité) ont été réalisées *in situ* lors du prélèvement des eaux sur la Claduègne. Chaque équipe de préleveurs a utilisé une sonde de mesure de terrain et réalisé les mesures au même moment que le prélèvement des échantillons d'eau. Pour le Ratier, les analyses physico-chimiques ont été réalisées au laboratoire avec un pH-mètre et une sonde de conductivité de laboratoire ; pour cela, un échantillon d'eau a été prélevé sur le terrain (Cf. ci-dessous).

Pour les campagnes sur le Ratier, les échantillons pour les analyses spectrophotométriques (spectres UV-visible) et les analyses physico-chimiques ont été prélevés dans des flacons en polypropylène (PP) de 250 mL (neufs et utilisées tels quels). Ces échantillons sont conservés au frais (4°C) jusqu'à analyse dans les 48 h.

Les échantillons pour les analyses microbiennes par qPCR ont été prélevés dans des flacons en PP de 1 L (neufs et utilisés tels quels), stockés au frais le temps de la campagne de prélèvement. L'extraction de l'ADN des échantillons est réalisée dès le jour même et jusqu'à 48 h après prélèvement.

Pour la campagne sur la Claduègne, le même protocole que celui du Ratier a été mis en place avec quelques petites différences. En effet, comme évoqué précédemment, les analyses physico-chimiques ont été réalisées *in situ* durant les prélèvements des échantillons.

### III.3. Méthodologies analytiques

#### III.3.1. Spectrophotométrie UV-visible

La spectrophotométrie UV-visible repose sur l'interaction entre la lumière et la matière. Certaines molécules absorbent le rayonnement électromagnétique à des longueurs d'onde spécifiques qui dépendent de la structure des molécules. Les spectrophotomètres permettent de mesurer la capacité d'un échantillon à absorber la lumière qui le traverse (i.e. l'absorbance) en fonction de la longueur d'onde du rayonnement (typiquement entre 200 et 800 nm). Le résultat est un spectre d'absorption ou spectre UV-visible qui est la résultante des absorbances de chaque molécule (Cf. Figure A5 en Annexe 4). De ce fait, les spectres UV-visible réalisés à partir d'échantillons d'eaux de surface ou d'eaux résiduares sont difficilement interprétables directement car ces eaux contiennent de très nombreuses espèces qui vont absorber la lumière à des longueurs très variables. Parmi les composés majeurs qui contribuent au spectre UV-vis, on retrouve les nitrates, la matière organique et les matières en suspension. Depuis de nombreuses années, il est possible de quantifier les concentrations en nitrate ou carbone organique dissous (COD) à l'aide de spectres UV-vis (e.g. Langergraber et al., 2004). Il est aussi possible de caractériser globalement la nature MOD présente dans un échantillon au travers de descripteurs calculés à partir des spectres UV-vis. Les indicateurs classiquement utilisés dans la littérature sont les suivants : les rapports d'absorbance E2E3, E2E4, E3E4 et E4E6 ; les pentes spectrales sur les domaines 275-295 nm (S1) et 350-400 nm (S2) ; le rapport des deux pentes spectrales (SR) ; le SUVA qui est le rapport entre l'absorbance mesurée à 254 nm, ainsi que la concentration en COD. Ces descripteurs apportent des informations sur le poids moléculaire de la MOD, son degré d'aromaticité, son origine terrigène vs. biologique récente (Li et Hur, 2017) (Cf. Tableau A3 en Annexe 4).

Ainsi, il est proposé de réaliser l'acquisition de spectres UV-vis sur un grand nombre d'échantillons de cours d'eau des bassins versants étudiés. Les indicateurs sont calculés comme décrits dans les travaux de Boukra et al. (2023). Toutes ces données seront interprétées sur la base de leur variabilité spatiale sur chacun des deux bassins versants.

#### III.3.2. Analyse microbienne par PCR quantitatives en temps réel (qPCR)

Les activités humaines sur les bassins versants peuvent être à l'origine de contaminations chimiques mais également biologiques. Les contaminations biologiques sont principalement dues à des déversements (*spillovers* / avec phénomène de panache de dispersion) de bactéries provenant des voies intestinales des animaux (pouvant être liées aux activités d'élevage, aux rejets d'eaux usées ou encore aux pratiques d'épandage), ou du fait de la présence d'ordures ménagères ou de rejets d'activités artisanales ou industrielles (e.g., industrie fromagère, eaux de nettoyage des commerces et centres de mécanique). Un suivi de 16 marqueurs génétiques par des diagnostics qPCR a été réalisé pour (i) des agents pathogènes (qPCR-Pae, -Acav, -Ncy), (ii) des déterminants de la virulence et de l'antibio-résistance (qPCR-int1, -int2, -int3) et (iii) des bactéries associées avec des sources d'émission fécale connues (qPCR-MST, Microbe Source Tracking ; hôtes humain, ruminants, vache, porc, cheval, chien, rongeur, poulet/canard, bactéries résidentes des réseaux d'eaux usées) ou indéfinies (qPCR-Bacteroidales totales – corrélées à un suivi des Flavobactéries). Ces techniques qPCR reposent sur l'échantillonnage d'eau de ruissellement ou de surface, d'une filtration en laboratoire à 0,22 µm permettant d'extraire la totalité des micro-organismes ayant une taille >0,22 µm, et d'obtenir leur ADN par extraction mécanique et chimique via le kit Fast DNA soil kit (MP Bio) et un *bead beater*. Les quantités de bactéries totales (ADNr 16S) sur le filtre sont déterminées par qPCR et servent à

normaliser les quantités de marqueurs ADN spécifiques et d'évaluer la quantité de bactéries par mL ; une bactérie ayant peu de copies (3-5 copies par génome) du gène cible (*rrs* = 16S rRNA), la valeur qPCR *rrs*/ 16S rRNA est considérée comme la meilleure méthode pour démontrer les cellules en équivalent « génome ». Toutefois, en laboratoire, uniquement 1% des bactéries dénombrées par qPCR peuvent être dénombrées sur milieux gélosés (ce qui est également une règle générale en microbiologie). Les formes sur milieux gélosés sont appelées des bactéries cultivables. Un suivi qPCR permet d'inférer les dangers sanitaires et l'état d'hygiène des bassins versants et d'étudier leur association avec certaines sources d'émission fécale (Cf. Figure A6 en Annexe 5).

### III.4. Résultats des cartographies spatiales de la qualité de l'eau

#### III.4.1. Bassin versant du Ratier - physico-chimie et UV-vis

Dans un premier temps, une comparaison des données physico-chimiques et UV-vis est réalisée entre les campagnes 2023 (temps pluvieux sur sol sec) et 2024 (temps pluvieux sur sol humide). Les valeurs de conductivité mesurées en 2023 sont comprises entre 33 et 588  $\mu\text{S}/\text{cm}$ . Des conductivités similaires sont mesurées en 2024 avec des valeurs entre 59 et 604  $\mu\text{S}/\text{cm}$  (Figure 19). De même, aucune différence de pH n'est observée entre les campagnes 2023 et 2024. Les valeurs de pH mesurées sont plutôt neutres à légèrement acides et varient de 5.4 à 7.8 en 2023 et de 5.1 à 7.7 en 2024.

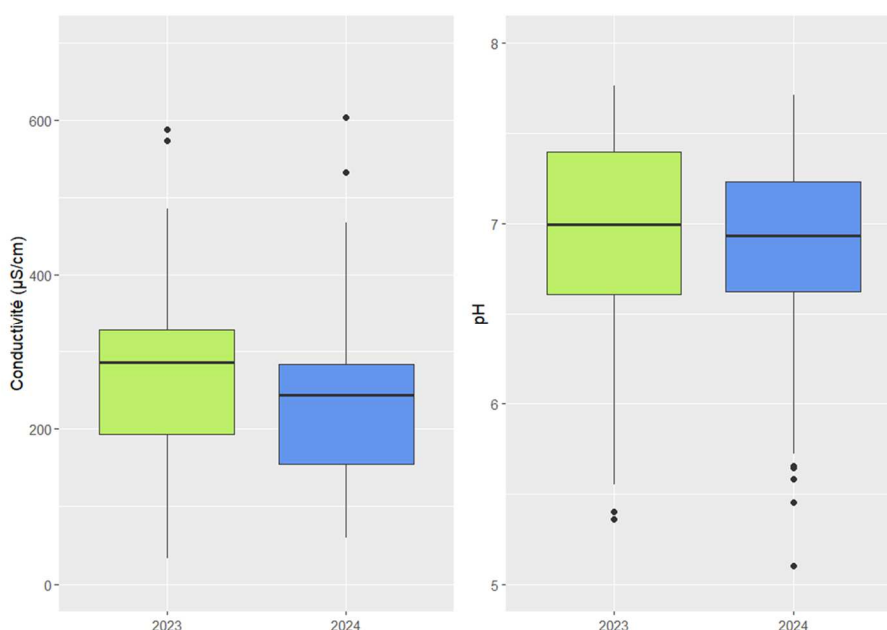


Figure 19 : Répartition des valeurs de conductivité et pH mesurées lors des campagnes de cartographie spatiale 2023 (en vert ;  $n=52$ ) et 2024 (en bleu ;  $n=57$ ) sur le bassin du Ratier, sous forme de boîtes à moustache.

Contrairement aux paramètres physico-chimiques, les indicateurs UV-vis permettant de caractériser la MOD sont significativement différents entre les campagnes 2023 et 2024 (Figure 20). Globalement, les valeurs des indicateurs UV-vis sont plus faibles en 2023 qu'en 2024, excepté pour le rapport des pentes spectrales  $S_R$  qui est plus élevé en 2024. Ces résultats suggèrent que la MOD des échantillons prélevés en 2023 possède un poids moléculaire plus élevé avec une teneur en carbone aromatique

plus élevée et un caractère plus humique que la MOD des échantillons de la campagne 2024. Ceci pourrait s'expliquer par des écoulements plus profonds (mais toujours en subsurface) en 2023, dû à des sols moins saturés en eau, et qui entraînent vers les cours d'eau une MOD plus dégradée que la MOD présente à la surface du sol. Seul le rapport des pentes SR s'oppose aux autres indicateurs car il suggère une MOD de plus grand poids moléculaire en 2024. Ces résultats montrent l'importance d'interpréter conjointement les résultats de l'ensemble des indicateurs UV-vis pour pouvoir décrire de façon intégrée les caractéristiques globales de la MOD.

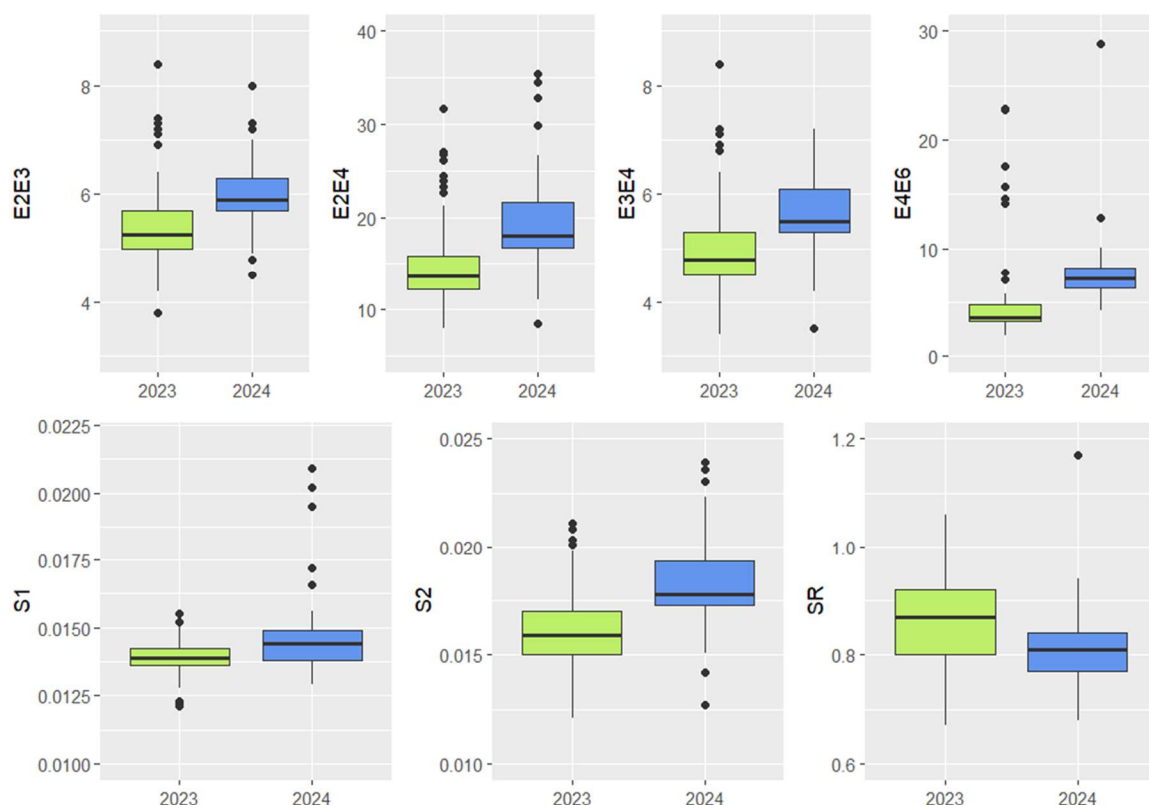


Figure 20 : Répartition des valeurs des indicateurs UV-visible (rapports d'absorbance E2E3, E2E4, E3E4, E4E6 ; pentes spectrales S1 et S2 ; et rapport des pentes spectrales SR) lors des campagnes de cartographie spatiale 2023 (en vert) et 2024 (en bleu) sur le bassin du Ratier, sous forme de boîte à moustache.

Une analyse en composante principale (ACP) de l'ensemble des indicateurs UV-vis étudiés montre que les caractéristiques de la MOD des échantillons prélevés en 2023 et 2024 sont relativement proches (Figure 21). Mais il est tout de même possible de différencier les deux campagnes sur la première composante principale qui explique une grande partie de la variabilité des données (75.5 %). En effet, plus de 75% des échantillons de la campagne de 2023 se positionnent sur la partie droite de l'ACP (score positif suivant l'axe 1), alors qu'on y retrouve seulement 25% des échantillons de la campagne 2024. Pour la suite de l'étude, les données des deux campagnes ont été analysés indépendamment.

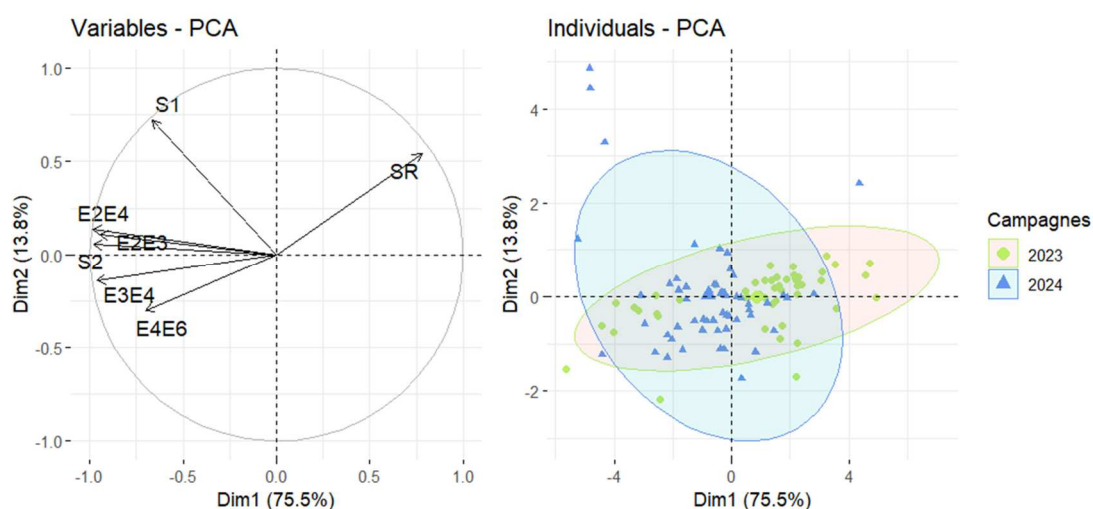


Figure 21 : Analyse en composante principale (plan factoriel 1-2) réalisée sur les indicateurs UV-vis pour les échantillons d'eau prélevés lors des campagnes low-cost 2023 et 2024 sur le bassin du Ratier. À gauche : graphiques des variables ; à droite : graphique des individus. Les deux premières composantes principales représentent 75.5% et 13.8% de la variance totale, respectivement.

Comme l'ensemble des points des prélèvements des campagnes de 2023 et 2024 ont été géoréférencés, il est possible d'éditer des cartes de valeurs pour les paramètres physico-chimiques (pH et conductivité) ou les indicateurs UV-visibles. Des classes de valeurs sont construites en se basant sur la méthode dite de « ruptures naturelles » avec le logiciel de cartographie QGIS et pour chaque campagne indépendamment (mars 2023 et février 2024). L'exemple de la conductivité sur le Ratier, avec 5 classes de valeurs, est illustré pour la campagne de mars 2023 sur la Figure 22. Sur cette carte, un gradient global de conductivité d'amont en aval est observé avec les plus petites valeurs dans les zones forestières à l'ouest du bassin et les plus fortes valeurs mesurées sur le linéaire du Ratier et du Mercier. De faibles conductivité sont aussi observées sur les petits sous-bassins versants homogènes définis précédemment (par exemple les sous-bassins REV et VRN situés de part et d'autre du Mercier au centre du bassin). Des anomalies sont observées comme la forte conductivité (point rouge) mesurée en tête de bassin dans la partie sud-ouest du bassin ou les 2 conductivité élevées (points rouges) mesurées au niveau du bassin versant homogène GAR (centre équestre) au centre du bassin au niveau de Pollionnay.

Globalement, des gradients de conductivité et de pH sont observés pour les deux campagnes de 2023 et 2024 entre l'amont et l'aval du bassin (augmentation de la conductivité et du pH de l'amont vers l'aval) avec de faibles valeurs pour les petits sous-bassins versants. Certaines anomalies avec de fortes valeurs (typiquement le sous-bassin GAR associé au centre équestre) sont observées lors des deux campagnes (cartes en Annexe 6).

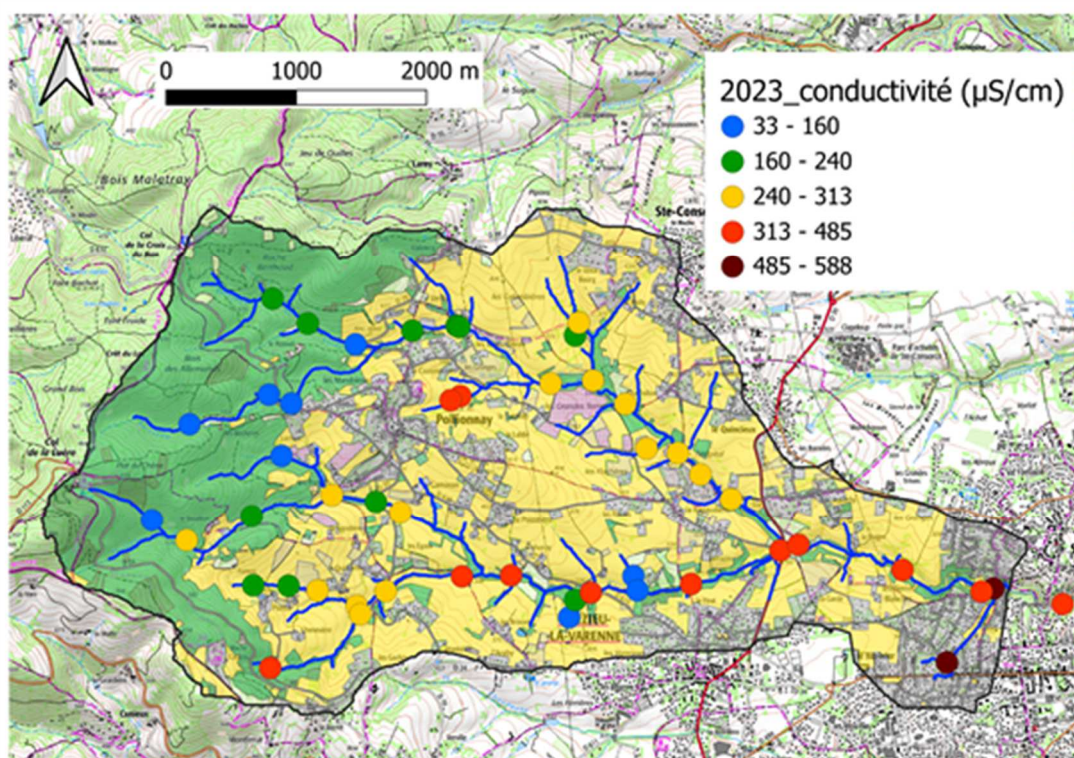


Figure 22 : Cartographie spatiale des mesures de conductivité pour la campagne de mars 2023 sur le bassin du Ratier.

Comme évoqué ci-dessus, il est préférable d'interpréter l'ensemble des indicateurs UV-vis (de façon intégrée) afin de mieux distinguer les différences de qualité de MOD. C'est pourquoi une classification des échantillons a été réalisée en prenant en compte les 7 indicateurs UV-visible. Pour chaque campagne, 5 classes de qualité de MOD ont été établies. La Figure 23 montre les résultats de cette classification de MOD et la répartition spatiale des classes pour la campagne 2023.

Ainsi, la première composante principale explique une grande part de la variabilité des indicateurs UV-visible (86.2 %) mesurés lors de la campagne de 2023 (Figure 23, en haut). Les échantillons situés à gauche de la première dimension (classes 1 et 2) sont caractérisés par de faibles valeurs de E2/E3, E2/E4E3/E4 et S1 comparé aux échantillons se situant à droite de l'axe (classes 4 et 5). Ceci suggère que la MOD des classes 1 et 2 comporte des molécules organiques de plus grandes tailles, contenant plus de carbone aromatique, avec un plus fort degré d'humification et une origine terrigène plus marquée que la MOD des classes 4 et 5. La MOD de classe 3 possède des caractéristiques intermédiaires.

La MOD des classes 1 et 2 s'apparente à de la MOD de type humique que l'on pourrait retrouver dans des sols organiques à des horizons profonds, où la MOD est fortement dégradée et humifiée. En revanche, la MOD de la classe 4 et 5 pourrait s'apparenter à de la MOD plus fraîche avec une origine autochtone et/ou biologique plus marquée.



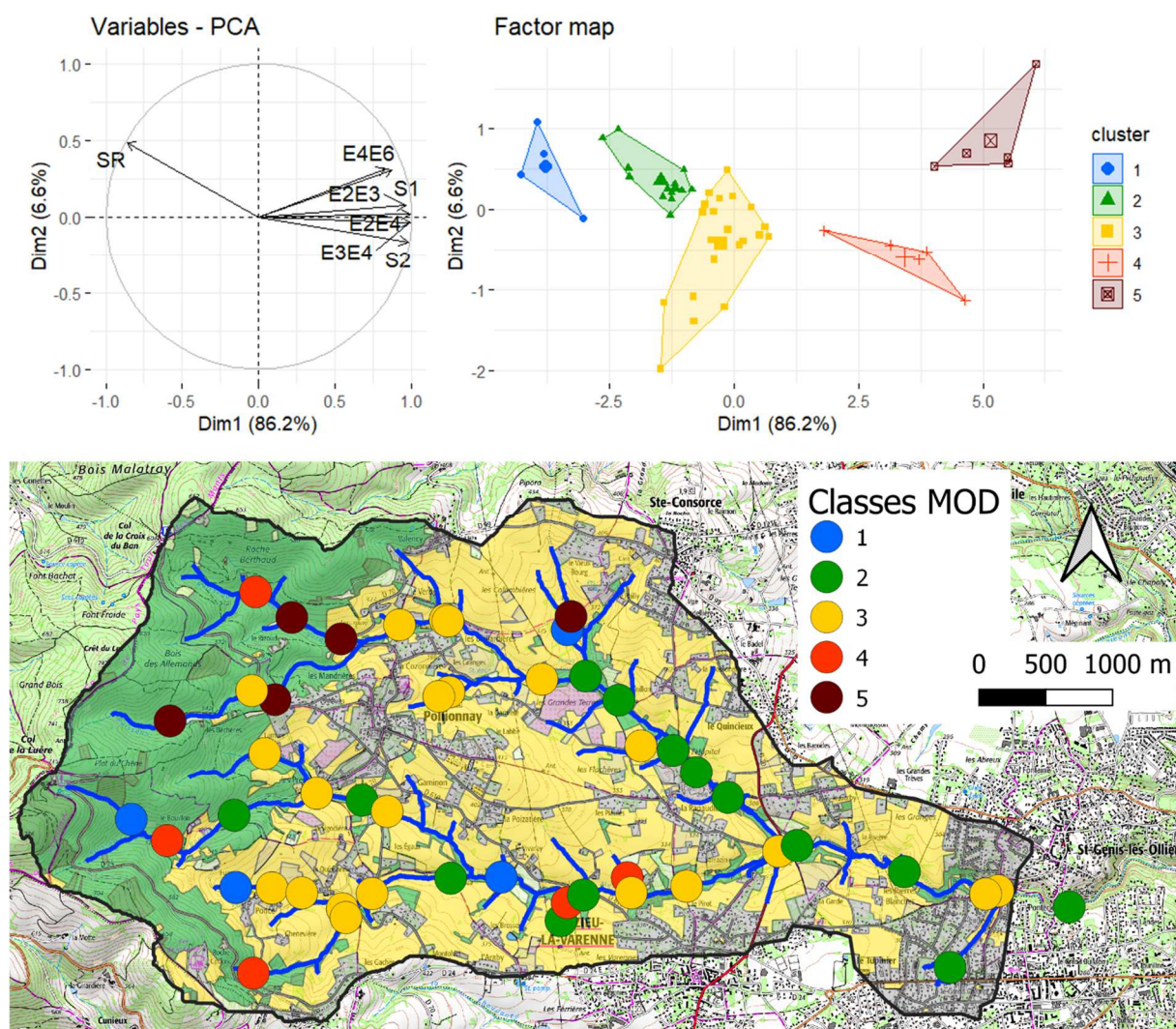


Figure 23 : Classification des échantillons d'eau en fonction des indicateurs UV-visible (en haut à gauche : carte des variables ; en haut à droite : représentations des clusters dans le plan factoriel 1-2 de l'ACP) ; et cartographie des classes de matière organique dissoute (MOD) pour la campagne low-cost de mars 2023 sur le bassin du Ratier.

Comme illustré sur la Figure 23, la MOD des classes 4 et 5 se retrouve principalement dans les zones forestières à l'ouest du bassin versant et dans les têtes de bassin. La MOD de classe 3 se retrouve principalement sur la partie centrale du bassin, c'est-à-dire à l'est des zones forestières. La MOD de classe 2 se retrouve principalement le long du Ratier. Enfin, 4 échantillons sont caractérisés par la MOD de classe 1 ; ces échantillons se retrouvent à la fois dans la forêt, en tête de bassin agricole et sur le Mercier. Ainsi, la répartition des classes de MOD semble suivre une logique globale même si des particularités sont observées.

Concernant la variabilité de qualité de la MOD au sein de sous-bassins homogènes, il est difficile de conclure à ce stade. En effet, pour certains sous-bassins versants homogènes, comme les deux sous-bassins forestiers situés au nord-ouest, la majorité de la MOD est classée dans les groupes 4 et 5 montrant une homogénéité de la MOD. Mais la qualité de MOD dans d'autres sous-bassins homogènes change de classe, comme par exemple le bassin forestier du Bouillon à l'ouest du bassin (3 classes de



MOD sur 3 points de prélèvement), ou les sous-bassins du Revay (REV) et de Varennes (VAR) (cf. Figure 15) sur lesquels les deux points prélevés n'ont pas la même qualité de MOD.

Une analyse plus poussée des données est en cours. En premier lieu, il sera important d'identifier les stations ayant des caractéristiques atypiques voire aberrantes et qui peuvent modifier ou fausser la classification de la MOD réalisée. Il conviendra d'étudier la répartition des classes de qualité de MOD avec différentes combinaisons d'indicateurs UV-visible. De plus, les indicateurs UV-vis peuvent être combinés avec les données de pH et de conductivité, ainsi qu'avec les données de paramètres microbiens obtenus par qPCR, afin de redéfinir des groupes de stations (ou point de prélèvement) ayant des caractéristiques similaires. In fine, ces groupes de stations devront être confrontés aux occupations du sol. Les occupations du sol relatives à chaque station peuvent être définies de plusieurs manières : i) l'aire du sous-bassin drainé en amont de la station, ii) l'aire définie par un corridor autour des cours d'eau en amont de la station (la largeur du corridor peut être fixée à 5 m ou 20 m pour prendre en compte l'influence des sols adjacents), ou iii) l'aire définie par un disque en amont de la station de diamètre à définir (par exemple 10 ou 50 m). Un exemple d'extraction avec un corridor (zone tampon, de 100 m) est donné dans la section I.3.2 pour la Claduègne (Figure 13). Les enquêtes réalisées sur les bassins du Ratier et de la Claduègne permettront d'apporter des informations spatialisées supplémentaires aux occupations du sol comme l'utilisation de fertilisant (fumier, engrais...).

#### **III.4.2. Bassin versant du Ratier - diversité des contaminations fécales**

Les résultats sont présentés sous forme de cartes afin de visualiser l'ensemble des données. Le logiciel QGIS a été utilisé pour représenter les données. Les points de prélèvement sont représentés par des cercles dont la couleur est dépendante du marqueur testé et le diamètre proportionnel à la quantité du marqueur retrouvé.

Les résultats des rendements d'extraction d'ADN sont détaillés dans l'Annexe 5.

##### **Dénombrements des bactéries totales et *Bacteroidales* totales**

Les résultats de la quantification des bactéries totales et des bactéries de l'ordre des *Bacteroidales* (Log du nombre de copies/ 100 mL d'échantillon) par qPCR pour la campagne spatiale de mars 2023 sont présentés sur la Figure 24.

La quantité du gène marqueur de bactéries totales retrouvées sur le bassin du Ratier varie entre  $10^7$  et  $10^9$  copies du gène de l'ARNr 16S pour 100 mL d'eau de surface par point de prélèvement. Les qPCR *Bacteroidales* totales ont montré une plus forte variabilité. Ce marqueur représente de 0 à 1,7% de la communauté bactérienne totale. Il a déjà été montré dans le cas du réseau unitaire du bassin de l'Yzeron (commune de Grézieu-la-Varenne), que les *Bacteroidales* totales pouvaient représenter 1,5 à 3% de la communauté bactérienne (Marti et al., 2017). Or, les points de prélèvement entourés en jaune sur la carte (Figure 24) présentent un niveau de contamination fécale similaire à celui du réseau unitaire (Navratil et al., 2020 ; Petit et al., 2013), suggérant un cours d'eau peu hygiénique et non conforme pour des activités récréatives. Au total, 36% des points ont montré une occurrence de *Bacteroidales* totales ; cette contamination était plus fréquente sur le sous-bassin du Mercier.

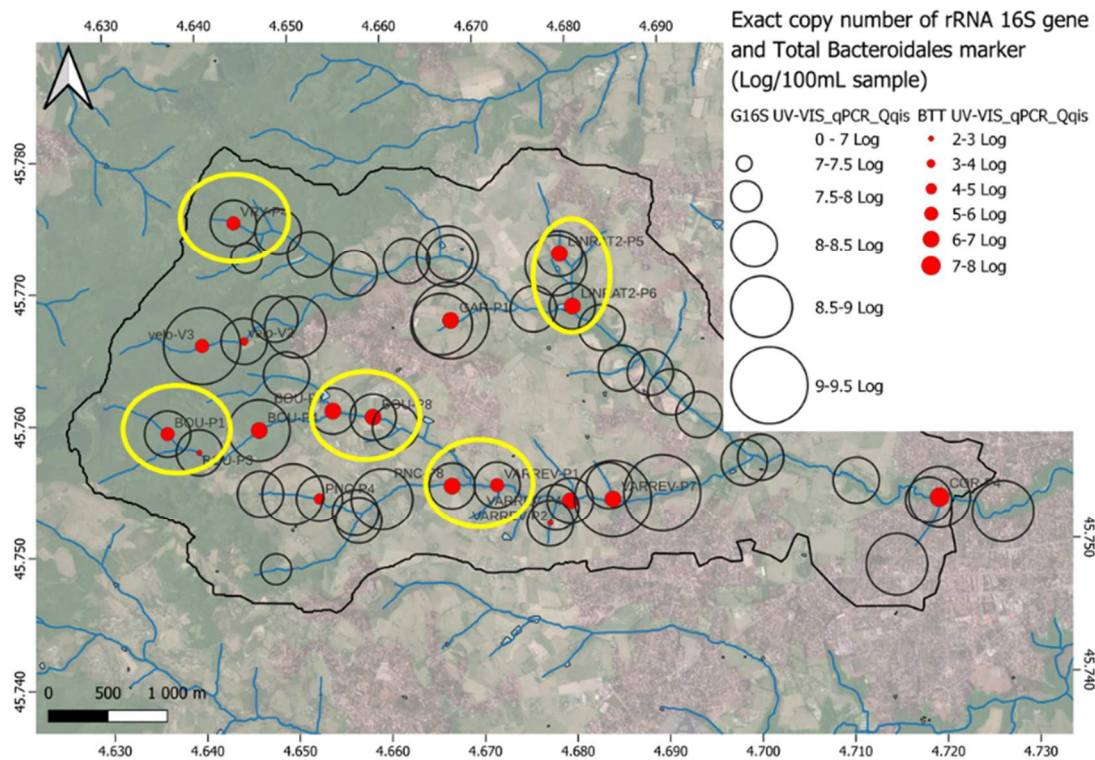


Figure 24 : Quantification du nombre de copies retrouvées du gène de l'ARNr 16S et du marqueur *Bacteroidales* totales dans les eaux de surface du bassin du Ratier en fonction des points de prélèvement de la campagne spatiale de mars 2023. Les données du marqueur du gène de l'ARNr 16S sont représentées par un cercle noir et celles des *Bacteroidales* totales par un cercle plein rouge. Le diamètre est proportionnel au nombre de copies retrouvées. Les points entourés en jaune indiquent une proportion de *Bacteroidales* totales (normalisée par les données de qPCR 16S rRNA pour comparer les taux au sein d'un même nombre de bactéries totales) similaire à celle observée pour un réseau unitaire.

Pour compléter cette étude, la recherche des marqueurs de contamination d'origine fécale spécifiques d'hôtes appartenant à ce groupe a été entreprise. Quelques incohérences ont été notées entre les qPCR *Bacteroidales* regroupant les espèces/ADN d'espèces de *Bacteroides* et *Prevotella* suivis dans le cadre des cribles MST d'émissions d'excréments, et les résultats qPCR *Bacteroides* pour le réseau d'eaux usées. Cette distorsion a été observée deux fois sur 53 extraits d'ADN analysés, donnant un taux d'association du marqueur *Bacteroidales* totales de 96% avec la contamination venant de réseaux d'eaux usées (Figure 25).

En revanche, de fortes divergences ont été notées entre les qPCR *Bacteroidales* et les résultats qPCR *Bacteroides* du tractus intestinal humain via le marqueur HF183, et cela pour les deux campagnes de 2023 et 2024. Un taux de sensibilité plus faible de la qPCR *Bacteroidales* pour inférer la contamination fécale humaine a été observé en 2023 avec 43% des échantillons trouvés contaminés par HF183 alors que 36% des échantillons était positifs en *Bacteroidales* totales (Figure 25). Cette prévalence a été confirmée en 2024 avec 39% des échantillons trouvés contaminés par HF183 alors que la PCR *Bacteroidales* totales ne trouve que 9% des échantillons contaminés par HF183 (Figure 26). Ces tests mènent à la conclusion que la PCR HF183 est plus sensible que la PCR *Bacteroidales* totales pour inférer des contaminations fécales humaines. Toutefois, une contamination animale non-humaine a toujours été associée à un résultat positif de qPCR *Bacteroidales* total, à l'exception du marqueur *Prevotella*

« canard/poulet » (cf. ci-dessous) qui présente une absence d'association avec le marqueur *Bacteroidales* totales dans 2% des cas.

### Suivi des marqueurs de la contamination d'origine fécale spécifique d'hôtes (MST)

Les résultats de la quantification des *Bacteroidales* spécifiques de l'humain et du réseau d'eaux usées par qPCR pour la campagne spatiale de mars 2023 sont présentés sur la Figure 25, et sur la Figure 26 pour 2024. Les résultats sont exprimés en prévalence sur ces figures<sup>3</sup>.

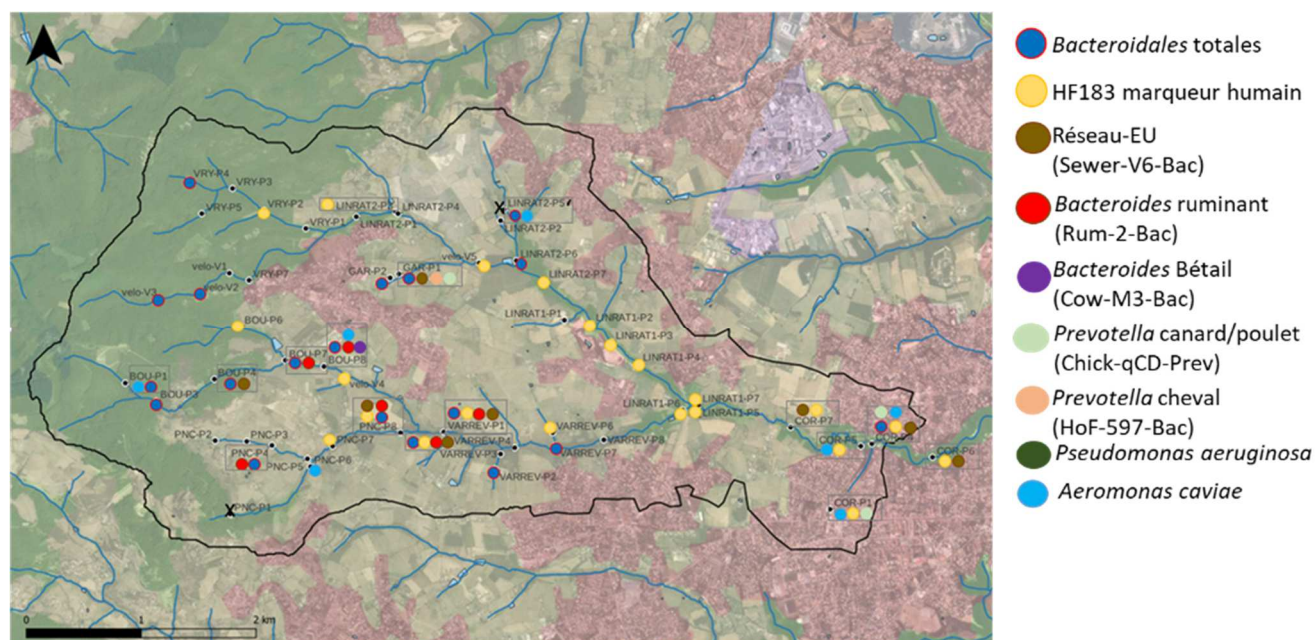


Figure 25 : Prévalence des marqueurs qPCR MST et patho sur le bassin-versant du Mercier - Ratier en mars 2023. Les points qui étaient positifs au marqueur *Bacteroidales* totales sont indiqués en bleu/rouge.

Le marqueur réseau eaux usées (réseau-EU) et humains H183 a été principalement retrouvé au niveau du sous-bassin du Mercier pour la campagne 2023. En revanche, le marqueur de la contamination fécale humaine H183 a été détecté sur l'ensemble du bassin versant pour les deux campagnes (Figures 25 et 26). Pour le Ratier, en 2023, les taux de *Bacteroidales* totales ont été associés une seule fois avec les détections des marqueurs humain HF183 et du réseau-EU, sur un point à l'aval du Ratier (COR-P4) dans le rejet de la source COR vers le cours d'eau. Le marqueur réseau-EU a été également retrouvé sur deux autres points dans le cours d'eau du Ratier à l'aval du bassin versant (COR-P7 et COR-P6), mais n'ayant pas permis d'obtenir des qPCR positives pour les *Bacteroidales* totales. La qPCR réseau-EU cible l'ADN d'un complexe *Bacteroides graminosolvens*-like et cette cible serait donc amplifiée avec une moindre « sensibilité » avec la qPCR *Bacteroidales* à partir d'extraits d'ADN de cours d'eau. Cela conforte l'idée d'une origine multiple des *Bacteroidales* totales avec des formes environnementales récurrentes pouvant être en quantité élevée et pouvant impacter la sensibilité des détections MST des ADN des espèces spécifiques à l'Homme et aux réseaux d'eaux usées. En revanche, pour le Mercier, les taux de *Bacteroidales* totales étaient souvent associés aux contaminations de réseaux unitaires.

Pour mieux préciser les autres sources d'émission de contamination fécale impactant le cours d'eau, des marqueurs spécifiques d'animaux de rente ont été testés. Ces résultats sont présentés sur les

<sup>3</sup> Les données d'abondance sont déposées pour l'instant sur un dossier partagé du projet (NextCloud).



Figures 25 et 26. Les occurrences des marqueurs « ruminant », « cheval », « canard/poulet », et « bovin » y sont indiquées<sup>4</sup>. Ces figures illustrent bien l'état sanitaire général du BV étudié, et permettent d'identifier les « hotspots » de contaminations microbiennes associées à un risque sanitaire.

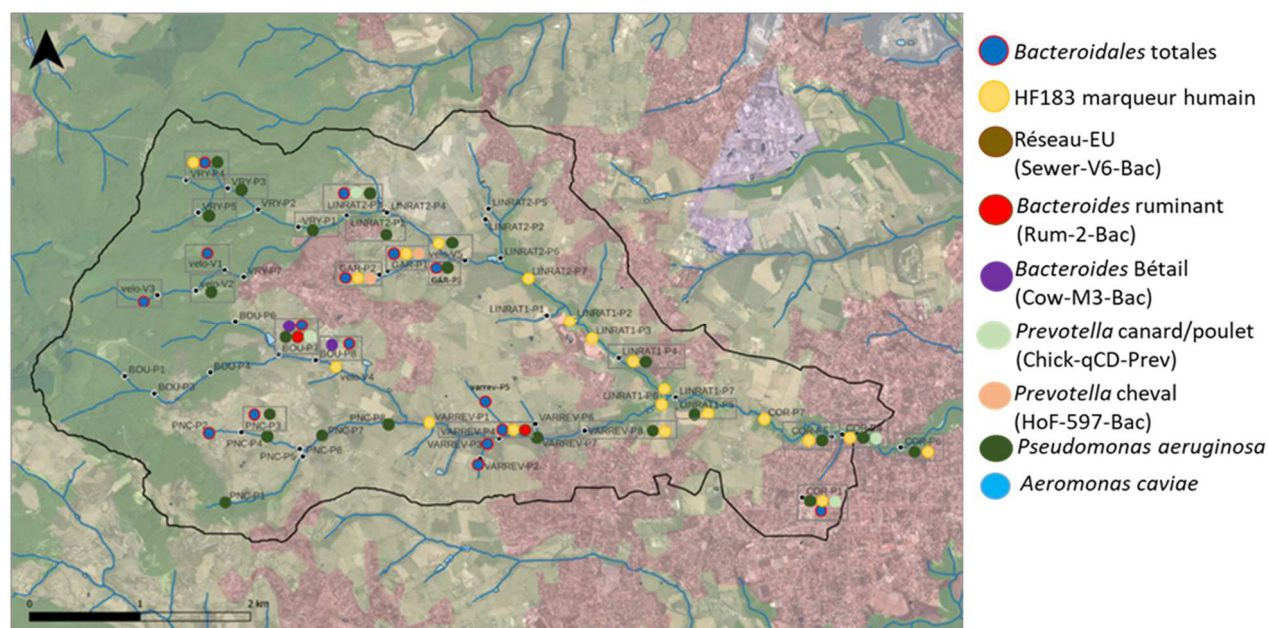


Figure 26 : Prévalence des marqueurs qPCR MST et patho sur le bassin-versant du Mercier - Ratier en février 2024. Les points qui étaient positifs au marqueur *Bacteroidales* totales sont indiqués en bleu/rouge.

En mars 2023, le marqueur cheval a été retrouvé une seule fois, en amont du Ratier sur le point de prélèvement du sous-bassin GAR (prairie avec chevaux) situé au centre de Pollionnay (GAR-P1). Ceci a été confirmé en février 2024 pour le point GAR-P1 et un autre point de prélèvement situé plus à l'amont sur le même sous-bassin (GAR-P2). Le marqueur ruminant a été retrouvé sur 6 points du Mercier en 2023, dont trois cumulent une contamination liée aux ruminants et au réseau unitaire. Ce marqueur ruminant a aussi été retrouvé en 2024 sur deux points du Mercier (Figure 26). La présence de *Bacteroidales* totales sur les autres sous-bassins n'est pas toujours expliquée par les marqueurs MST matières fécales d'origine animale utilisés ; d'autres sources, comme les oiseaux, pourraient expliquer ces résultats, mais également le fait que certains groupes comme les flavobactéries sont retrouvées en forte quantité (38% des bactéries) à la source des bassins versants, dont des eaux d'écoulement en provenance de zones forestières (Marti et al., 2017). En 2023, le marqueur canard/poulet a été retrouvé dans les eaux du point source GAR (même site que la contamination au marqueur cheval en 2023, GAR-P1), ainsi qu'à l'aval du bassin versant dans la source COR (COR-P1) et au niveau de son rejet dans le cours d'eau (COR-P4). La contamination de ces deux points reliés à la source COR a été confirmée en 2024 ; le marqueur canard/poulet a également été retrouvé dans deux autres points dans les eaux vers l'amont du Ratier (LINRAT2) et du Mercier (BOU-P7) (Figure 26). Le marqueur porc a aussi été testé mais les résultats étaient inférieurs aux limites de détection pour les deux campagnes.

<sup>4</sup> Les résultats sont exprimés en Log du nombre de copies/ 100 mL d'échantillon dans les tableaux de données déposés pour l'instant sur un site interne du projet.

En conclusion, les résultats qPCR indiquent une forte contamination du sous-bassin du Mercier en 2023 par des contaminations fécales d'origine humaine et par les élevages bovins des secteurs agricoles. Les contaminations par les eaux usées observées sur ce sous-bassin proviennent probablement des assainissements non collectifs (ANC). Le Ratier semble moins impacté par les contaminations fécales animales. Toutefois, pour le marqueur HF183, les données 2023 et 2024 ont montré un impact des contaminations humaines sur l'ensemble du bassin versant du Ratier-Mercier, avec des occurrences plus élevées au niveau du Ratier en aval de la commune de Pollionnay (2023-2024), et sur le Mercier au sud de Pollionnay (2023).

#### **qPCR pathogènes - *P. aeruginosa*, *A. caviae*, et *Nocardia cyriacigeorgica***

Les bactéries pathogènes *Pseudomonas aeruginosa*, *Aeromonas caviae*, et *Nocardia cyriacigeorgica* ont été détectées par qPCR patho dans les eaux de ruissellement et les cours d'eau Chaudanne, Mercier, Ratier et confluence Mercier/Ratier lors d'analyses précédentes (2009-2022, e. g. Navratil et al., 2020). Ces travaux ont permis, entre autre, d'observer des taux élevés d'*A. caviae* et *P. aeruginosa* sur le bassin versant du Mercier-Ratier. Peu d'articles documentent l'écologie de ces organismes malgré la préoccupation sanitaire associée à leur détection en milieux aquatiques.

Cependant, *P. aeruginosa* (espèce pathogène multi-résistante aux antibiotiques) et *N. cyriacigeorgica* n'ont pas été retrouvées sur le bassin versant au cours de la campagne de mars 2023. Les qPCR de *P. aeruginosa* étaient toutefois fortement positives en février 2024 (Figure 26), avec une forte occurrence en tête de bassin-versant. La différence entre les campagnes 2023 et 2024 est probablement liée aux conditions prévalant en 2023 (température élevée, peu de pluie sur le mois précédent).

En 2023, *A. caviae* a été retrouvée dans 7 échantillons à une concentration de  $4,15.10^2$  à  $1,44.10^4$  copies par 100 mL (Figure 25). Les résultats qPCR Acav sont en attente de réalisation pour les échantillons 2024 (idem pour le marqueur réseau-EU). Trois échantillons positifs en *A. caviae* ont été prélevés sur des points vers l'amont du sous-bassin du Mercier, un vers l'amont du Ratier, et trois à l'aval du Ratier, dont deux points liés à la source COR (COR-P1 et COR-P4) et un point à l'exutoire du bassin versant (COR-P5) (Figure 25). *Aeromonas caviae* peut causer des infections, notamment gastro-intestinales, chez les individus vulnérables (personnes immunodéprimées, enfants, etc.). Sa détection dans les cours d'eau peut être utilisée comme indicateur du risque sanitaire potentiel pour les populations qui utilisent cette eau pour des activités comme la baignade, la pêche ou l'irrigation. Cette espèce est souvent résistante à certains traitements classiques de désinfection, comme le chlore, ce qui en fait un bon indicateur de la présence de polluants résiduels dans l'eau après traitement.



## IV. Méthodologie de traçage des sources aux exutoires des bassins versants

---

### IV.1. Synthèse des prélèvements et analyses réalisés

#### IV.1.1. Points sources

Les échantillons de sources diffuses ont été prélevés manuellement dans les cours d'eau ou les écoulements de surface en aval de sous-bassins versant homogènes définis précédemment (Cf. Chapitre II). Les échantillons de sources ponctuelles (i.e. rejets de station d'épuration et déversoirs d'orage) ont été prélevés manuellement dans les rejets de station de traitement des eaux usées (STEU) ou les réseaux d'assainissement unitaire. Les eaux en aval de chaque sous-bassin versant homogène ont été prélevées manuellement. Les échantillons de sources sont collectés dans trois types de flacons d'échantillonnage selon les familles d'analyses qui sont réalisées au laboratoire. Tous les échantillons prélevés sur site sont stockés dans des glacières à 4°C jusqu'à leur retour au laboratoire où ils sont filtrés et conditionnés dans les 24 h. Plus de précisions sur l'échantillonnage de ces échantillons de mélange sont donnés dans le livrable WP2-2 du projet ANR CHYPSTER (Masson et al., 2024).

Afin de prendre en compte la variabilité saisonnière de l'empreinte biogéochimique des sources identifiées, des conditions hydro-météorologiques particulières ont été ciblées pour les campagnes de prélèvement des sources.

**Sur le bassin du Ratier**, la variabilité saisonnière a été prise en compte en prélevant les échantillons de source dans les conditions dépendant du débit de la rivière (Q) et du cumul de précipitation 5 jours avant la pluie (AR5) :

- Basses eaux ( $Q < 20$  L/s) par temps sec ( $AR5 < 5$  mm) ;
- Basses eaux ( $Q < 20$  L/s) par temps humide ( $AR5 > 5$  mm) ;
- Hautes eaux ( $Q > 20$  L/s) par temps sec ( $AR5 < 5$  mm) ;
- Hautes eaux ( $Q > 20$  L/s) par temps humide ( $AR5 > 5$  mm).

Finalement, 4 à 5 échantillons de chaque source initialement sélectionnée ont été collectés entre février 2022 et mars 2023 sur le bassin du Ratier et du Mercier (Cf. Annexe 7).

**Sur le bassin de la Claduègne**, les écoulements sur les bassins versant homogènes sont plus difficilement observables que sur le bassin du Ratier. Il est aussi plus difficile d'intervenir sur le terrain du fait de l'éloignement du bassin versant par rapport au laboratoire. Les échantillon sources ont été prélevés suite à des évènements de pluie dans des périodes où les équipes étaient disponibles pour échantillonner sur le terrain. Finalement, 4 à 5 échantillons de chaque source initialement sélectionnée ont été collectés entre mars 2022 et février 2024 sur le bassin de la Claduègne (Cf. Annexe 7).

#### IV.1.2. Echantillons de mélange prélevés aux exutoires des bassins versants

Les échantillons de mélanges sont récupérés, lors d'évènements pluvieux, aux exutoires des sous-bassins du Ratier et du Mercier (pour le bassin de l'Yzeron) et des sous-bassins du Gazel et de la Claduègne (pour le bassin de la Claduègne). Ces échantillons correspondent au mélange des différentes sources définies précédemment. Une série d'échantillons est prélevée à intervalle de temps régulier (entre 15 et 45 min selon les évènements pluvieux) par préleveur automatique durant

des évènements pluvieux. Une fois les échantillons prélevés, les flacons sont récupérés et stockés à 4°C jusqu'à leur retour au laboratoire. Les flacons des préleveurs sont alors regroupés deux par deux pour atteindre le volume nécessaire aux analyses. Ces échantillons composites sont ensuite filtrés puis conditionnés au laboratoire en suivant le protocole appliqué pour les échantillons de sources. Plus de précisions sur l'échantillonnage de ces échantillons de mélange sont donnés dans le livrable WP2-2 du projet ANR CHYPSTER (Masson et al., 2024).

**Pour les bassins versants du Ratier et du Mercier**, 6 évènements pluvieux ont été prélevés (Cf. Annexe 7). D'après leurs caractéristiques hydrométéorologiques, ces évènements correspondent à :

- des évènements d'orages d'été marqués par des conditions sèches (juin et septembre 2022) ;
- des petits évènements hivernaux présentant des valeurs faibles pour tous les indicateurs hydrométéorologiques (mars 2019 et mars 2023) ;
- des évènements majeurs marqués par des cumuls de pluie importants (mai 2021 et octobre 2021).

**Pour le bassin versant de la Claduègne**, 7 évènements pluvieux ont été prélevés (Cf. Annexe 7). Cinq évènements ont été prélevés en hautes eaux et deux en moyennes eaux (faible débit de crue). Certains évènements importants n'ont pas pu être prélevés car les préleveurs ISCO étaient déjà remplis par une petite crue précédente. D'autres évènements ont pu être prélevés mais pas analysés car une campagne source avait été organisée juste au même moment. L'ISCO de la station Gazel étant commandée par le capteur de turbidité, celui-ci s'est déclenché rarement lors des deux années de suivi (problème de nettoyage) et seule une seule crue a pu être prélevée au Gazel correctement.

### IV.1.3. Paramètres analysés

Les paramètres mesurés dans les échantillons de source et les échantillons de mélange aux exutoires des bassins versants sont les suivants : la concentration des ions majeurs, les concentrations en métaux, les indicateurs UV-visibles caractéristiques de la nature de la matière organique dissoute (MOD), et les indicateurs microbiens (Tableau 3).

Tableau 3 : Liste des paramètres mesurés dans les échantillons de source et de mélange sur les bassins versants du Ratier et de la Claduègne.

type de paramètres / famille substances	description détaillée	laboratoire	Analyse	
			méthode	référence normative
cations majeurs	ammonium, potassium, sodium, calcium, magnésium	RiverLy IGE	chromatographie ionique	NF EN ISO 14911 (1999) -
anions majeurs	nitrate, nitrite, phosphate, chlorure, sulfate	RiverLy IGE		chromatographie ionique
silice soluble	silice soluble	RiverLy	spectrophotométrie au molybdate d'ammonium	NF T90-007 (2001)
		IGE	ICP-MS (voir métaux)	-
carbone organique dissous	concentration en carbone organique dissous (COD)	RiverLy	thermique (850°C) + catalyseur (Pt), mesure directe	NF EN 1484
spectre UV-visible	spectre d'absorbance de 200 à 800 nm	RiverLy	spectrophotométrie	-
métaux dissous	Li, B, Al, Ti, V, Cr, Mn, Fe, Co, Ni, Cu, Zn, As, Rb, Sr, Mo, Cd, Ba, Pb, U (+ Si pour IGE)	RiverLy	ICP-TQ-MS	NF EN ISO17294-2 (2005)
		IGE	ICP-MS	Note technique ICPMS iCAP TQ Thermo Fisher Scientific + mise au point S. Darfeuil
Paramètres microbiens : dénombrement bactéries viables cultivables	Hétérotrophes totaux	LEM	dilution/étalement/TSA 1/10	
	E.coli / coliformes totaux		NPP_IDEXX	
	Entérocoques intestinaux		NPP_IDEXX	
Paramètres microbiens : DNA meta-barcoding d'amplicons du gène (i) 16S rRNA, et (ii) tpm	gene ARNr 16S, A.caviae (tpm) et P.aeruginosa (ecfX, tpm)	LEM	qPCR	selon Aigle et al. (2021)
	L.monocytogenes, S.aureus			
	integron classe 1, 1 clinique, 2 et 3			
	Bacteroidales totales			
	Bacteroides humain (HF183), ruminant, chien, porc, vache, rat			
	Bacteroides résidents tuyaux réseaux eaux usées			
	Prevotella cheval, poulet/canard			
Paramètres microbiens : dénombrement bactéries totales	Gène 16SrRNA	IGE	qPCR	selon Aigle et al. (2021)
Paramètres microbiens : dénombrement bactéries résistantes	Gène sul 1	IGE	qPCR	
	Gène sul 2			
	Gène tetM			
	Gène copA			

### IV.2. Principe du modèle de mélange biogéochimique

L'objectif de cette dernière partie est de proposer une méthodologie de décomposition de l'écoulement de l'eau aux exutoires des bassins versants, c'est-à-dire estimer les contributions relatives des sources identifiées précédemment (cf. Chapitre II). Cette méthodologie se base sur l'établissement d'un modèle de mélange biogéochimique. Celui-ci se base sur le principe de conservation de masse, c'est-à-dire que la somme des flux des différentes sources pour un élément donné (appelé traceur ; e.g. ion majeur, métaux) est égale au flux de l'élément considéré à l'exutoire du bassin.

Ainsi, il est possible d'écrire le système d'équation suivant, où chaque équation fait référence à un traceur donné :

$$\begin{cases} \sum_{i=1}^n Q_i(t) \times C_{1,i} = Q_{tot}(t) \times C_1(t) \\ \sum_{i=1}^n Q_i(t) \times C_{2,i} = Q_{tot}(t) \times C_2(t) \\ \dots \\ \sum_{i=1}^n Q_i(t) \times C_{k,i} = Q_{tot}(t) \times C_k(t) \end{cases}$$

où  $n$  représente le nombre de sources considéré dans le modèle de mélange,  $k$  est le nombre de traceurs utilisé (avec  $k \geq n-1$ ),  $C_{k,i}$  est la concentration du traceur  $k$  dans la source  $i$ ,  $Q_i(t)$  est le débit de la source  $i$  au temps  $t$ , et  $Q_{tot}(t)$  est le débit total à l'exutoire au temps  $t$ . Les  $n$  débits  $Q_i(t)$  représentent les inconnues qui sont calculées en résolvant le système d'équation ; toutes les autres variables sont connues. Une résolution du système d'équation par la méthode de régression par la méthode des moindres carrés (NNLS pour Non-Negative Least Square régression), et par la méthode Bayésienne a été utilisée dans cette étude.

Le choix des traceurs parmi l'ensemble des paramètres mesurés est une étape critique qui conditionne les résultats du modèle de mélange. Ces traceurs doivent respecter les conditions suivantes :

- Les traceurs doivent être additifs. Cela implique que la valeur d'un paramètre mesuré dans un mélange de  $n$  échantillons d'eau soit égale à la moyenne des valeurs des paramètres de chaque source pondérée des proportions du mélange. Ceci est généralement vrai pour des concentrations d'éléments (ions majeurs ou métaux) ou des absorbances UV-visible, mais invalide pour des rapports de concentration ou des rapports d'absorbance.
- Les traceurs doivent être conservatifs. Cela suppose que les paramètres mesurés ne réagissent pas chimiquement ou physiquement (par exemple avec des processus d'adsorption sur les particules, ou de précipitation), depuis la source jusqu'au mélange. Ceci est difficile à étudier sur le terrain. Il est néanmoins possible de vérifier que les valeurs des indicateurs mesurées à l'exutoire soient bien comprises entre les valeurs minimales et maximales mesurées dans les échantillons de source (ce test est communément appelé un range-test). Dans le cas contraire, cela implique que le paramètre n'est pas conservatif ou bien qu'il manque une source (non identifiée) qui permette d'expliquer cette anomalie.
- Les traceurs doivent être discriminants. Ceci suppose que les valeurs des paramètres mesurés ne soient pas identiques dans toutes les sources. Un test de Kruskal-Wallis permet d'éliminer les indicateurs non discriminants.

Il est possible que deux sources possèdent des compositions biogéochimiques très proches. Ceci rend leur discrimination difficile. Dans ce cas, les échantillons de ces deux sources peuvent être réunis pour former un seul type de source. Pour cela, il est important de questionner la pertinence de regrouper deux sources pour donner un sens au nouveau type de source formé. Par exemple, sur le Ratier, les sources VRN (prairie permanente) et REV (pâturage bovin, avec peu de bovins d'après les enquêtes de terrain) ont été regroupées pour former un type de source associé aux prairies (i.e., pas ou très peu d'élevage sur prairie).

La méthodologie du choix des traceurs est décrite dans la partie IV.4. Les concentrations des traceurs mesurées dans chaque type de source définissent les empreintes biogéochimiques (ou signatures) des sources. Plus les empreintes des types de sources sont différentes, plus robuste sera le modèle de mélange.

Les concentrations des traceurs pour un même type de source sont variables. En effet, les sources ont été prélevées durant plusieurs campagnes afin d'évaluer cette variabilité temporelle (Cf. § IV.1.1). La variabilité des empreintes de chaque type de source (empreintes de chaque échantillon prélevé et associé au type de source) est prise en compte en répétant la résolution du modèle de mélange un nombre  $n$  de fois en sélectionnant aléatoirement des échantillons de source pour les concentrations en entrée du modèle. La moyenne des résultats pour les  $n$  résolutions est prise en compte comme résultat final.

### **IV.3. Validation de la méthodologie**

#### **IV.3.1. Prélèvement des sources dans les écoulements à l'exutoire des bassins versants homogènes**

##### **Principe de la démarche**

Il est plus facile de prélever des échantillons d'eau de surface dans les cours d'eaux que des échantillons d'eau dans les sols (échantillonnage direct – ex. bougie poreuse, lysimètre – ou après lixiviation des sols). C'est pour cela que nous avons choisi de prélever et analyser les eaux de surface en aval de sous-bassins versants homogènes pour définir des empreintes biogéochimiques liées à l'occupation et l'usage du sol.

L'hypothèse avancée dans ce projet est que les eaux s'écoulant en amont de sous-bassins versants homogènes, en terme de géologie, occupation du sol, pédologie ou pratiques agricoles (et qui représentent donc un type de source), ont des compositions physico-chimiques proches. Cela implique qu'il y a des similitudes physico-chimiques entre le lixiviat des sols et le cours d'eau adjacent.

C'est pourquoi nous avons mené une étude sur la représentativité de l'échantillonnage d'eau de surface du cours d'eau pour caractériser des sources diffuses liées à des occupations du sol typiques. Pour cela, une étude comparative de la composition des eaux prélevées dans les cours d'eau et celle extraite de sols adjacents aux cours d'eau a été réalisée. La composition des eaux est abordée au travers des analyses d'ions majeurs, de métaux dissous et de caractérisation de la MOD (par spectrophotométrie UV-visible), et des indicateurs microbiens (Tableau 3).

##### **Méthodologie mise en place pour comparer échantillonnage sols et eaux de surface**

Les résultats présentés dans ce rapport concernent les bassins versants du Ratier et du Mercier sur lesquels deux campagnes de prélèvement de sols ont été menées (7 sols le 18/07/2022 et 6 sols le 07/06/2023). Pour information, la même étude a été réalisée sur le bassin de la Claduègne avec le prélèvement de 11 échantillons de sols le 05/04/2023. Les sols ont été prélevés sur les sous-bassins versants homogènes déterminés précédemment (Tableau 4 ; Figure 15).



Tableau 4 : Echantillonnage des sols avec le nom du sous-bassin versant homogène correspondant, le type de source défini précédemment, la date de l'échantillonnage et les concentrations en carbone organique (COP) et azote (NTP) particulière. (Les 3 sols prélevés sur le sous-bassin BOU - forêt - sont 3 répliqués d'échantillonnage).

sous-bassin homogène	type de source	Dates de prélèvement	COP (g/kg)	NTP (g/kg)
BOU	Forêt	08/06/23	29.3	2.09
BOU	Forêt	08/06/23	34.5	2.50
BOU	Forêt	08/06/23	34.4	2.59
VRV	Forêt	08/06/23	33.0	2.66
GAR	cheval	08/06/23	32.9	3.58
PNC	agricole	08/06/23	41.9	4.08
REV	prairie	08/06/23	36.7	3.54
BOU	Forêt	18/07/22	50.4	6.40
PNC	agricole	18/07/22	37.8	3.45
GAR	cheval	18/07/22	18.1	2.16
VRN	prairie	18/07/22	14.7	1.16
REV	prairie	18/07/22	24.5	2.39
VRV	Forêt	18/07/22	26.7	2.04

Sur chacun des sous-bassins versants homogènes, 8 sous-échantillons de sols ont été prélevés à l'aide d'une tarière afin de prélever les 20 premiers centimètres. Sur le principe, ces 8 prélèvements sont effectués à 5 m de chaque côté du cours d'eau, à 20%, 50% et 80% de la longueur du linéaire du cours d'eau principal ; et deux sous-échantillons supplémentaires sont collectés sur les versants de chaque côté du cours d'eau à 50% de la longueur du linéaire du cours d'eau et à une distance de 50% entre le cours d'eau et la limite du sous-bassin (Figure 27). Bien entendu, ce plan d'échantillonnage a été modifié sur certains sous-bassins en tenant compte de l'accessibilité et de la réalité du terrain.

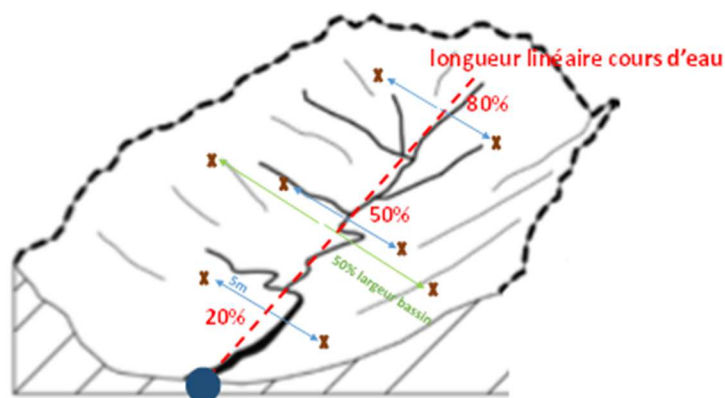


Figure 27 : Plan d'échantillonnage théorique des sols sur un sous bassin-versant homogène. Les croix marrons représentent les 8 sous-échantillons de sol, et le point bleu représente l'exutoire du sous-bassin où les eaux du cours d'eau sont collectées.

Le prélèvement s'effectue après avoir « nettoyé » le sol en enlevant grossièrement le couvert végétal. La tarière est préalablement nettoyée et rincée en utilisant successivement de l'eau de rivière, de l'éthanol et de l'eau ultra-pure. Les 8 sous-échantillons sont collectés dans un sac en polypropylène (PP) conservé dans une glacière à  $\pm 4^{\circ}\text{C}$ .

Au laboratoire, les échantillons sont homogénéisés et une partie est prélevée pour séchage à l'étuve à 105°C pendant 24 h. Les échantillons sont ensuite tamisés à sec à 2 mm sur un tamis en inox et transférés dans un tube de 50 mL en PP jusqu'à analyse.

Chaque échantillon de sol a ensuite subi une lixiviation afin d'extraire les éléments solubles et la MOD (Boukra et al., 2023). Pour cela, 20 g de sol sont introduits dans une bouteille en PP de 250 mL et 200 mL de solution extractante de chlorure de sodium ( $\text{CaCl}_2$ , 10 mM) sont ajoutés. L'échantillon est agité à 180 rotations/min à 20°C dans l'obscurité pendant 6 h. Les échantillons sont ensuite centrifugés à 4500 g durant 15 min et le surnageant est prélevé et filtré ( $< 0.45 \mu\text{m}$ , filtre PVDF) pour analyses (ions majeurs, métaux et spectres UV-visible).

Des études ont montré que le type de sol régit la quantité de MOD transférée vers le milieu aquatique (Bolan et al., 2011). L'usage des sols ainsi que la biomasse du sol influencent la composition de la MOD transférée au cours d'eau (Kalbitz et al., 2003). Les composés labiles de faible poids moléculaire constituent la matière organique dans les couches superficielles du sol. Leur proportion diminue dans les sols profonds pour laisser place à une fraction plus importante de composés réfractaires de haut poids moléculaire. C'est pourquoi, nous avons réalisé une expérience d'incubation de la MOD à partir des échantillons d'extraction de sol afin de simuler des apports de MOD plus réfractaire. Pour cela, une partie du lixiviat (60 mL) a été incubée dans l'obscurité à 20°C sous agitation afin de dégrader la MOD (la fraction labile). Un inoculum contenant des éléments nutritifs et des bactéries issues des échantillons de sols a été ajouté aux échantillons (Boukra et al., 2023). Le lixiviat incubé est récupéré au bout de 28 jours, filtré puis analysé.

Les mêmes analyses que pour les échantillons de sources ont été réalisées sur les solutions d'extraction de sols (ions majeurs, métaux dissous, indicateurs UV-visible ; cf. Tableau 3) ; seules les analyses des indicateurs UV-visible ont été réalisées dans les solutions d'incubation.

Au final, les compositions physico-chimiques des échantillons d'extrait de sol et des échantillons d'extrait de sol incubé sont comparées à celles des eaux prélevées en aval des sous-bassins versants homogènes (échantillons source).

Toutes les concentrations d'ions majeurs et de métaux dissous, ainsi que les indicateurs UV-visible mesurés dans l'ensemble de ces échantillons d'extraits de sol sont déposés dans un dossier partagé du projet (NextCloud). Ce jeu de données sera rendu public sur une plateforme ouverte (data.gouv.fr).

### **Mise en évidence de l'influence de la dégradation de la MOD dans les sols**

Afin de comparer la nature de la MOD dans les solutions d'extraction de sols, incubés ou non, et dans les sources, l'ensemble des valeurs des indicateurs UV-visible sont comparés par une analyse en composante principale (ACP). La Figure 28 montre que chaque type d'échantillon (extrait de sol, extrait de sol incubé et source) a globalement une empreinte distincte, malgré une forte variabilité au sein de chaque type d'échantillon induite par quelques échantillons atypiques (en particulier pour les sources). De plus, la nature de la MOD dans les échantillons d'extrait de sol incubé paraît plus proche de celle des échantillons d'extrait de sol non incubé (principalement selon la composante 2 de l'ACP). Ce résultat suggère que la MOD terrigène présente dans le cours d'eau en aval des sous-bassins versants homogènes provient plutôt des sols plus profonds avec une MOD plus réfractaire. Ce résultat a aussi été observé par Boukra et al. (2023) sur le bassin versant de l'Yzeron à partir d'échantillons de sols prélevés dans des sous-bassins versants forestiers ou agricoles, et dans les cours d'eau à l'exutoire de ces sous-bassins versants.

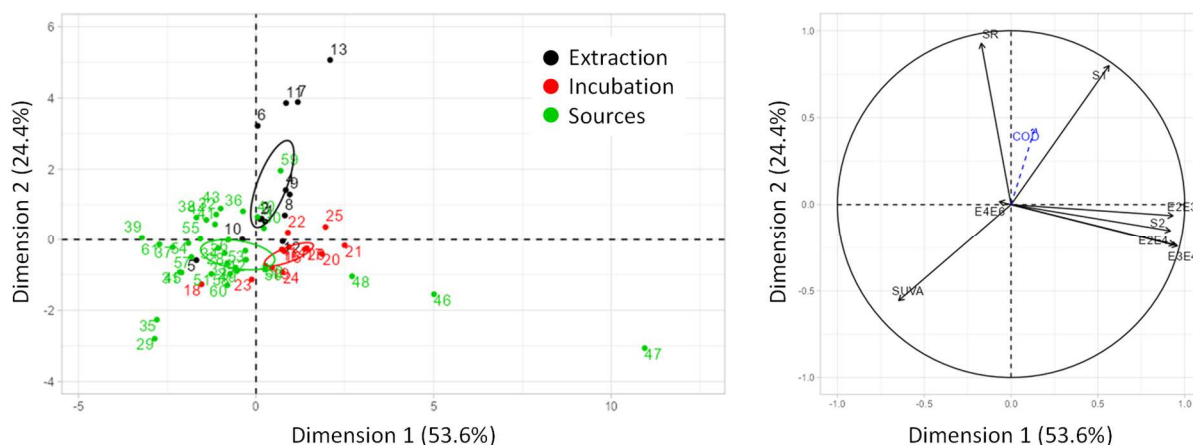


Figure 28 : Analyse en composante principale (plan factoriel 1-2) des indicateurs de la nature de la MOD (indicateurs UV-visible) mesurés dans les échantillons d'extrait de sol (points noirs), extrait de sol incubé (points rouges) et source (points verts),

Pour la suite de cette étude, nous nous focalisons sur la comparaison entre les échantillons de source et les échantillons de sols incubés qui représentent mieux les transferts de MOD du sol vers le cours d'eau. Les concentrations en ions majeurs et métaux dissous n'ayant été analysées que dans les solutions d'extraction de sols (et non dans les solutions incubées), ces données ont été ajoutées aux données des indicateurs UV-visible mesurés dans les échantillons incubés afin de pouvoir comparer les empreintes des échantillons de sols avec celles des sources. Sur le plan factoriel 1-2 de l'ACP, les échantillons de sols et de sources sont clairement différenciés suivant la composante principale 1 (CP 1) (Figure 29).

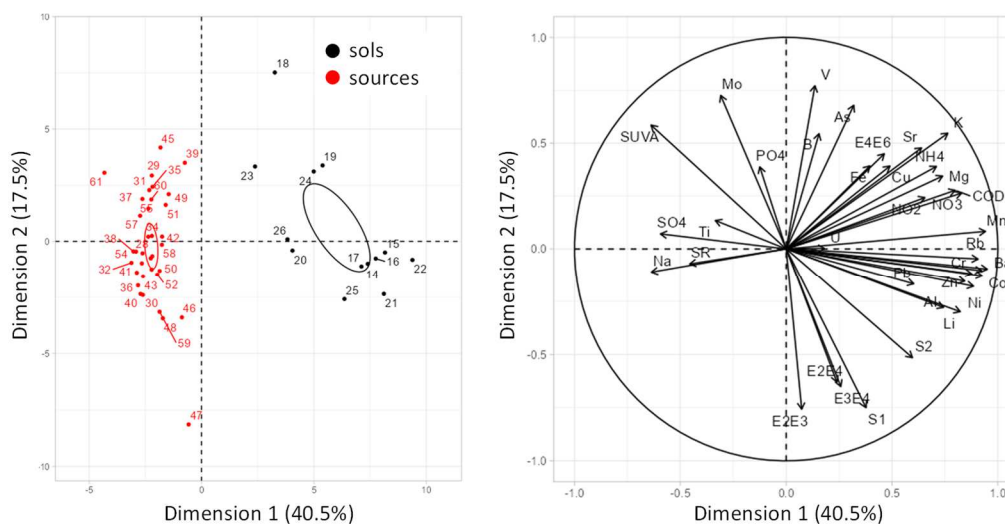


Figure 29 : Analyse en composante principale (plan factoriel 1-2) des indicateurs de la nature de la MOD (indicateurs UV-visible) et des concentrations en ions majeurs et métaux dissous mesurés dans les échantillons des sources (points rouges) et de sols (points noirs ; échantillons incubés pour la MOD).

De façon générale, la plupart des ions majeurs et métaux sont présents à de plus fortes concentrations dans les eaux d'extraction de sols que dans les sources. Ceci peut résulter du design de l'expérimentation d'extraction, pour lequel une quantité de sol a été introduite dans un volume de solution d'extraction avec un ratio 20 g / 200 mL. Ce ratio a été choisi car il représente un bon compromis au niveau expérimental pour extraire suffisamment d'éléments et de MOD pour être

correctement analysé. Une diminution de ce rapport devrait conduire à une diminution des ions majeurs et métaux dans les solutions d'extraction de sols et un rapprochement des deux populations de points (source et sol) selon la CP1 de l'ACP.

Si la CP1 porte majoritairement cet effet de concentration dans les extractions de sol, il est intéressant d'observer la répartition des échantillons en prenant en compte d'autres composantes principales. Ainsi, la projection des échantillons de sources et de sols dans le plan factoriel 2-3 (Figure 30) montre une différenciation entre des types de sources agricole (source PNC), élevage de cheval (source GAR), prairie (sources VRN et REV) et forêts (sources VRV et BOU) (Figure 15). Ces regroupements de source ont été réalisés par Grandjouan (2024) en se basant sur une étude plus approfondie des concentrations des ions majeurs, des métaux dissous et de nombreux descripteurs de MOD et de leur variabilité entre les sources et au sein de chaque source. Cette différenciation entre types de sources est principalement portée par la CP2 qui est influencée par quelques métaux et par quelques indicateurs UV-visible.

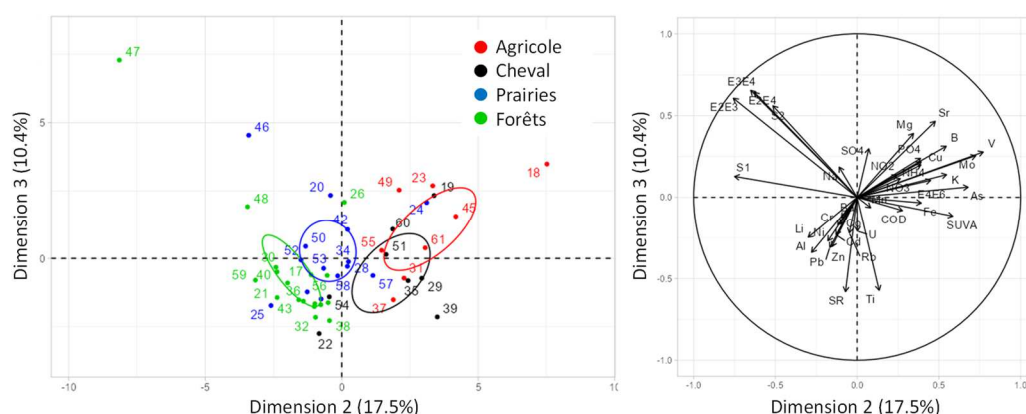


Figure 30 : Analyse en composante principale (plan factoriel 2-3) des indicateurs de la nature de la MOD (indicateurs UV-visible) et des concentrations en ions majeurs et métaux dissous mesurés dans les échantillons des sources et de sols (échantillons incubés pour la MOD).

L'ensemble de ces résultats montrent que les eaux qui drainent les sols de sous-bassins versants homogènes et les eaux à l'exutoire de ces sous-bassins sont fortement influencées par l'occupation du sol. La nature de la MOD, au travers de descripteurs comme les indicateurs UV-visibles, semble être un bon traceur de l'occupation du sol (en complément des traceurs plus classiques comme les ions majeurs et les métaux). Surtout, cette étude montre clairement qu'il est possible d'associer la signature biogéochimique de l'eau drainant un sous-bassin versant homogène à ses caractéristiques générales, et en particulier l'occupation du sol.

Les résultats préliminaires obtenus pour les expérimentations similaires réalisées sur le bassin versant de la Claduègne montrent un effet très marqué de la géologie entre les bassins versants sur le plateau basaltique du Coiron (au nord) et les bassins versants sédimentaires (au sud) (Chtiba, 2023).

#### **IV.3.2. Validation du modèle de mélange : mélanges numériques et en laboratoire**

La résolution des modèles de mélange est d'autant plus performante que les sources ont des empreintes géochimiques (ensemble des valeurs des traceurs) différentes. Dans le cas où des sources ont des empreintes proches, il est possible que le modèle ait du mal à différencier les sources, ce qui peut conduire à la surestimation d'une source au détriment d'une autre. Afin de valider le modèle de mélange et d'évaluer ses performances, nous avons réalisé plusieurs tests :

- Mélange numériques : les compositions des eaux de mélange sont simulées en appliquant différentes proportions de mélange entre les sources (valeurs théoriques de mélange) ; les modèles de mélange sont alors appliqués sur ces compositions simulées. Les contributions estimées par le modèle sont alors comparées aux valeurs théoriques des mélanges.
- Mélanges en laboratoire : des eaux typiques de sources sont mélangées en proportions variées et connues. Les valeurs des traceurs sont mesurées dans chaque mélange et sont utilisées comme composition cible dans les modèles de mélange. Les contributions estimées par le modèle sont alors comparées aux proportions théoriques.

Dans les deux cas, il est possible de calculer des critères de performance du modèle. Dans cette étude, nous avons choisi de calculer le RMSE (écart quadratique moyen) qui est l'écart-type des résidus (erreurs de prévision représentées par la différence des contributions estimées et des contributions théoriques de chaque source).

##### **Mélanges numériques**

Dans un premier temps, les performances du modèle de mélange ont été étudiées à partir de 4 mélanges numériques réalisés à partir des différentes sources identifiées sur les bassins du Ratier et du Mercier. Deux méthodes de résolution ont été testées : la méthode de régression par la méthode des moindres carrés (NNLS pour Non-Negative Least Square regression), et la méthode Bayésienne (Grandjouan, 2024).

Les conclusions de ces tests valident le modèle de mélange, indépendamment de la méthode de résolution (méthode *nnls* ou bayésienne). Les contributions théoriques des sources sont généralement bien estimées par le modèle de mélange à l'aide des empreintes issues des concentrations en métaux, ions majeurs et indicateurs de la matière organique dissoute (Figure 31). Les deux méthodes de résolution peuvent être utilisées. Les 4 tests de mélanges réalisés suggèrent toutefois que l'approche Bayésienne montre globalement de meilleurs résultats que la méthode *nnls*, en particulier pour les mélanges avec des contributions très contrastées (par exemple des contributions de 5-10% avec des contributions de 40%).



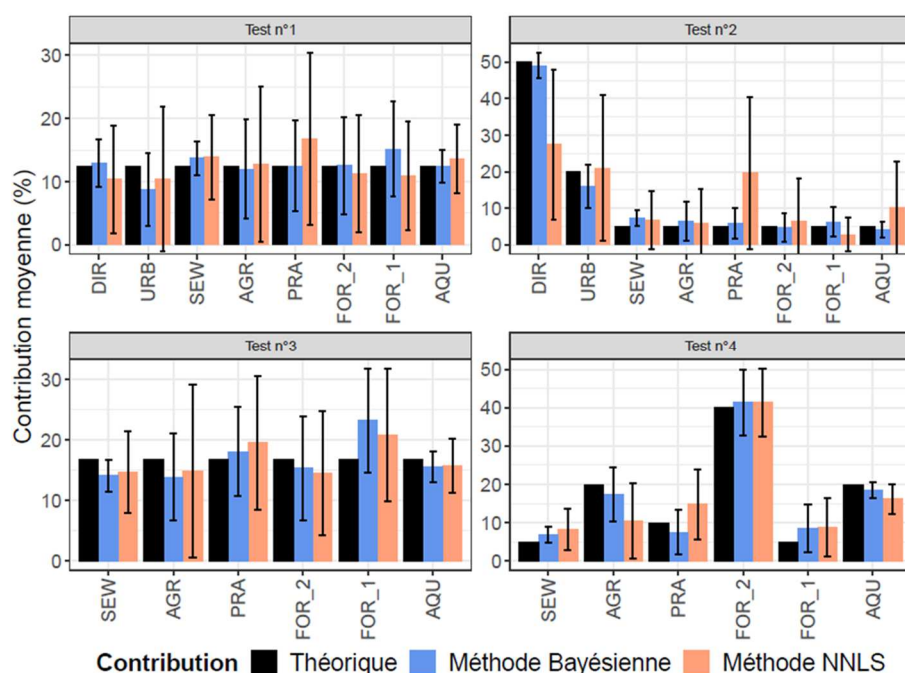


Figure 31 : Comparaison des contributions moyennes estimées par les méthodes de résolution Bayésienne et de régression par les moindres carrés (NNLS) avec les contributions théoriques connues des mélanges virtuels, pour 4 tests de mélange numériques (avec 6 à 8 sources pour le bassin du Ratier). Source : Grandjouan (2024).

### Mélanges en laboratoire

Dans un second temps, 7 mélanges en laboratoire de 3 types de sources prélevées pour cette occasion ont été réalisés (Tableau 4). Les 3 types de sources sont : souterraine (source COR), agricole (sources REV, PNC ou GAR) et forestière (sources VRV ou BOU). Les décompositions des mélanges ont été répétées 1000 fois, en prenant comme composition des sources un des échantillons typiques de la source considéré (tirage aléatoire). Les moyennes des 1000 contributions obtenues sont calculées et représentent les résultats finaux des décompositions. Les résolutions des modèles de mélange ont été effectuées en testant successivement une sélection de traceurs comme suit :

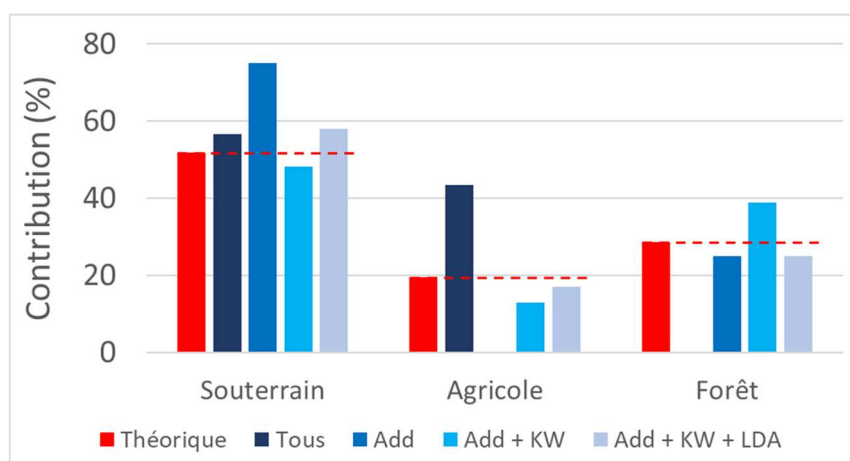
- Tous les traceurs.
- Tous les traceurs exceptés ceux qui ne sont pas additifs.
- Tous les traceurs exceptés ceux qui ne sont pas additifs et discriminants.
- Les traceurs optimaux sélectionnés après une analyse discriminante linéaire pas à pas.

Un exemple de décomposition d'un mélange (mélange n°6) composé d'un échantillon de sources souterraine (mélange théorique de 52%), agricole (20%) et forestière (29%) est présenté dans la Figure 32. Les résultats montrent que l'utilisation de l'ensemble des paramètres comme traceurs pour la résolution des équations de mélange donne de mauvais résultats, en attribuant toute la proportion de la source forestière à la source agricole. Le fait d'enlever les paramètres non additifs n'améliore pas les résultats du modèle avec une forte surestimation de la source souterraine au dépend de la source agricole. La suppression des paramètres non discriminants améliore grandement la résolution du modèle. Une légère surestimation de la contribution de la source forestière (au détriment des 2 autres

sources) est observée. Enfin, la sélection optimale de traceurs suite à l'analyse discriminante permet d'améliorer les résultats et de trouver des contributions modélisées proches à 5% des valeurs théoriques. Ces résultats sont confirmés pour les valeurs du RMSE (écart quadratique moyen) qui est plus faible pour la modélisation avec la sélection optimale de traceurs (RMSE = 7%) que pour celles prenant l'ensemble des traceurs (RMSE = 19%), ou seulement ceux qui sont additifs (RMSE = 23%).

*Tableau 5 : Valeur de RMSE (en %) pour chaque décomposition effectuée sur les 7 mélanges et en fonction de 4 sélections de traceurs. Les valeurs de RMSE inférieures à 15% (valeurs en vert) sont considérées comme correctes, c'est-à-dire que les contributions modélisées sont considérées comme reflétant les mélanges théoriques réalisés. Source : Baduel (2022).*

	Mélange	1	2	3	4	5	6	7
Contribution théoriques de mélange (en %)	Souterrain	70	31	0	0	20	52	30
	Agricole	30	69	70	30	27	20	0
	Forêt	0	0	30	70	53	29	70
Valeur de RMSE (en %)	Tous	42	37	22	45	23	19	43
	Add	24	57	46	11	18	23	40
	Add + KW	13	16	21	9	28	15	27
	Add + KW + LDA	26	28	14	11	12	7	8



*Figure 32 : Exemple de résultat de décomposition d'un mélange de 3 types de sources (mélange théorique avec sources souterraine : 52% ; agricole : 19% ; et forêt : 29%) en appliquant le modèle de mélange avec 4 sélections de traceurs (tous les traceurs utilisés : Tous ; en enlevant les traceurs non additifs : Add ; en enlevant ensuite ceux qui ne sont pas discriminants : Add + KW ; et en sélectionnant finalement ceux qui sont les plus discriminants : Add + KW + LDA). Source : Baduel (2022).*

Ces résultats montrent qu'il est impératif de sélectionner les traceurs en éliminant les paramètres non additifs et non discriminants. L'optimisation de la sélection de traceurs par l'approche de l'analyse discriminante linéaire pas à pas est une étape essentielle qui améliore grandement la modélisation des contributions des sources dans le cas des mélanges des eaux du bassin versant du Ratier.

#### IV.4. Choix des traceurs identifiant les types de source

La démarche a été développée et testée pour le bassin du Ratier (thèse Olivier Grandjouan, 2024). Elle a ensuite été appliquée pour sélectionner les traceurs de sources du bassin de la Claduègne (stage Lionel Elzear, 2023).

##### IV.4.1. Test d'additivité pour les indicateurs UV-visible

Si les absorbances des spectres UV-visible sont additives, cette propriété n'est pas évidente pour les indicateurs UV-visible qui sont soit des rapports entre deux absorbances ou des pentes spectrales. Pour vérifier l'additivité de ces indicateurs, des mélanges de deux eaux aux propriétés optiques différentes (mélange entre eau de nappe COR et eau de la prairie avec chevaux GAR ; et mélange entre les eaux des prairies avec bovins REV et PNC) ont été réalisés en différentes proportions. Si aucune relation linéaire n'est observée entre les valeurs de l'indicateur et les proportions de mélange, alors l'indicateur n'est pas considéré comme additif et il ne peut pas être utilisé comme traceur dans la résolution des modèles de mélange.

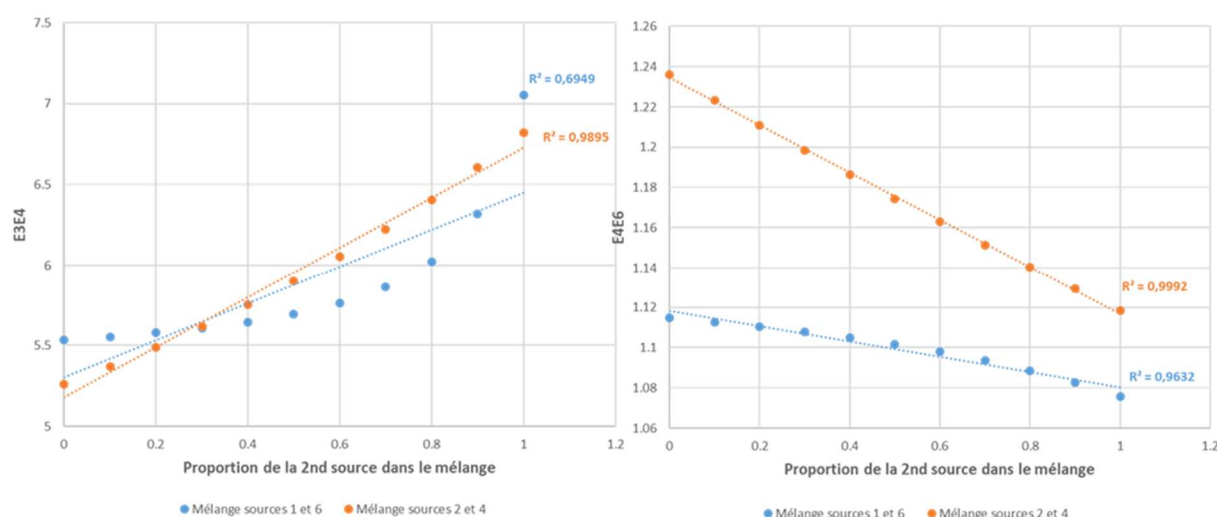


Figure 33 : Valeurs des indicateurs UV-vis E3E4 (à gauche) et E4E6 (à droite) dans des mélanges de 2 échantillons (mélange sources COR et GAR en bleu ; mélange sources REV et PNC en orange) pour différentes proportions. Source : Baduel (2022).

La plupart des indicateurs UV-visible (i.e. 5 sur 8 ; E2E3, E2E4, E3E4, SR et SUVA) ne possède pas de propriété additive comme le suggèrent les courbes de mélange du rapport d'absorbance E3E4 (Figure 33). Seules les valeurs des indicateurs E4E6 (Figure 33) et des pentes spectrales S1 et S2 évoluent de façon linéaire en fonction des proportions de mélange entre deux échantillons ; ces indicateurs peuvent donc être considérés comme additifs et être utilisés dans des modèles de mélange. Cependant, les indicateurs non additifs restent utiles pour caractériser la composition physico-chimique des sources et évaluer leurs différences ou similarités.

##### IV.4.2. Elimination des indicateurs non pertinents (bassin versant du Ratier)

Parmi l'ensemble des paramètres mesurés (Tableau 3) dans les eaux prélevées au niveau de chaque source et au niveau des stations de mélange aux exutoires des bassins, certains paramètres doivent être éliminés car jugés non pertinents pour être choisis comme traceur pour résoudre les modèles de mélange.

### i) Elimination des paramètres jugés non additifs :

Les indicateurs UV-visibles correspondant à des rapports d'absorbance qui sont, par définition, non additifs : E2:E3, E2:E4, E3:E4, SUVA, SR. Seuls les indicateurs E4E6, S1 et S2 ne correspondent pas à des rapports d'absorbance et ont été testés comme additifs d'après Baduel (2022) (Cf. § IV.4.1).

### ii) Elimination des paramètres non conservatifs :

Certains paramètres ont été écartés du jeu de données comme Fe, Mn et Co, car jugés trop dépendants des réactions d'oxydo-réduction. De plus, les ions phosphates, trop réactifs dans les eaux de surface, et les ions ammonium, nitrate et nitrite, dépendant trop du cycle de l'azote, ont aussi été éliminés.

La deuxième approche consiste à écarter les paramètres non conservatifs en appliquant la méthode dite du *range-test*. Ce test permet de vérifier si les concentrations mesurées dans un mélange sont bien comprises dans les bornes matérialisées par les concentrations observées dans les sources. Pour le bassin du Ratier, certains paramètres ne satisfont pas le range-test (les métaux : Ti, Pb, Al, Mo ; et les ions majeurs :  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{SO}_4^{2-}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ , et  $\text{SiO}_2$ ). Par exemple, lors de certains événements hydrologiques, l'ion magnésium a des concentrations plus faibles dans le mélange que la plus faible des concentrations mesurées dans les sources (Figure 34a). Ceci indique que i) l'ion magnésium n'est pas conservatif ou ii) qu'une source pouvant diluer les eaux a été omise dans le modèle de mélange. Cette dernière hypothèse a été retenue dans notre étude et une source additionnelle correspondant à une source de ruissellement de surface (SUR) a été prise en compte dans le modèle de mélange. L'hypothèse est que sa composition soit proche de celles des eaux de pluie. Afin d'intégrer cette nouvelle source au jeu de données, des concentrations considérées comme représentatives des eaux de ruissellement peu chargées ont été sélectionnées : les concentrations en ions majeurs proviennent de 9 prélèvements ponctuels effectués entre 2017 à 2019 sur le pluviomètre de Pollionnay ; les concentrations en métaux dissous sont issues du projet ESPRIT (Dembélé et al., 2008) ; et les indicateurs UV-Vis proviennent d'un échantillon additionnel prélevé à la suite d'un événement pluvieux dans le pluviomètre de Pollionnay le 14/03/2023. En prenant en compte la source additionnelle de ruissellement de surface (SUR), tous les éléments passent finalement le range-test, comme le montre la Figure 34b pour l'ion magnésium.

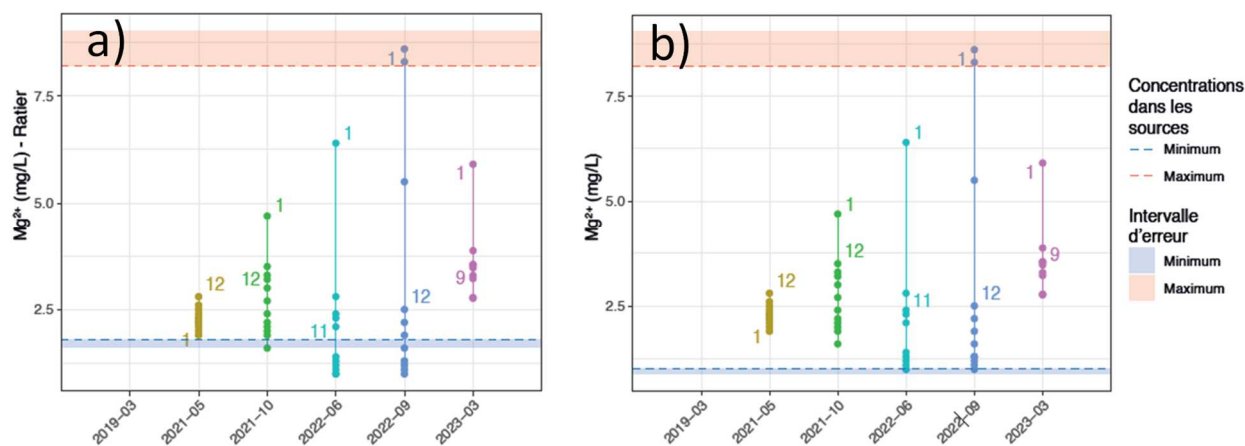


Figure 34 : Application du range-test avant (a) et après (b) l'ajout de la source additionnelle ruissellement de surface, pour l'ion magnésium et pour les événements hydrologiques prélevés sur la station du Ratier. Les lignes pointillées en bleu et rouge correspondent aux concentrations minimale et maximale mesurées dans les échantillons de source. Les zones en bleu et rouge correspondent à un intervalle d'erreur de 10% pour ces concentrations. Chaque groupe de points correspond aux concentrations mesurées pour un des événements hydrologiques. Le range-test est validé si les concentrations mesurées pour un paramètre sont comprises entre les bornes ainsi définies. Source : Grandjouan (2024).

### iii) Elimination des paramètres non discriminants :

Les paramètres qui ne permettent pas de discriminer au moins deux sources entre elles sont identifiés à l'aide d'un test de Kruskal-Wallis couplé à un test de Dunn. Pour le bassin du Ratier, Ni et Ti ont été écartés car considérés comme non discriminants (Tableau 6).

*Tableau 6 : Résultats du test de Kruskal-Wallis et de la multi-comparaison de Dunn pour les paramètres classés du plus au moins discriminants d'après la p-value ajustée calculée. Les paramètres en gras (Ni et Ti) correspondent à ceux qui ne discriminent pas au minimum deux sources entre elles. Source : Grandjouan (2024).*

Indicateur	<i>p-value</i> ajustée	Indicateur	<i>p-value</i> ajustée
COD	4.0E-11	Ba	4.0E-05
SiO <sub>2</sub>	4.2E-11	V	4.9E-05
Cl <sup>-</sup>	4.5E-11	As	2.3E-04
Na <sup>+</sup>	4.8E-11	Cd	3.9E-04
Mg <sup>2+</sup>	1.2E-10	U	6.9E-04
Ca <sup>2+</sup>	2.6E-10	Sr	2.6E-03
S2	5.5E-10	Li	4.4E-03
SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>	8.1E-10	Cr	0.01
K <sup>+</sup>	8.7E-10	Rb	0.01
Zn	3.4E-07	B	0.01
Pb	1.5E-06	Ni	0.06
Mo	1.7E-06	Ti	0.93
Cu	2.2E-06		

Pour le bassin du Ratier, l'ensemble des étapes d'élimination des paramètres non pertinents a conduit à restreindre la liste à 23 paramètres dont 7 composés majeurs, 14 métaux dissous et 2 indicateurs de MOD (Tableau 6).

#### IV.4.3. Sélection des paramètres les plus discriminants (bassin versant du Ratier)

L'étape suivante consiste à sélectionner les paramètres qui permettent la meilleure discrimination des sources entre elles. Pour cela, une Analyse Factorielle Discriminante (AFD) est appliquée et couplée à une minimisation du lambda de Wilks. Ce couple de méthodes permet d'obtenir la plus petite combinaison de paramètres qui maximise la variabilité inter-source tout en minimisant la variabilité intra-source. Les paramètres obtenus peuvent alors être considérés comme les traceurs de ces sources. Ces 15 traceurs correspondent à :

- 7 composés majeurs : Cl<sup>-</sup>, SO<sub>4</sub><sup>2-</sup>, Ca<sup>2+</sup>, Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup> et Mg<sup>2+</sup> ;
- 6 métaux dissous : As, Ba, Cr, Li, Rb et Sr ;
- 2 indicateurs de MOD : COD et la pente spectrale S2.



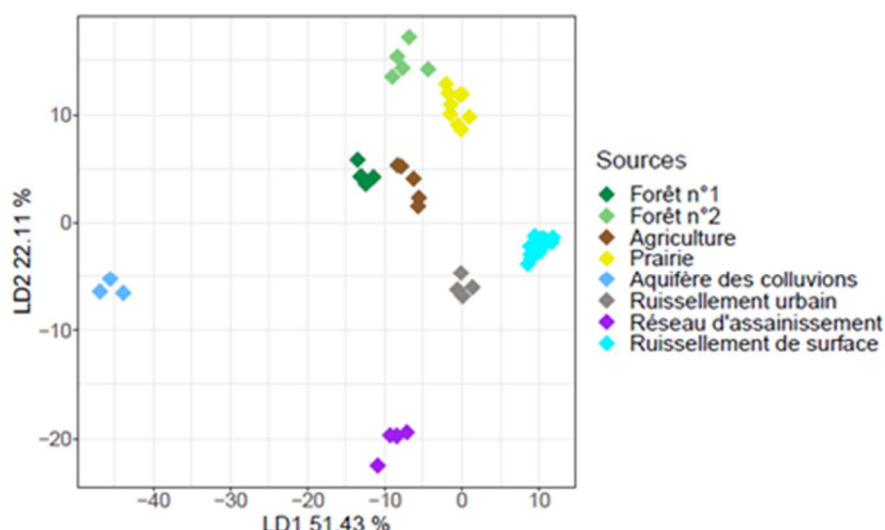


Figure 35 : Représentation sources du bassin du Ratier dans la projection de l'AFD selon les nouveaux axes créés à partir de la sélection de traceurs obtenus. Les échantillons de sources sont colorés selon les types de sources définies. Source : Grandjouan (2024).

Cette sélection de traceurs permet de différencier les différentes sources prédéfinies et, en particulier, de différencier les eaux issues du réseau d'assainissement, les eaux de ruissellement urbain, les eaux provenant de l'aquifère des colluvions, et les eaux de sources diffuses provenant du drainage des sols ruraux. Aussi, cette méthodologie permet de différencier les eaux provenant de sous-bassins forestiers de celles provenant de sous-bassins d'élevage et de culture, ou celles provenant de prairies (Figure 35). Toutes ces sources ont des empreintes biogéochimiques (constituées par les 15 traceurs sélectionnés) bien distinctes les unes des autres (Figure 36).

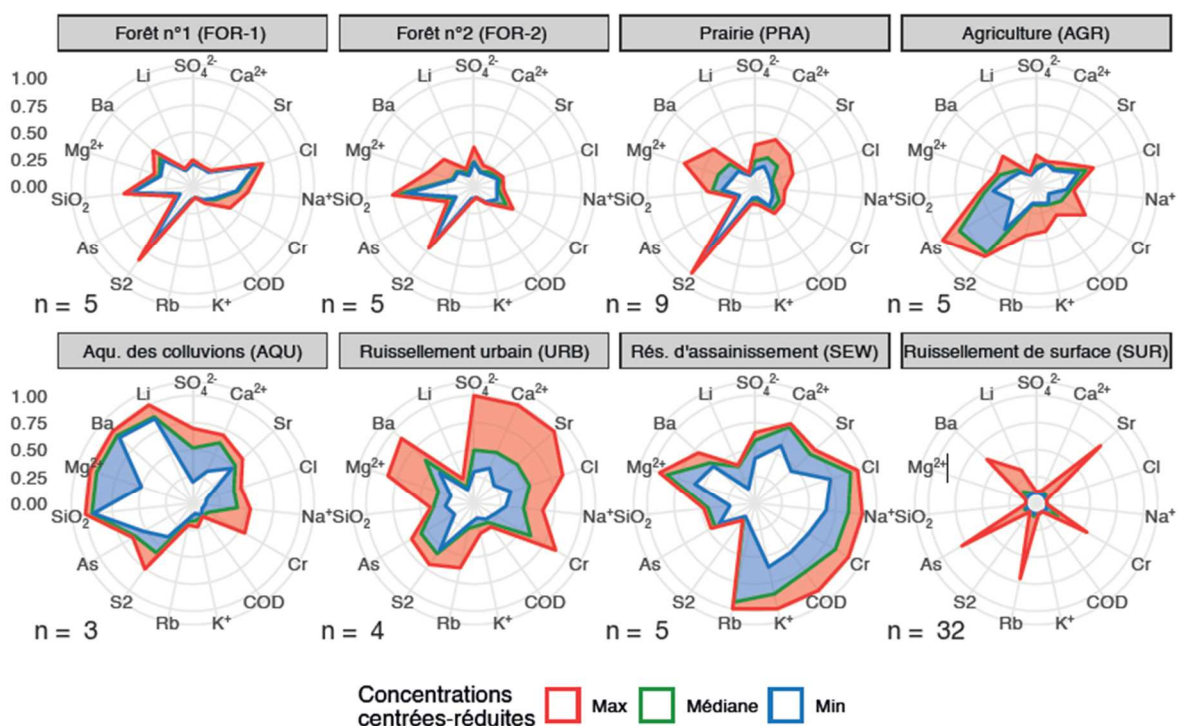


Figure 36 : Empreintes biogéochimiques des sources identifiées, sous forme de radarplot. Les traceurs correspondent à la sélection optimale obtenue à partir de l'approche réductionniste de sélection des traceurs. Le chiffre n correspond au nombre d'échantillons par source. Aqu. : Aquifère ; Rés.: Réseau. Source : Grandjouan (2024).



Tableau 7 : Tableau des paramètres biogéochimiques et sélection des traceurs pour la Claduègne.

Test et a priori	Géologie	Occupation et usage des sols
Tous les indicateurs	Li , B , Al , Ti , V , Cr , Mn, Fe, Co, Ni, Cu, Zn, As, Rb, Sr, Mo, Cd, Ba, Pb, U, Si (21)*	COD, NTD, E2/E3, E2/E4, E3/E4, E4/E6, SUVA, S1, S2, SR, Mn227, Mw227, disp227, A0227, A1227, A2227, A3227, C0227, C1-227, C2-227, C3-227, Mn254, Mw254, disp254, A0-254, A1-254, A2-254, A3-254, C0-254, C1-254, C2-254, C3-254 (32)
A priori (additif et conservatif)	Tous les métaux (21)	COD, NTD, S1, S2, SR, Mn227, A0-227, A1-227, A2-227, A3-227, Mn254, A0-254, A1-254, A2-254, A3-254, (15)
Range Test	Tous les métaux (21)	Tous les MO A priori – (A0-227 , A0-254)
Kruskal-Wallis	Li , B , Al , Ti , V , Mn, Fe, Ni, Rb, Sr, U, Si (12)	A2-227, A2-254, A3-227, COD (4)

\* les chiffres correspondent au nombre de traceurs restant après chaque étape de sélection de traceurs

Finalement, une analyse factorielle discriminante (AFD) a été réalisée avec tous les paramètres ou seulement avec les traceurs discriminants sélectionnés par les tests. Une meilleure discrimination a été obtenue en gardant 21 métaux et 15 indicateurs de matière organique (Tableau 7). Tous les types de sources (sols sur basalte en forêt et prairie ; sols sur basalte en prairie uniquement ; sols sur roches sédimentaires avec utilisation de fumier ; sols sur roches sédimentaires avec landes ; ruissellement urbain ; et rejets de STEU) sont parfaitement discriminés (Figure 38).

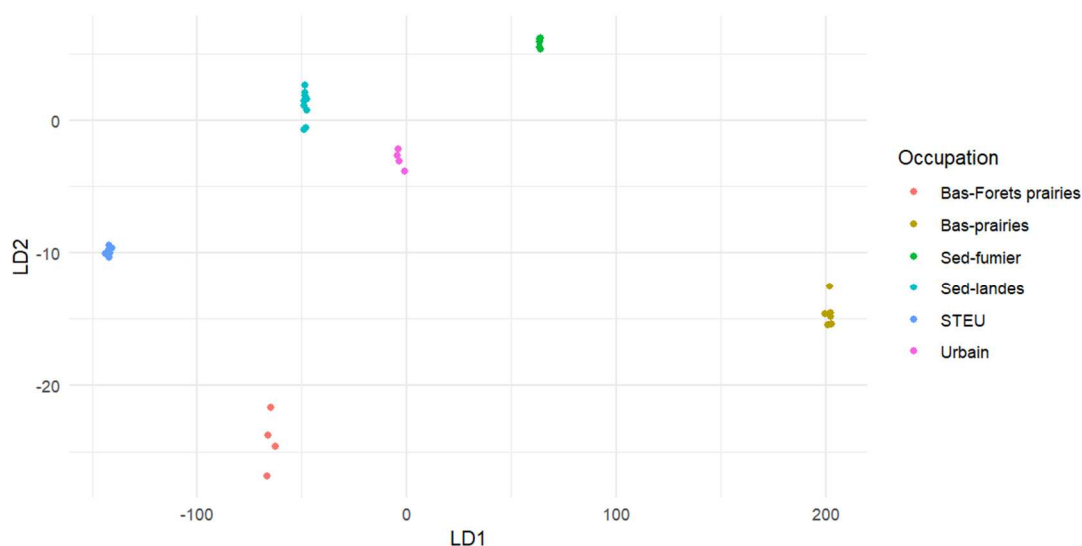


Figure 38 : Projection des échantillons de sources (regroupés par type de source) dans le plan factoriel 1-2 créé par l'analyse factorielle discriminante à partir des 36 traceurs (21 métaux et 15 indicateurs de MOD) pour la Claduègne.

Au niveau de la Claduègne, il est très facile de différencier les sources diffuses, des rejets de STEU et du ruissellement urbain. Pour les sources diffuses, la géologie joue un rôle important dans la composition des eaux ; ainsi les eaux provenant du plateau basaltique sont clairement différenciées

des eaux provenant des formations sédimentaires. Pour chaque type de géologie, l'occupation et usage du sol impacte aussi la composition des eaux. Au niveau du plateau basaltique, les eaux drainant uniquement des prairies ont une signature différente de celles qui drainent aussi des zones forestières. Enfin, les eaux issues des formations sédimentaires ont des signatures différenciées si elles drainent des sols avec fumier ou non (i.e., lande).

#### **IV.4.5. Synthèse sur le traçage des sources**

A ce stade de l'étude, nous pouvons relever quelques similitudes dans les signatures des sources entre les deux bassins versants étudiés (Ratier et Claduègne). Dans les deux cas, les eaux de ruissellement urbain et les eaux de STEU ont des signatures distinctes des sources diffuses rurales. La géologie joue un rôle primordial dans les signatures des eaux. Pour le Ratier, les eaux provenant des colluvions ont leur signature propre ; pour la Claduègne, les basaltes et les roches sédimentaires sont clairement différenciés.

Des différences entre les deux bassins sont observées concernant le regroupement des sources diffuses. Pour le Ratier, il est possible de distinguer des différences nettes entre les signatures des eaux provenant des forêts des zones agricoles et des prairies sans pâturage ; pour la Claduègne, ces distinctions sont moins nettes et associées à la géologie. Ceci provient sans doute du fait que les occupations et usages du sol des sous-bassins échantillonnés sur le Ratier sont plus homogènes que ceux des sous-bassins de la Claduègne. Pour la Claduègne, il est difficile de remonter dans les têtes de bassins pour avoir des sous-bassins homogènes et d'avoir des écoulements significatifs permettant un échantillonnage représentatif.

#### **IV.5. Exemple de décomposition d'évènements pluvieux aux exutoires des bassins versants**

Les empreintes des types de sources identifiés sur les bassins du Ratier et de la Claduègne ont été utilisées pour décomposer le débit aux exutoires des deux bassins en fonction des types de sources lors d'évènements pluvieux.

Les analyses réalisées sur les échantillons de mélange sont les mêmes que les analyses réalisées pour les échantillons de source : concentration en ions majeurs et métaux, indicateurs UV-visibles caractéristiques de la nature de la matière organique dissoute, indicateurs microbiens (Tableau 5). Parmi l'ensemble des données acquises, seuls les traceurs sélectionnés pour différencier les sources des bassins du Ratier et du Mercier (15 traceurs, Cf. section IV.4.3) et les sources du bassin de la Claduègne (36 traceurs, Cf. section IV.4.4) sont utilisés pour résoudre les équations du modèle de mélange.

##### **IV.5.1. Décomposition des mélanges aux exutoires des bassins versants du Mercier et du Ratier**

Pour les bassins versants du Ratier et du Mercier, 6 évènements pluvieux ont été prélevés au niveau des exutoires (mélanges).

Les types de sources pris en compte pour décomposer ces mélanges sont : forêt, prairie, agriculture (élevage et culture), aquifère des colluvions, ruissellement urbain, réseau unitaire d'assainissement et ruissellement de surface (eau de pluie). Le modèle de mélange a été résolu à partir d'une méthode

Bayésienne, en prenant en compte les concentrations des traceurs mesurés dans chaque type de source (Figure 36).

Un exemple de résultats de décomposition est présenté dans la Figure 39 pour le petit évènement hivernal de mars 2023 aux stations du Mercier et du Ratier (Grandjouan, 2024). Les contributions du ruissellement urbain sont importantes et comprises entre 17% et 52% pour le Mercier et entre 28 % et 47% pour le Ratier. Elles sont en moyenne plus élevées pour le Ratier (environ 37%) que pour le Mercier (environ 20%). Cette différence reflète la différence d'occupation du sol des surfaces urbaines imperméabilisées qui représentent 13% de la surface du bassin du Mercier et 21% de celle du Ratier. Les contributions du ruissellement de surface (associé à des écoulements de surface rapides d'eau de pluie qui n'a pas le temps de se charger en ions ou métaux) restent proches de 15% tout au long de l'évènement pour le Mercier et proches de 20% pour le Ratier.

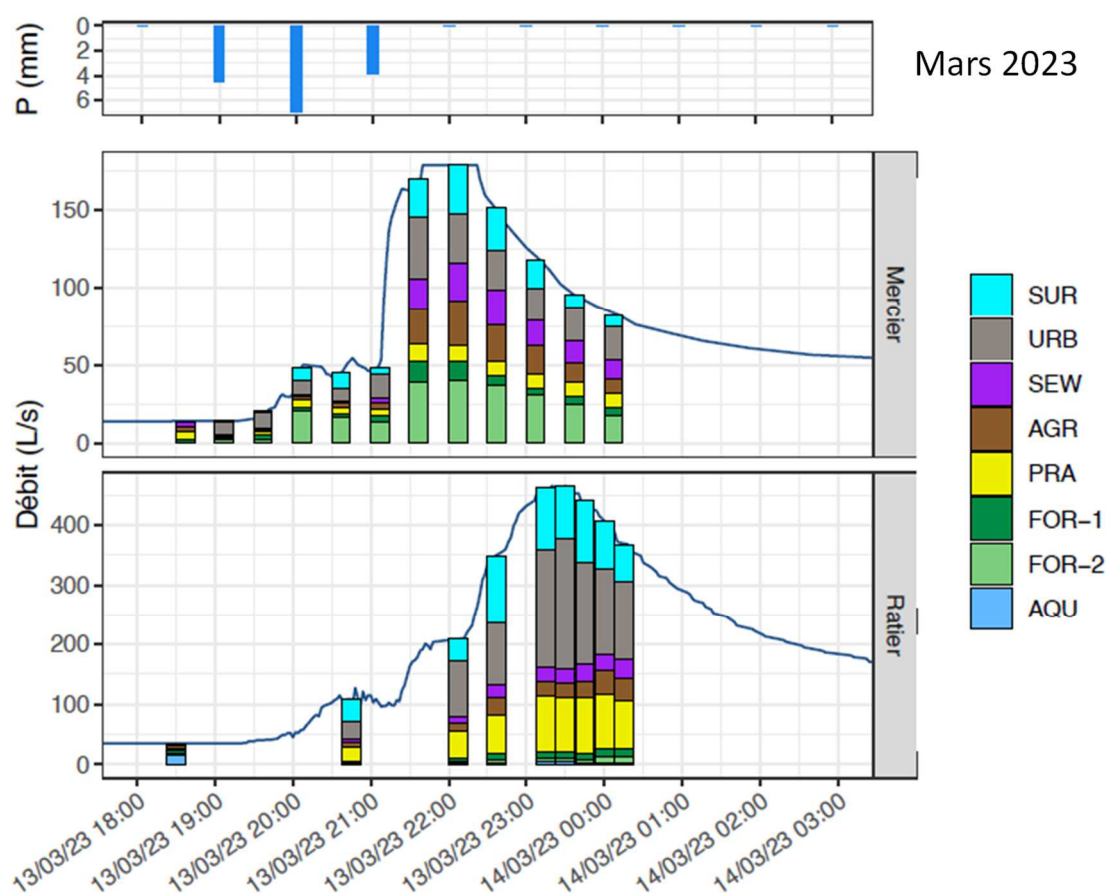


Figure 39 : Précipitations et résultats de décomposition du débit pour le petit évènement hivernal de mars 2023 aux stations du Mercier et du Ratier. Les résultats sont illustrés selon le débit total et en proportions relatives au débit total. La taille des barres correspond aux débits instantanés associés au prélèvement décomposé. SUR : Ruissellement de surface ; URB : Ruissellement urbain ; SEW : Réseau d'assainissement ; AGR : Agriculture ; PRA : Prairies ; FOR-1 et FOR-2 : Forêts ; AQU : Aquifère des colluvions. D'après Grandjouan (2024).

Les contributions du réseau d'assainissement au niveau de l'exutoire du Ratier diminuent dans un premier temps avec les premières pluies (de 13% à 4%). Elles augmentent ensuite avec le débit du cours d'eau suggérant des débordements du réseau en aval du bassin du Ratier. Étonnamment, les contributions du réseau d'assainissement pour le Mercier ne sont pas nulles et peuvent atteindre 25% du débit de la rivière. Il est important de noter que cette source a été définie comme l'eau du réseau



unitaire et est donc composée d'un mélange entre eau de ruissellement urbain et eaux usées domestiques. Ce résultat suggère qu'il existe des apports d'eau usées vers le cours d'eau sur le bassin du Mercier alors que celui-ci ne comporte ni rejet de station d'épuration, ni déversoir d'orage. Ces apports peuvent provenir des systèmes d'assainissement non collectifs, de fuites du réseau d'assainissement ou de mauvais raccordements. Ce résultat est confirmé par la présence du marqueur de contamination fécale humaine *HF183* mesuré lors de l'évènement et par les résultats de microbiologie réalisés dans l'étude de la cartographie spatiale de la qualité de l'eau (Cf. § III.4.2).

Les contributions associées aux surfaces agricoles sont globalement inférieures à 15% sur les deux bassins, avec des valeurs légèrement plus fortes pour le Mercier comparé au Ratier. Les contributions des prairies et des forêts sont différentes sur les deux bassins pour cet évènement : les forêts et prairies représentent environ 30% et 10% de l'origine des débits pour le Mercier, et environ 5% et 20% des débits pour le Ratier. Si une légère différence de l'occupation du sol entre Mercier et Ratier est observée pour la forêt (38% pour Mercier et 3% pour Ratier), peu de différence est observée pour la prairie avec environ 11% pour les deux bassins-versants. Ces occupations du sol ne peuvent expliquer cette inversion de contribution entre forêt et prairie dans les deux bassins versants.

En analysant les contributions obtenues sur les 6 évènements hydrologiques étudiés (Cf. Annexe 8), il est possible d'émettre des hypothèses sur le fonctionnement hydrologique global des bassins versants du Mercier et du Ratier. Les conclusions suivantes sont extraites de la thèse d'Olivier Grandjouan (2024), dans laquelle il est possible de retrouver tout le détail des résultats de décomposition des mélanges aux exutoires du Mercier et du Ratier, et leurs interprétations.

*« Par temps sec, les contributions sont relativement stables pour les forêts, les prairies et les surfaces agricoles. Le débit est particulièrement influencé par la contribution du réseau d'assainissement pour le Mercier, et par la contribution de l'aquifère des colluvions pour le Ratier. A l'échelle événementielle, les contributions suivent des tendances selon l'état hydrométéorologique du bassin. Pour les petits événements hivernaux, les contributions des forêts, des prairies et de l'agriculture sont majoritaires comparées aux ruissellements de surface et urbain. En période estivale, la contribution du ruissellement de surface est prédominante. Pour les événements majeurs, la contribution de l'agricole et des prairies est majoritaire. La contribution relative du réseau d'assainissement est faible mais représente des volumes considérables rejetés vers le cours d'eau.*

*Les sources échantillonnées apparaissent comme particulièrement influencées par l'occupation du sol qui les définissent. De manière générale, la composition biogéochimique des sources ne montre que peu de variabilité par rapport aux conditions hydrométéorologiques du bassin versant. Les empreintes biogéochimiques de ces sources sont donc stables dans le temps et indépendantes de la localisation des réserves en eau selon les périodes (gneiss fracturés ou horizon de saprolite). En revanche, la composition du mélange des eaux par temps sec et pendant les événements pluvieux montre de fortes variabilités selon les conditions hydrométéorologiques (e.g. basses eaux, hautes eaux, hiver, été) qui s'expliquent par des contributions variables pour les sources identifiées.*

*Le ruissellement de surface n'a pas pu être échantillonné sur le terrain. Cependant, l'approche d'identification des sources et les résultats du modèle de mélange ont montré la prédominance de cette source pour certains événements. »*

Enfin, les résultats des décompositions ont montré clairement une contamination des eaux du Mercier par des apports du réseau d'assainissement. Ce résultat est surprenant car le bassin versant du Mercier a été choisi initialement comme un bassin rural peu urbanisé. Des analyses complémentaires, comme

des pathogènes du marqueur de contamination fécale humaine (Cf. § III.4.2 et Chapitre V) ou des micropolluants organiques de type pharmaceutique (non présenté dans cette étude) confirment ces apports.

#### IV.5.2. Décomposition des mélanges à l'exutoire du bassin de la Claduègne

Ces sources sont utilisées pour créer les modèles de mélange expliquant les 5 événements de crues échantillonnés à l'exutoire de la Claduègne. Un premier test a été effectué sur l'évènement du 02/11/2022 (Figure 40), en utilisant les 36 traceurs sélectionnés a priori (Cf. Tableau 7).

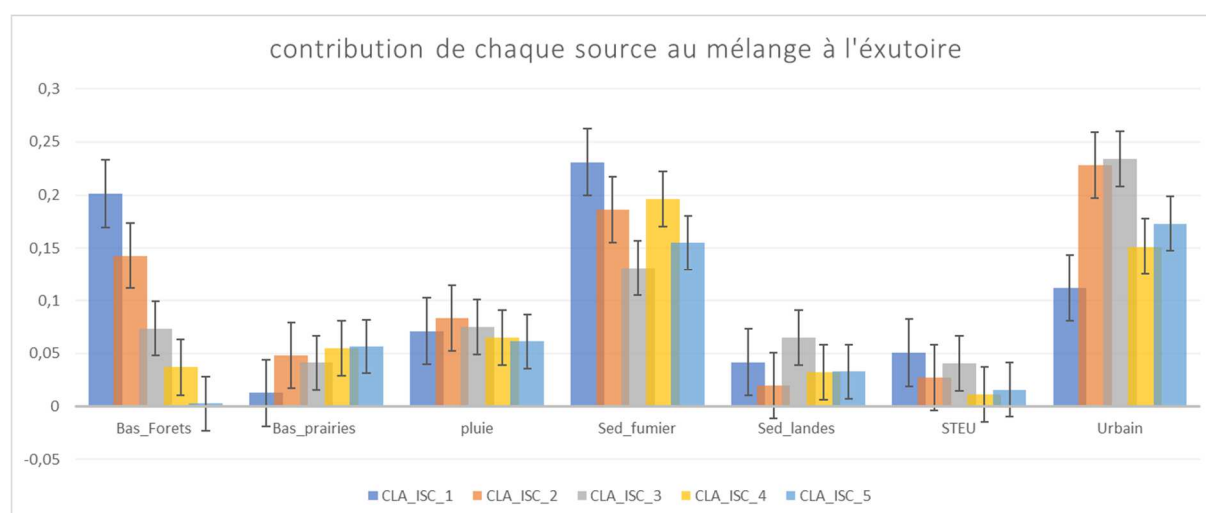


Figure 40 : Contribution des sources définies pour la Claduègne au mélange à l'exutoire du bassin lors d'un évènement pluvieux prélevé le 02/11/2022 (5 échantillons prélevés le long de l'évènement et identifiés CLA\_ISC1 à CLA\_ISC5).

Lorsque l'on regarde la proportion des eaux de chaque type de source (Cf. § IV.4.4), on voit une contribution élevée des eaux de la source urbaine (26 %), et de la source Sed-fumier (26 %). La contribution des eaux du groupe Bas-forêt-prairie diminue au fil des heures (20 % ; 15 % ; 7 % ; 3 % et 0 %). La source Bas-prairies augmente légèrement. La source pluie ne montre pas de grosses variations. Les contributions des eaux des sources Sed-landes et STEU ne sont pas élevées (environ 4 %). Globalement, la contribution des eaux des sources avec des espaces plus imperméables (Sed-fumier ; Urbain) liées aux activités humaines (i.e. urbanisation, agriculture intensive) est plus importante ; et la contribution des eaux des sources des espaces plus naturels (Bas-forets ; Bas-prairie ; et Sed-landes) est moins importante. Des limites restent associées à ces premiers résultats car le pôle « pluie » utilisé ne paraît pas adapté. La faible contribution du pôle pluie obtenue dans les 5 échantillons provient probablement du fait que la signature de l'eau de pluie est très différente de celle des eaux de ruissellement de surface (e.g. concentrations en métaux trop faibles).

En conclusion, les différences de signature entre les types de sources permettent de bien de tracer l'origine des eaux à l'exutoire du bassin de la Claduègne. A ce stade du projet, toutes les données de source ou de mélange sur la Claduègne n'ont pas été entièrement validées. C'est pourquoi une seule décomposition de mélange a été réalisée. Il conviendra d'appliquer la même méthodologie pour estimer les contributions des sources pour les 6 autres évènements prélevés. L'interprétation de l'ensemble des résultats (décomposition des mélanges) permettra non seulement de mieux comprendre le fonctionnement hydrologique du bassin mais aussi d'évaluer la pertinence du modèle de mélange pour la Claduègne.

## V. Contamination bactérienne sur les bassins versants

### V.1. Bactéries pathogènes des sous-bassins versants homogènes et sources ponctuelles sur le Ratier

Les marqueurs ADN des bactéries pathogènes *A. caviae* et *P. aeruginosa* ont été détectés dans tous les types d'échantillons prélevés sur le bassin versant du Ratier, excepté *A. caviae* dans les sous-bassins versants homogènes de type forêt (Tableau 8). Les ADN *A. caviae* ont été détectés plus fréquemment dans les sous-bassins versants impactés par l'urbain que ceux des catégories avec de forts pourcentages d'occupation du sol en forêt, grande culture ou impactés par des élevages (Tableau 1). A contrario, il n'y avait pas de différence significative de détection des ADN *P. aeruginosa* en fonction des sources (33% pour les catégories avec forte occurrence de forêt, 29% avec catégories montrant des grandes cultures ou zones d'élevage, et 53% avec celles montrant une connexion avec le développement urbain). Les quantités normalisées moyennes d'ADN indicateurs *A. caviae* étaient généralement plus élevées que ceux de *P. aeruginosa* dans les sources ponctuelles (RES, PLR), et moins élevées que les ADN indicateurs de *P. aeruginosa* dans les sous-bassins versants des groupes ci-dessus (Tableau 8). Deux des trois marqueurs génétiques de virulence et d'antibio-résistance ont été détectés dans tous les types d'échantillon.

Tableau 8 : Quantités normalisées moyennes et écarts-types des marqueurs ADN suivis dans les échantillons d'eaux du bassin versant du Ratier-Mercier, regroupés par catégorie de sources (cf. Tableau 1)

Marqueur ADN suivi		Catégorie majoritaire du sous-bassin versant						Sources ponctuelles			
Type	qPCR	Agricole (n=11)		Forêt (n=9)		Urbain (n=9)		Ruissellement (n=4)		Eau usées (n=4)	
		Moyenne	Ecart-type	Moyenne	Ecart-type	Moyenne	Ecart-type	Moyenne	Ecart-type	Moyenne	Ecart-type
Pathogènes	Paer	1.58E-06	5.25E-06	6.51E-06	1.79E-05	3.00E-05	6.14E-05	2.69E-07	5.14E-07	1.95E-06	3.63E-06
	Acav	2.99E-07	9.92E-07	0.00E+00	0.00E+00	5.51E-06	1.33E-05	1.25E-03	2.49E-03	4.94E-04	8.30E-04
Virulence & Antibio-résistance	int1	5.98E-07	1.34E-06	2.03E-04	4.62E-04	1.26E-05	2.40E-05	8.30E-05	1.55E-04	1.00E-05	1.19E-05
	int2	6.50E-09	2.12E-08	3.53E-05	1.06E-04	5.10E-08	1.49E-07	1.11E-05	2.12E-05	6.73E-05	7.70E-05
	int3	nd	NA	nd	NA	nd	NA	nd	NA	nd	NA
Contamination fécale	Cheval	0.00E+00	0.00E+00	0.00E+00	0.00E+00	9.20E-07	2.24E-06	0.00E+00	0.00E+00	2.44E-09	4.88E-09
	Chien	nd	NA	nd	NA	nd	NA	nd	NA	nd	NA
	Eaux usées	9.75E-08	3.23E-07	3.48E-09	1.04E-08	4.83E-05	8.79E-05	1.62E-04	2.44E-04	9.50E-04	1.03E-03
	Humaine	1.85E-08	6.12E-08	0.00E+00	0.00E+00	9.03E-05	1.84E-04	9.77E-07	9.13E-07	5.71E-04	8.47E-04
	Indéfinie	3.89E-03	3.43E-03	4.76E-04	6.02E-04	8.14E-03	9.09E-03	1.11E-03	8.45E-04	2.44E-02	1.02E-02
	Porc	0.00E+00	0.00E+00	0.00E+00	0.00E+00	0.00E+00	0.00E+00	0.00E+00	0.00E+00	0.00E+00	0.00E+00
	Poulet/canard	0.00E+00	0.00E+00	0.00E+00	0.00E+00	1.68E-06	2.81E-06	0.00E+00	0.00E+00	7.54E-06	8.36E-06
	Rat musqué	nd	NA	nd	NA	nd	NA	nd	NA	nd	NA
	Ruminants	9.64E-05	3.20E-04	0.00E+00	0.00E+00	0.00E+00	0.00E+00	0.00E+00	0.00E+00	3.25E-06	6.17E-06
	Vache	1.21E-05	4.01E-05	0.00E+00	0.00E+00	0.00E+00	0.00E+00	0.00E+00	0.00E+00	8.40E-11	1.68E-10

Normalisation des quantités de marqueur : ratio du nombre de copies par 100 mL du marqueur sur le nombre de copies par 100 mL de bactéries totales. Nd : non déterminé (trop de points de mesure manquants).

L'ADN indicateur d'occurrence de *Bacteroidales* (AllBac) a été détectée dans 100% des échantillons, et il n'y avait pas de différence significative de détection et de quantification entre les sources des sous-bassins versants homogènes. Cette forte prévalence a permis de valider l'utilisation de cribles qPCR basés sur le suivi d'espèces de *Bacteroides* et *Prevotella* appartenant aux *Bacteroidales*, et ayant des répartitions restreintes en termes de colonisation du tractus animal. Parmi les marqueurs ADN de source de la contamination fécale, seuls les marqueurs réseau-EU (sewer), humain (HF183), ruminants et poulet/canard ont montré des différences significatives de détection entre les grandes catégories de sous-bassins versants. Les marqueurs réseau-EU et poulet/canard étaient plus abondants dans les sous-bassins versants sans surface forestière (COR, GAR, PNC, REV, VRN), mais moins abondants dans ceux ne comportant aucune surface urbanisée (PNC, REV, VRN). Il y avait trop de données manquantes

pour étudier la distribution des marqueurs *int3*, et celles des marqueurs de contamination fécale du chien ou rat. Ces données n'ont donc pas été analysées dans la suite de cette étude.

L'ACP a permis de mettre en évidence que le taux de prévalence du marqueur ADN *A. caviae* était fortement corrélée à ceux des marqueurs *int1*, *int2*, et *int3* (navettes génétiques de gènes de résistance aux antibiotiques), et dans une moindre mesure à ceux indiquant des contaminations fécales émises par les ruminants (Figure 41). Cet ensemble qPCR (Acav, *int1*, *int2*, et *int3*, MST ruminants) est relié préférentiellement aux échantillons d'eaux usées (RES), d'eaux de ruissellement (PLR et PLU), et à certains échantillons du sous-bassins GAR (cf. Tableau 1 pour les points de prélèvement). La prévalence et la quantité d'ADN indicateurs *P. aeruginosa* ne sont pas corrélées aux autres marqueurs (Figure 41). Toutefois, les prévalences qPCR de contaminations fécales d'origine humaine et d'eaux usées étaient fortement corrélées entre elles, et à celles estimées pour les contaminations venant de poulets/canards et chevaux, et étaient préférentiellement associées aux échantillons des sous-bassins COR et GAR (Figure 41). Dans ce dernier cas, la covariance entre ces taux de prévalence des contaminations fécales entre sources pourrait s'expliquer par la proximité entre les prés, manèges et étables (cheval) et les zones résidentielles (humain, eaux usées), et le fait que certains habitants maintiennent un poulailler domestique (poulet). Par ailleurs, un gradient eaux usées, ruissellement-urbain, et agricole-forêt le long de l'axe PC1 de la PCA a été observé (Figure 41).

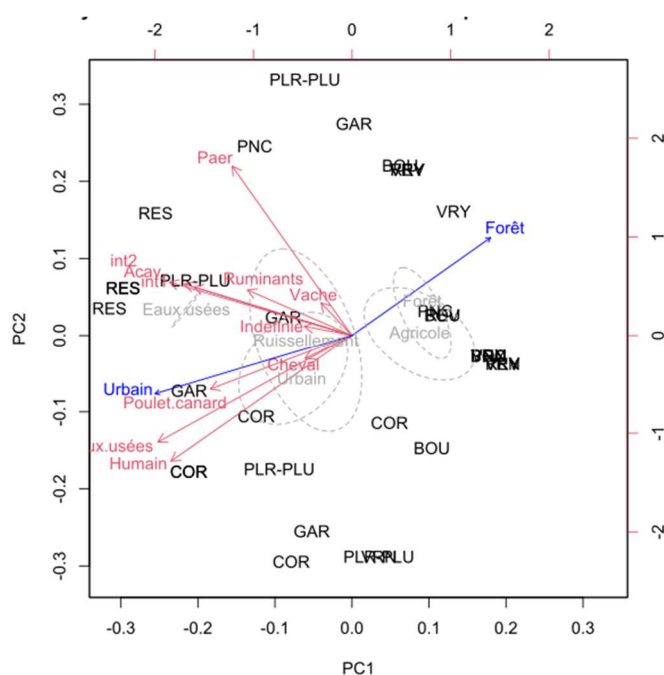


Figure 41 : ACP des taux de prévalence (présence/absence) des qPCR d'ADN indicateurs MST et pathogènes au regard des descripteurs dominants pour les sous-bassins ou points échantillonnés (Tableau 1). La longueur de la flèche rouge est proportionnelle au taux de prévalence. Des relations significatives ont été détectées entre ordinations des taux de prévalence et les % relatifs des points échantillonnés en termes de surface de forêt et de zone urbaine.

La significativité des relations entre données qPCR MST et / ou pathogènes et les points de prélèvement analysés, dont l'association avec certains descripteurs dominants des sous-bassins versants présentés dans le Tableau 1, a été calculée par l'approche « indiciespecies » (cf. Pozzi et al. 2024). Des valeurs indicatrices de la spécificité d'association avec des marqueurs ADN bactériens ont été calculées pour chacune des catégories dominantes des sous-bassins versants et les sources

ponctuelles (Tableau 9). Les marqueurs de contamination fécale d'origine ruminant et vache montrent une très forte spécificité dans leur distribution pour les sous-bassins versants agricoles (PNC, REV, VRN ; 84 à 100%), mais une sensibilité faible (<10% des échantillons) (i.e., certains échantillons ont des PCR inférieurs aux seuils de quantification), induisant une absence de significativité statistique (Tableau 9). Le crible qPCR *P. aeruginosa* et le marqueur *int1* sont significativement associés aux sites dominés par un couvert forestier. Il est mentionné dans la littérature que *P. aeruginosa* peut infecter certaines plantes comme les tomates en serre hydroponique, mais aucune donnée de terrain référence des infections végétales en milieux naturels. Ces résultats concernant la distribution de *P. aeruginosa* nous orientent désormais vers des enrichissements en *P. aeruginosa* induits par les végétaux. Cependant, les végétaux concernés ne sont pas connus, et nécessiteront des études de la diversité végétale présente dans les zones de forêt dans le bassin versant étudié. Il est à noter que *P. aeruginosa* fait l'objet d'une surveillance en fonction de sa virulence et multi-résistance voire toto-résistance aux antibiotiques (OMS ; voir bactéries ESKAPE sous surveillance).

Les marqueurs de contamination pour les émissions venant des chevaux et poulets/canards ont été retrouvées dans les sous-bassins versants avec activités urbaines significatives (GAR, COR) (Tableau 9). Le marqueur cheval a été trouvé comme prévalent uniquement sur ces sites (94% des détections marqueur cheval liée à cette catégorie mais faible sensibilité du crible car réponse positive uniquement dans 22% des cas (ce qui explique la faible p-value). Comme discuté plus haut, cela peut être expliqué par la proximité du point GAR avec des habitations et routes. Ceci est conforté par une détection élevée des marqueurs « humain » et réseau-EU dans les échantillons impactés par l'urbain, dont ceux de GAR, avec une sensibilité à environ 80% (ce qui indique que 80% des prélèvements avec impact urbain étaient positifs pour ces marqueurs). Le point COR est positionné en plein cœur d'une zone urbaine résidentielle avec une voie privée et de nombreuses habitations. Le tableau 9 montre clairement que le ruissellement urbain est associé à une dispersion de marqueurs d'une contamination par les réseaux d'eaux usées. Il semble donc probable que COR subit une contamination par le réseau d'eaux usées. Le pathogène *A. caviae* a été également relié aux eaux de ruissellement, et a été trouvé sur les sites impactés par l'urbain dans 33% des prélèvements. Pour *A. caviae*, cela confirme des travaux précédents réalisés sur un bassin versant adjacent nommé la Chaudanne. La relation entre qPCR eaux usées et eaux de ruissellement est toutefois surprenante, sauf à considérer que des débordements de réseau unitaire peuvent se produire sur les chaussées. Les marqueurs de contamination fécale d'origine humaine, eaux usées, et canard/poulet ont tous été identifiés comme indicateurs de contamination par des eaux usées provenant du réseau unitaire.



Tableau 9 : Spécificité (A) des distributions des marqueurs ADN bactériens en fonction des catégories majoritaires d'occupation du sol des sous-bassins versants pour les points de prélèvement, et évaluation de la sensibilité (B) sur un ensemble de points de prélèvement (selon Tableau 8). Rouge = données prédictives de qualité.

Marqueur ADN suivi		Catégorie majoritaire du sous-bassin versant									Sources ponctuelles						toutes
Type	qPCR	Agricole			Forêt			Urbain			Ruissellement			Eaux usées			catégories
		A1	B	Sig.	A2	B	Sig.	A3	B	Sig.	A4	B	Sig.	A5	B	Sig.	A
Pathogènes	Paer	0.05	0.18	ns	0.47	0.44	*	0.35	0.33	ns	0.06	0.50	ns	0.06	1.00	ns	1.00
	Acav	0.01	0.09	ns	0.00	0.00	ns	0.06	0.33	ns	0.63	0.50	#	0.30	1.00	ns	1.00
Virulence & Antibio-résistance	int1	0.01	0.18	ns	0.47	0.33	#	0.08	0.89	ns	0.42	0.75	ns	0.03	1.00	ns	1.00
	int2	0.00	0.18	ns	0.44	0.11	ns	0.00	0.67	ns	0.37	0.75	ns	0.18	1.00	ns	1.00
Contamination fécale	Cheval	0.00	0.00	ns	0.00	0.00	ns	0.94	0.22	#	0.00	0.00	ns	0.06	0.25	ns	1.00
	Eaux usées	0.00	0.18	ns	0.00	0.11	ns	0.17	0.78	ns	0.45	0.75	*	0.38	1.00	#	1.00
	Humain	0.01	0.09	ns	0.00	0.00	ns	0.33	0.78	ns	0.08	0.75	ns	0.59	1.00	**	1.00
	Indéfinie	0.21	0.82	ns	0.15	0.89	ns	0.25	1.00	*	0.15	1.00	ns	0.24	1.00	ns	1.00
	Poulet/Canard	0.00	0.00	ns	0.00	0.00	ns	0.40	0.56	#	0.00	0.00	ns	0.60	0.75	*	1.00
	Ruminants	0.84	0.09	ns	0.00	0.00	ns	0.00	0.00	ns	0.00	0.00	ns	0.16	1.00	ns	1.00
	Vache	1.00	0.09	ns	0.00	0.00	ns	0.00	0.00	ns	0.00	0.00	ns	0.00	0.25	ns	1.00

Valeurs indicatrices après analyse Indicspecies (Pozzi et al. 2024). A : spécificité = probabilité qu'un échantillon d'eau contenant le marqueur qPCR MST ou patho indiqué soit indicateur d'une émission (*spillover*) en lien avec la catégorie dominante indiquée. B : sensibilité = probabilité qu'un échantillon d'eau d'une catégorie dominante contienne le marqueur ADN. Sig. : significativité statistique prenant en compte la spécificité et sensibilité du marqueur ADN ("\*\*\*", p-value<0.001; "\*\*", p-value<0.01; "\*", p-value<0.05; "#", p-value<0.1).

## V.2. Bassin versant de la Claduègne - données qPCR MST

### ➤ Bactéries totales par qPCR

Les résultats de la quantification des bactéries totales (Log du nombre de copies 16S rDNA/ 100 mL d'échantillon) par qPCR sur le bassin versant de la Claduègne sont présentés Figure 42.

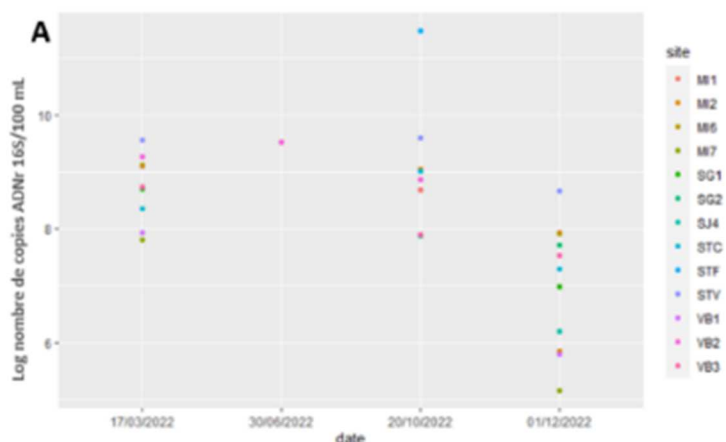


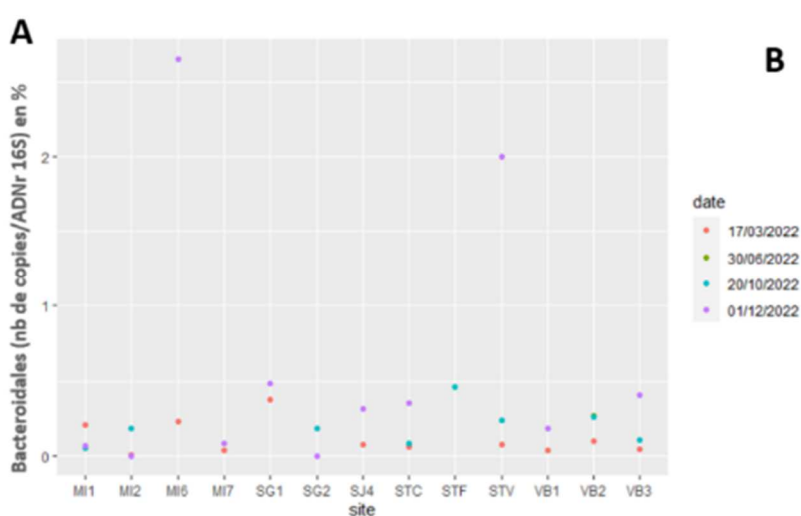
Figure 42 : Quantification du nombre de copies du gène de l'ARNr 16S dans les eaux de surface du bassin versant de la Claduègne par point de prélèvement en fonction des dates d'échantillonnage.

Les quantités du marqueur ADN (16S rDNA) permettant de dénombrer les bactéries totales retrouvées sur le bassin de la Claduègne est plutôt homogène entre les points de prélèvement, à l'exception du point STF qui contenait plus de 11 Log copies du 16S rDNA par 100 mL. Entre le 17/3/2022 et le 20/10/2022, les résultats étaient plutôt homogènes (entre  $10^8$  et plus de  $10^9$  copies du gène l'ARNr 16S).

➤ **Dénombrement des Bacteroidales totales et marqueurs des sources animales émettrices de contamination d'origine fécale (MST)**

Les résultats de la quantification des bactéries de l'ordre des *Bacteroidales* par qPCR sur le bassin de la Claduègne sont présentés Figure 43.

Les dénombrements sont exprimés en ratio du nbr de copies du marqueur/nbr de copie du gène de l'ARNr 16S (en %).



*Figure 43 : Quantification relative des Bacteroidales totales (ratio nbr de copie du marqueur/nbr de copie de l'ARNr 16S en %) retrouvées A) Dans les eaux de surface du bassin de la Claduègne, par point de prélèvement en fonction des dates d'échantillonnage*

Ces résultats suggèrent au minimum une contamination fécale d'origine animale sur ce bassin versant (Figure 43). En comparaison, lors de la campagne de mars 2023 sur le bassin du Ratier, ce marqueur était présent dans 30% des échantillons. Pour expliquer cette différence importante entre les deux bassins versants, les marqueurs MST ont été recherchés et permis d'inférer certaines sources animales et humaines (Figure 46).

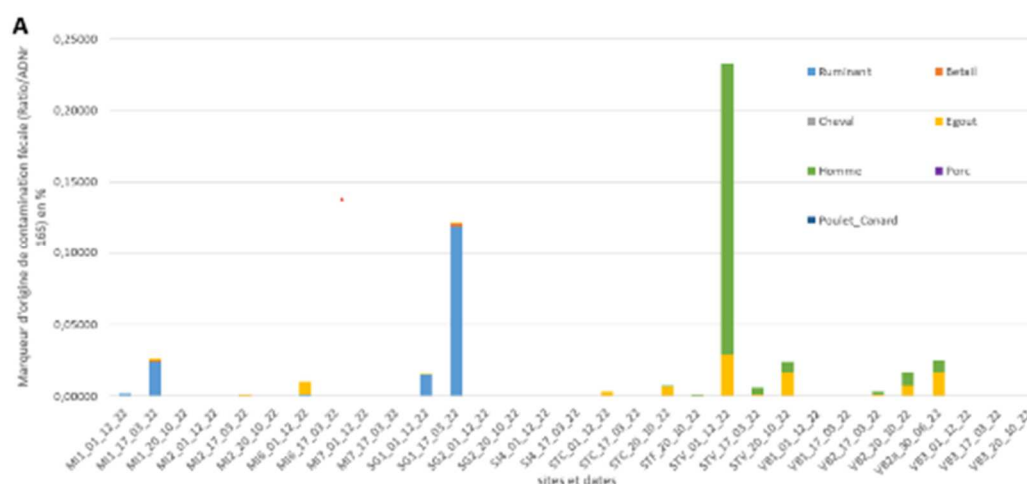


Figure 44 : Proportion des marqueurs de la contamination d'origine fécale étudiés (humain, ruminant, bovin, porc, réseaux-EU (égout), cheval et poulet/canard) retrouvés dans les eaux de surface du bassin de la Claduègne par point de prélèvement et dates d'échantillonnage. Les résultats sont exprimés en ratio du nbr de copies du MST/nbr de copies du gène de l'ARNr 16S puis en %.

Plusieurs marqueurs MST permettent d'expliquer les taux de *Bacteroidales* totales avec la prévalence la plus élevée pour l'espèce de *Bacteroides* indicatrice de surverse du réseau d'eaux usées. Ce marqueur qPCR « réseau-EU » a été retrouvé sur les points urbains et touristiques (STV, STC et VB2) (Tableau 2). De plus, il a été retrouvé associé au marqueur humain (HF183) qui présente un maximum d'occurrences pour le point STV (hôpital) en décembre 2022 (Figure 44). Le marqueur réseau-EU est également retrouvé aux points MI1,2,6 et SG1, alors que seul MI2 est considéré comme impacté des activités urbaines. Ces occurrences en milieu rural suggèrent des surverses du réseau en plusieurs points, en période de crue, au sein du bassin de la Claduègne. Le marqueur qPCR ruminant est retrouvé aux points MI1 et SG1 (pâturages) (Tableau 2) en décembre et mars 2022 avec une plus forte occurrence en mars. Le marqueur qPCR bovin confirme cette tendance (Figure 44). Les marqueurs spécifiques poulet/canard, du cheval et du porc n'ont pas été retrouvés dans les prélèvements du bassin de la Claduègne. Il y a un élevage de porcs (dans le sous-bassin du Gazel) et plusieurs poulaillers dans le bassin versant, mais la connectivité hydrologique de ces parties du bassin versant est limitée aux événements de crue. Pour conclure sur l'impact global de ces élevages sur la qualité de l'eau, il faudrait analyser plusieurs événements de crue.

## Conclusions et perspectives

---

Une approche de recherche originale, combinant géographie, enquêtes, mesures chimiques et microbiologie, et hydrologie, a été développée et mise en œuvre avec succès sur deux bassins versants d'usage mixte : le Ratier (sous bassin de l'Yzeron) et la Claduègne. Le projet IDESOC a tout d'abord permis de mettre en place des méthodologies d'enquête et de cartographie sur ces deux bassins versants contrastés. Des premières cartographies fines de l'occupation du sol sont disponibles pour ces deux bassins versants pour l'année 2020. Cette méthodologie d'analyse spatiale, combinée à des observations sur le terrain, a permis d'identifier les sources potentielles de contaminants et leur localisation. En parallèle, nous avons réalisé des cartographies spatiales de la qualité de l'eau, en développant des paramètres low-cost (indicateurs de la matière organique dissoute par mesure en spectrophotométrie UV-visible et paramètres microbiens par diagnostic ADN qPCR). L'interprétation des données des deux cartographies réalisées sur le Ratier et de la cartographie sur la Claduègne est en cours. Les premiers résultats sur le Ratier suggèrent que la qualité physico-chimique de l'eau est différente entre les sous-bassins de tête de bassin, et les eaux du Ratier et du Mercier. Des différences de pH, de conductivité ainsi que de qualité de MOD sont observées entre parties amonts forestières et zones rurales au milieu du bassin. Les résultats qPCR indiquent une forte contamination sur le sous-bassin du Mercier par des contaminations fécales d'origine humaine et de ruminants. Les origines probables sont des fuites du réseau unitaire ou des rejets ou fuites des systèmes d'assainissement non collectif. L'interprétation de toutes ces données se poursuit dans le projet ANR CHYPSTER (en particulier l'analyse conjointe des données de physico-chimie, de MOD et de microbiologie, et les liens entre ces données et les occupations et usages des sols à proximité des points de prélèvement).

Pour chacun des bassins versants étudié, nous avons ensuite défini une dizaine de points de prélèvement des « sources », représentatifs des principaux types de sources de pollution pouvant être rencontrés sur ces bassins et qui influencent la qualité des eaux le long des cours d'eau et aux exutoires des bassins versants. Pour les sources diffuses, nous avons développé une méthodologie originale croisant les données cartographiques (géologie, occupation du sol et enquêtes) et les visites de terrain, afin de définir des sous-bassins versants homogènes. Plusieurs sources ponctuelles dans les cours d'eau ont également été identifiées, telles que les rejets directs d'eaux issues de stations d'épuration et du ruissellement urbain.

Des travaux spécifiques conduits dans le projet IDESOC ont permis de montrer que l'hypothèse de base pour l'échantillonnage des sources – eaux versus sols – était pertinente. Nous avons montré que les eaux qui drainent les sols de sous-bassins versants homogènes et les eaux à l'exutoire de ces sous-bassins sont fortement influencées par l'occupation du sol. La nature de la MOD, au travers de descripteurs comme les indicateurs UV-visibles, semble être un bon traceur de l'occupation du sol (en complément des traceurs plus classiques comme les ions majeurs et les métaux). Surtout, cette étude montre clairement qu'il est possible d'associer la signature biogéochimique de l'eau drainant un sous-bassin versant homogène à ses caractéristiques générales, et en particulier l'occupation du sol.

L'échantillonnage des sources au cours de plusieurs saisons (10 sur le Ratier, 13 sur la Claduègne) d'une part, et des événements (mélanges) aux exutoires des bassins versants (6 événements pluvieux sur le Ratier et 7 sur la Claduègne) d'autre part, a permis de constituer une base de données complète sur la qualité des eaux (concentrations en ions majeurs, métaux, indicateurs UV-visibles caractéristiques de la matière organique dissoute et les indicateurs microbiens). Ce jeu de données sera rendu public sur une plateforme ouverte ([data.gouv.fr](https://data.gouv.fr)). Cet ensemble de données a permis de proposer et tester une

méthodologie de décomposition de l'écoulement de l'eau aux exutoires des bassins versants, c'est-à-dire estimer les contributions des sources identifiées précédemment. Nous avons, tout d'abord, défini des empreintes biogéochimiques (ou signatures) spécifiques des différentes sources sur chaque bassin étudié.

Pour les deux bassins versants étudiés (Ratier et Claduègne), les eaux de ruissellement urbain et les eaux de STEU ont des signatures distinctes des sources diffuses rurales. La géologie joue un rôle primordial dans les signatures des eaux. Pour le Ratier, les eaux provenant des colluvions ont leur signature propre ; pour la Claduègne, les basaltes et les roches sédimentaires sont clairement différenciés. Des différences entre les deux bassins sont observées concernant le regroupement des sources diffuses. Pour le Ratier, il est possible de distinguer des différences nettes entre les signatures des eaux provenant des forêts des zones agricoles et des prairies sans pâturage ; pour la Claduègne, ces distinctions sont moins nettes et associées à la géologie. Ceci provient sans doute du fait que les occupations et usages du sol des sous-bassins échantillonnés sur le Ratier sont plus homogènes que ceux des sous-bassins de la Claduègne. Pour la Claduègne, il est difficile de remonter dans les têtes de bassins pour avoir des sous-bassins homogènes et d'avoir des écoulements significatifs permettant un échantillonnage représentatif.

Des tests de mélanges numériques et en laboratoire ont permis de valider le modèle de mélange en prenant exemple sur le bassin du Ratier. Puis, nous avons appliqué ces modèles de mélange sur plusieurs événements hydrologiques afin de décomposer les mélanges aux exutoires. Les différences de signature entre les types de sources permettent de tracer l'origine des eaux à l'exutoire des deux bassins versants étudiés. Ainsi, les résultats des décompositions ont montré clairement une contamination des eaux du Mercier par des apports du réseau d'assainissement. Ce résultat est surprenant car le bassin versant du Mercier a été choisi initialement comme un bassin rural peu urbanisé. Les analyses des pathogènes du marqueur de contamination fécale humaine confirment bien ces apports. L'interprétation de l'ensemble des résultats (décomposition des mélanges) pour la Claduègne permettra non seulement de mieux comprendre le fonctionnement hydrologique du bassin mais aussi d'évaluer la pertinence du modèle de mélange.

Dans la continuité des travaux menés dans le projet IDESOC, dans le cadre du projet ANR CHYPSTER (octobre 2021-2025), une prospective paysagère, hydrologique et climatique se monte sur les deux bassins versants afin de prédire la qualité future de leur eau. Pour le premier volet paysager, les modes d'occupation du sol passés ont été retracés et ont servi de base à la discussion lors des entretiens avec les acteurs des territoires. Ces échanges ont permis d'avoir plusieurs représentations de leurs paysages à l'horizon 2050, et ont abouti à trois scénarios sur le bassin versant du Ratier qui seront traduits sous forme de cartographies d'occupation du sol.

Nous avons commencé à faire une mise à jour de la base de données par l'intermédiaire d'un complément d'enquêtes sur le terrain en 2023. Egalement, nous allons réitérer le processus de cartographie par télédétection pour les années suivantes (2021 et 2022), afin d'évaluer l'évolution inter-annuelle des surfaces agricoles et permettre d'ajuster les erreurs de classification par l'identification de successions improbables. Enfin, nous souhaitons améliorer et renforcer la production des cartes de pollution potentielles en ajustant les indices initialement identifiés.



## Bibliographie

---

Baduel, M. (2022). Etablissement d'un modèle de mélange d'eau permettant de calculer la contribution de sous-bassins homogène à l'exutoire. Mémoire de Master, Université Paris-Est Créteil, RiverLy-INRAE. 45 pp. <https://hal.inrae.fr/hal-04605479v1>

Betemps, M. (2021). Diagnostic de l'occupation du sol et de l'utilisation des produits chimiques sur le bassin versant de l'Yzeron (Rhône) : utilisation combinée d'enquêtes et de données cartographiques pour identifier les sources de contaminants et leur localisation. Rapport de stage, Université de Toulouse/Polytech Tours, Cermosen/Pacte/UGA/IGE, 55 pp.

Bolan N.S., Adriano D.C., Kunhikrishnan A., James T., McDowell R., Senesi N. (2011). Chapter One - Dissolved Organic Matter: Biogeochemistry, Dynamics, and Environmental Significance in Soils. In Sparks, D.L. (Éd.). Academic Press.

Bonneau J., Brange, F., Castebrunet H., Lipeme-Kouyi G. (2022). Modélisation de scénarios de gestion des eaux pluviales à la source face aux changements globaux. Projet Conscéquans, rapport final. [hal-03993757](https://hal.archives-ouvertes.fr/hal-03993757)

Boukra A. (2023). Caractérisation intégrée de la matière organique dissoute : recherche d'empreintes physico-chimiques pour tracer les sources de pollutions anthropiques. Thèse de doctorat, Université Lyon 1, 337 pp. <https://theses.hal.science/tel-04584694>

Boukra A., M. Masson, C. Brosse, M. Sourzac, E. Parlanti, C. Miège (2023). Sampling terrigenous diffuse sources in watercourse: Influence of land use and hydrological conditions on dissolved organic matter characteristics. *Science of the Total Environment*, 872, 162104. [http://dx.doi.org/10.1016/j.scitotenv.2023.162104](https://dx.doi.org/10.1016/j.scitotenv.2023.162104)

Branger F., S. Kermadi, C. Jacqueminet, K. Michel, M. Labbas, P. Krause, S. Kralisch, I. Braud (2013). Assessment of the influence of land use data on the water balance components of a peri-urban catchment using a distributed modelling approach. *Journal of Hydrology*, 505, 312-325.

Chtiba O. (2023). Caractérisation des sources de contaminants dans un bassin versant à usage mixte (agricole, urbain) (Claduègne, Ardèche). Rapport de stage du Master 2 Sciences de l'eau parcours Contaminants Eau et Santé. Université de Montpellier.

Dembélé A., Becouze-Lareure C., Bertrand-Krajewski J.-L., Barillon B., Coquery M., Cren-Olivé C. (2008). Prototype de collecte des retombées atmosphériques sèches et humides : description du dispositif, mode de fonctionnement et premiers résultats pour les métaux dissous. 3<sup>e</sup> *Journées Doctorales en Hydrologie Urbaine (JDHU 2008)*, Oct 2008, Nancy, France. pp.95-102. <https://hal.science/hal-00510201>

DREAL – Délégation de bassin (2017). Classement en zone de répartition des eaux. Quels critères et quelles conséquences ? 8 pp. (document consulté sur ce site : <https://www.rhone-mediterranee.eaufrance.fr/gestion-de-leau/gestion-quantitative-de-la-ressource-en-eau/les-zones-de-repartition-des-eaux-zre>)

Elzear L. (2023). Caractérisation des sources potentielles de contaminants dans un bassin-versant à usage multiple : cas de la Claduègne (Ardèche). Rapport de stage du Master Agroécologie : Agrosociétés, Environnement, Territoire, Paysage, Forêt. Université de Dijon.

Grandjouan O. (2024). Apports de la biogéochimie pour l'évaluation d'un modèle hydrologique distribué en milieu péri-urbain. Thèse de doctorat, Université Lyon 1, 331 pp.

Hachgenei N. (2022). Transfert d'eau et de résidus pharmaceutiques vétérinaires dans un bassin versant agricole de méso-échelle soumis à des crues éclair. Thèse de doctorat, Université Grenoble Alpes, 262 pp.

Jacqueminet C., Kermadi S., Michel K., Béal D., Gagnage M., Branger F., Jankowsky S., Braud I. (2013). Land cover mapping using aerial and VHR satellite images for distributed hydrological modelling of periurban catchments: Application to the Yzeron catchment (Lyon, France). *Journal of Hydrology*, 485, 68-83.

Josse J. (2021). Identification et cartographie des sources potentielles de pollutions diffuses en milieu agricole : utilisation combinée d'enquêtes de terrain et série temporelle d'images Sentinel-2. Rapport de stage, Université de Strasbourg, 75 pp.

Kalbitz K., Schmerwitz J., Schwesig D., Matzner E. (2003). Biodegradation of soil-derived dissolved organic matter as related to its properties. *Geoderma*, 113, 273-291. [https://doi.org/10.1016/S0016-7061\(02\)00365-8](https://doi.org/10.1016/S0016-7061(02)00365-8)

Labbas M. (2015). Modélisation hydrologique de bassins versants périurbains et influence de l'occupation du sol et de la gestion des eaux pluviales. Application au bassin de l'Yzeron (130 km<sup>2</sup>). Thèse de doctorat, Université Grenoble Alpes. <https://hal.inrae.fr/tel-02601677>

Langergraber G., Fleischmann N., Hofstaedter F., Weingartner A. (2004). Monitoring of a paper mill wastewater treatment plant using UV/Vis spectroscopy. *Water Science and Technology*, 49, 9-14. <http://dx.doi.org/10.2166/wst.2004.0004>

Li, P., Hur, J. (2017). Utilization of UV-Vis spectroscopy and related data analyses for dissolved organic matter (DOM) studies: A review. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology* 47, 131-154. <https://doi.org/10.1080/10643389.2017.1309186>

Martins J., M. Coquery, N. Robinet, G. Nord, C. Duwig, C. Legout, M.C. Morel, L. Spadini, N. Hachgenei, J. Némery, P. Mao, C. Margoum, C. Miegé, A. Daval, B. Mathon, L. Liger. (2019). Origine et devenir des contaminants pharmaceutiques dans les bassins versants agricoles. Le cas de la Claduègne (Ardèche). Rapport final PharmaBV. <https://hal.inrae.fr/hal-02609731>

Marti R., Ribun S., Aubin J.-B., Colinon C., Petit S., Marjolet L., Gourmelon M., Schmitt L., Breil P., Cottet M., Cournoyer B. (2017). Human-Driven Microbiological Contamination of Benthic and Hyporheic Sediments of an Intermittent Peri-Urban River Assessed from MST and 16S rRNA Genetic Structure Analyses. *Frontiers in Microbiology*, 8. <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fmicb.2017.00019/full>

Masson M., Duwig C., Baduel C., Boukra A., Cournoyer B., Crouzet A., Darfeuil S., Daval, A., Dherret L., Dominguez Lage A., Ginot P., Grandjouan O., Jullien L., Lagouy M., Margoum C., Martins J.M.F., Miège C., Nord G., Spadini L., Tuyet N., Voiron C., Coquery M. (2024). Protocoles d'échantillonnage et d'analyses classiques et innovantes des échantillons de source et de mélange pour la caractérisation des eaux de surface. Rapport final, Livrable WP2-1, ANR CHYPSTER. 65 pp.

Navratil O., Boukerb M.A., Perret F., Breil P., Caurel C., Schmitt L., Lejot J., Petit S., Marjolet L., Cournoyer B. (2020). Responses of streambed bacterial groups to cycles of low-flow and erosive floods in a small peri-urban stream. *Ecohydrology*, 13:e2206. <https://doi.org/10.1002/eco.2206>

Nord G., Boudevillain B., Berne A. Branger F., Braud I., Dramais G., Gérard S. et al (2017). A high space-time resolution dataset linking meteorological forcing and hydro-sedimentary response in a mesoscale Mediterranean catchment (Auzon) of the Ardèche Region, France. *Earth System Science Data*, 9(1): 221-49. <https://hal.archives-ouvertes.fr/hal-02306592>

Penghui L., Hur J. (2017) Utilization of UV-Vis spectroscopy and related data analyses for dissolved organic matter (DOM) studies: A review. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*, 47:3, 131-154. <http://dx.doi.org/10.1080/10643389.2017.1309186>

Petit S. M.-C., Lavenir R., Colinon-Dupuich C., Boukerb A. M., Cholley P., Bertrand X., Freney J., Doléans-Jordheim A., Nazaret S., Laurent F., Cournoyer B. (2013). Lagooning of wastewaters favors dissemination of clinically relevant *Pseudomonas aeruginosa*. *Research in Microbiology*, 164(8), 856–866.

Pozzi A. C. M., Petit S., Marjole, L., Youenou B., Lagouy M., Namour P., Schmitt L., Navratil O., Breil P., Branger F., Cournoyer B. (2024). Ecological assessment of combined sewer overflow management practices through the analysis of benthic and hyporheic sediment bacterial assemblages from an intermittent stream. *Science of The Total Environment*, 907, 167854.

Pradier N. (2023). Identification par enquêtes et cartographie des sources de pollution à la parcelle sur les bassins versants de la Claduègne (07) et du Ratier (69), et création d'une base de données PostgreSQL (PostGIS). Rapport de stage, UMR Pacte.

Uber M. (2020). Suspended sediment production and transfer in mesoscale catchments: a new approach combining flux monitoring, fingerprinting and distributed numerical modelling. Thèse de doctorat, Université Grenoble Alpes. <https://theses.hal.science/tel-02926078>

## Annexes

### Annexe 1 : Compléments d'information sur la base de données spatialisées

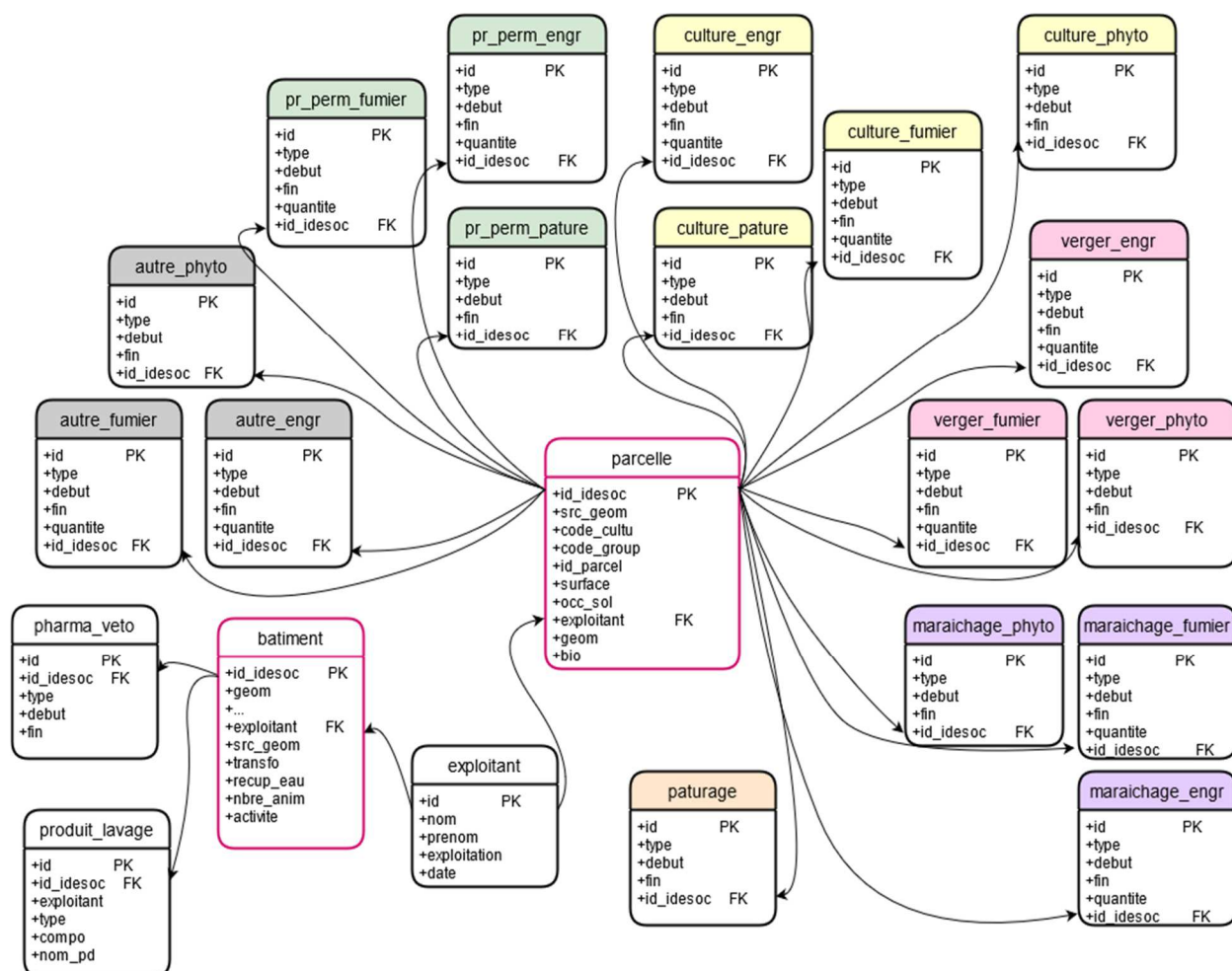


Figure A1 : Schéma relationnel de la base de données spatialisée (sources : Betemps, 2021 et Josse 2021).

Tableau A1 : Classes d'occupation des sols de la base de données

RPG	Occupation Sol BDD
Prairie permanente (18)	Prairie permanente
Prairies temporaires (19) Fourrage (16) Céréales (1, 4)	Culture
Estives et Landes (17)	Pâturage
Vignes (21)	Vigne
Vergers (20)	Verger
Autres cultures industrielles (24) Légumes ou fleurs (25) Divers (28)	Autre
Légumes ou fleurs (25)	Maraîchage
	Carrière
	Décharge



## Exemples de requêtes

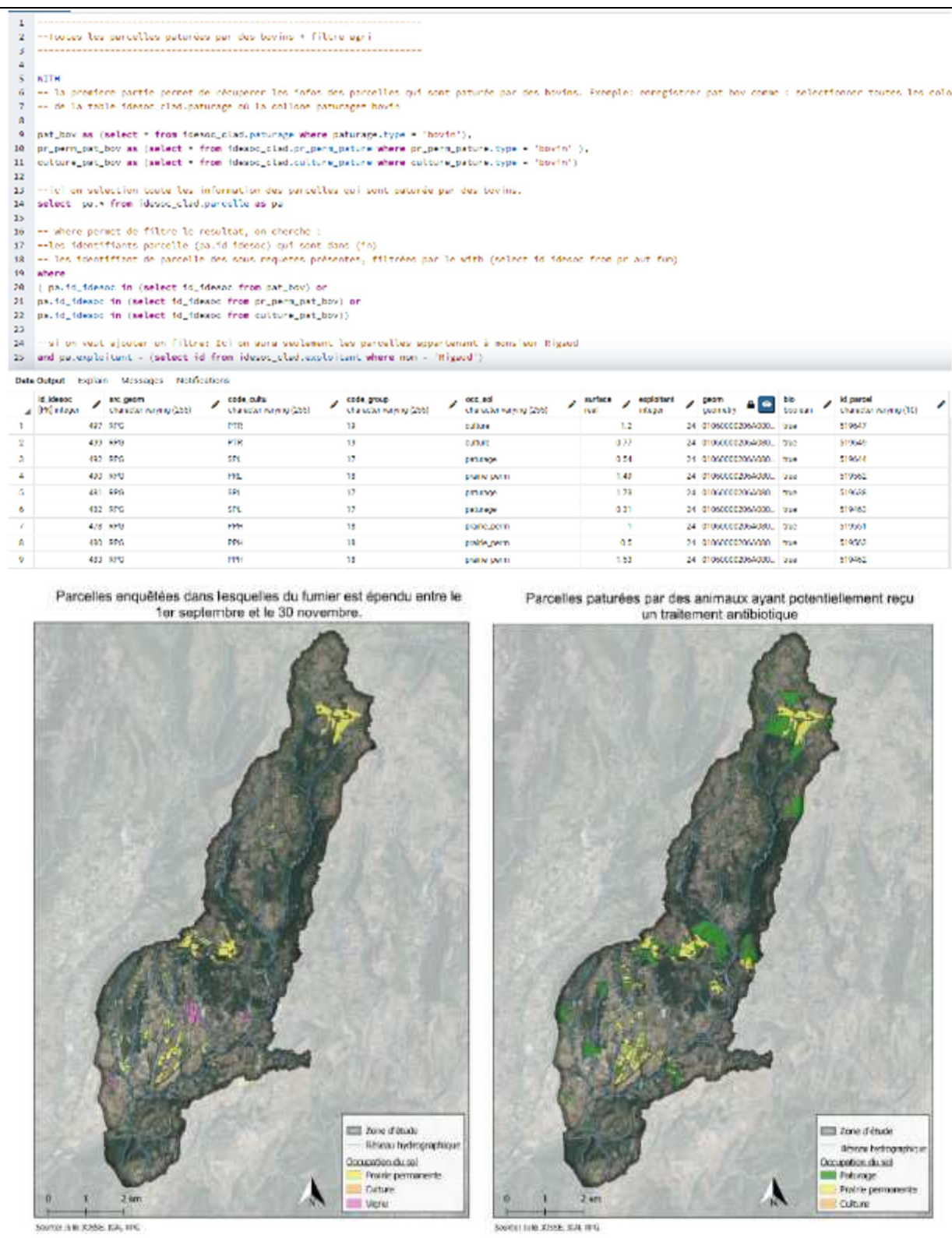


Figure A2 : Exemples de requêtes réalisées à partir de la base de données pour le bassin versant de la Claduègne. A gauche : parcelles avec fumier épandu. A droite : parcelles pâturées par des animaux potentiellement traités avec antibiotiques.

## Annexe 2 : Compléments d'information sur la localisation des points de prélèvement des sources sur les bassins versants de la Claduègne

*Tableau A2 : Identification des 13 points de prélèvement des sources, avec le code station, le nom du cours d'eau et la localisation, pour le bassin versant de la Claduègne. (STEP : station de traitement des eaux usées).*

Code station	Nom détaillé	cours d'eau	Municipalité
SJ4	Saint Jean Le Centenier 4	Ruisseau de Théoule	Saint Jean Le Centenier
STV	STEP Villeneuve de Berg	Affluent du Chauvel	Villeneuve de Berg
VB2	Villeneuve de Berg 2	Ruisseau du Chauvel	Villeneuve de Berg
VB1	Villeneuve de Berg 1	affluent de la Claduègne	Villeneuve de Berg
VB3	Villeneuve de Berg 3	affluent de la Claduègne	Montfleuri
MI1	Mirabel 1 sur plateau basaltique	Ruisseau du Gazel	Mirabel
SG1	Saint Gineys en Coiron 1	Ruisseau de Bouille	Saint Gineys en Coiron
SG2	Saint Gineys en Coiron 2	Ravin de Rabeiller	Saint Gineys en Coiron
STC	Station phytoépuration Camping les pommiers	Rivière la Claduègne	Villeneuve de Berg
MI6	Mirabel 6	Ruisseau du Gazel	Mirabel
MI2	Mirabel 2	Ruisseau de Sauzède	Mirabel
MI7	Mirabel 7	Ruisseau de Largentelle	Mirabel
STF	Station d'épuration de la ferme du Pradel	Rejet dans un fossé qui draine directement dans le Gazel	Mirabel

### Annexe 3 : Stratégie d'échantillonnage pour la cartographie spatiale de la qualité des eaux

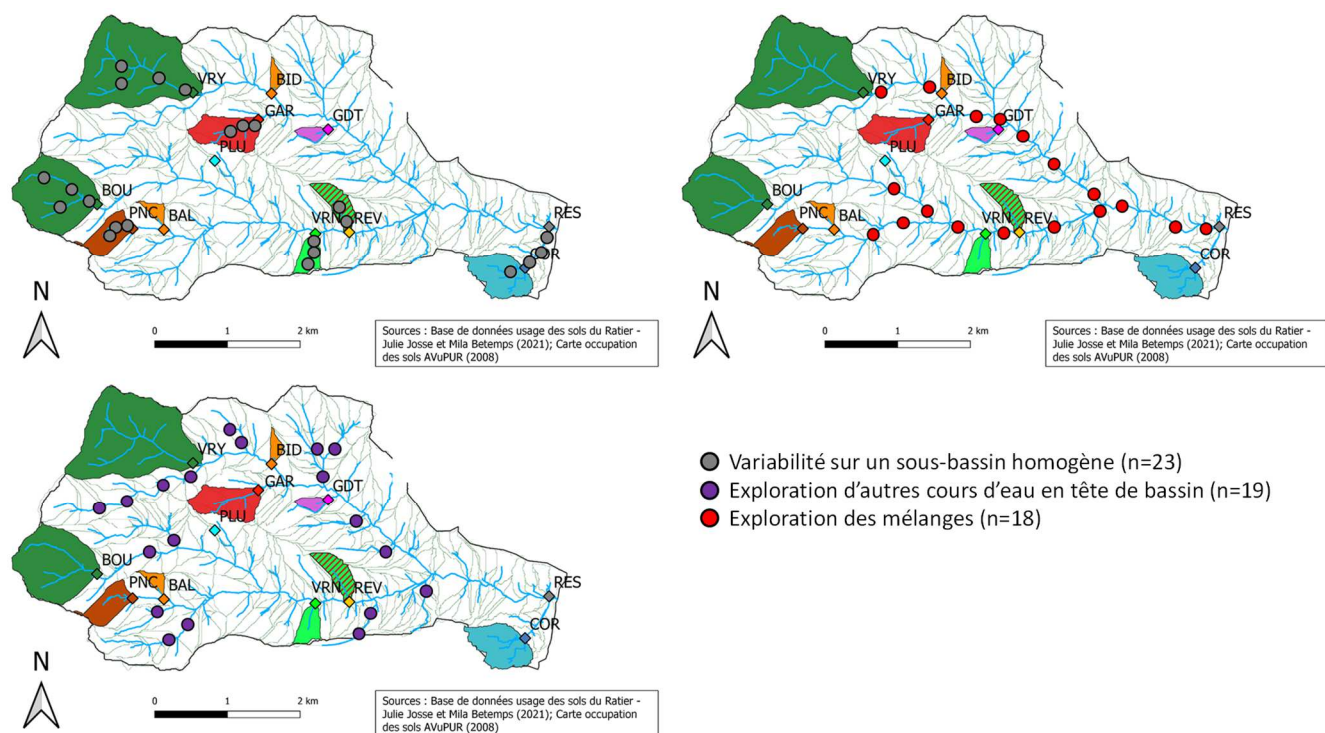


Figure A3 : Stratégie d'échantillonnage pour réaliser la cartographie spatiale de la qualité de l'eau sur le bassin du Ratier. Trois types de points de prélèvement sont envisagés : 1) étude de variabilité au sein d'un sous-bassin homogène (ronds gris), 2) exploration des sous-bassins versants non suivis (ronds violets) et 3) exploration des mélanges sur les cours d'eau principaux (ronds rouges). Les cartes montrent les sous-bassins versants homogènes (sources) échantillonnés et les points qui sont sélectionnés pour réaliser la cartographie spatiale.

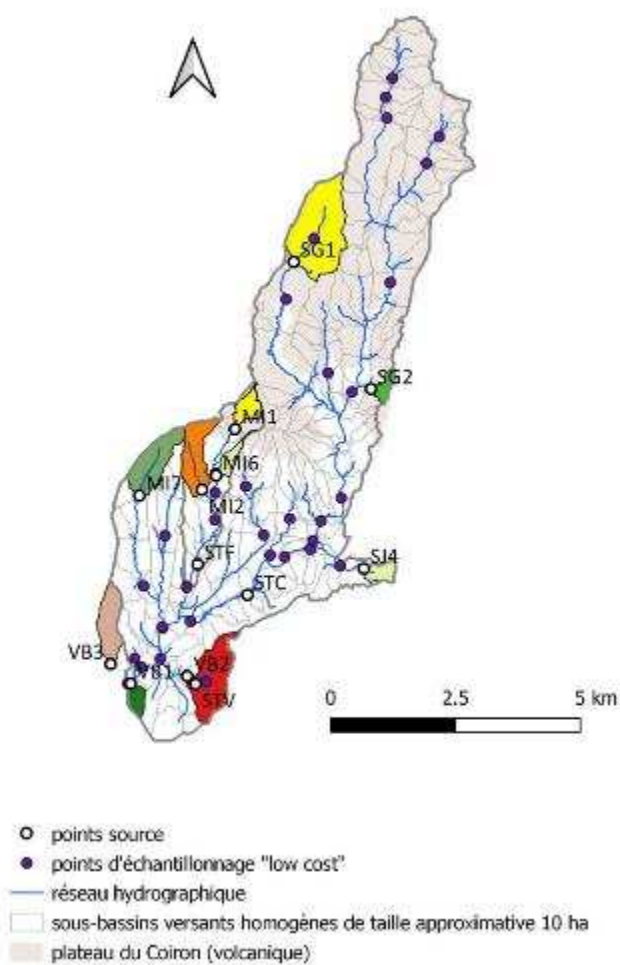


Figure A4 : Carte du bassin versant de la Claduègne avec les sous-bassins versants homogènes (sources) échantillonnés et les points qui ont été sélectionnés pour réaliser la cartographie spatiale de la qualité de l'eau.

## Annexe 4 : Compléments d'information sur la mesure et l'interprétation des indicateurs UV-Visible

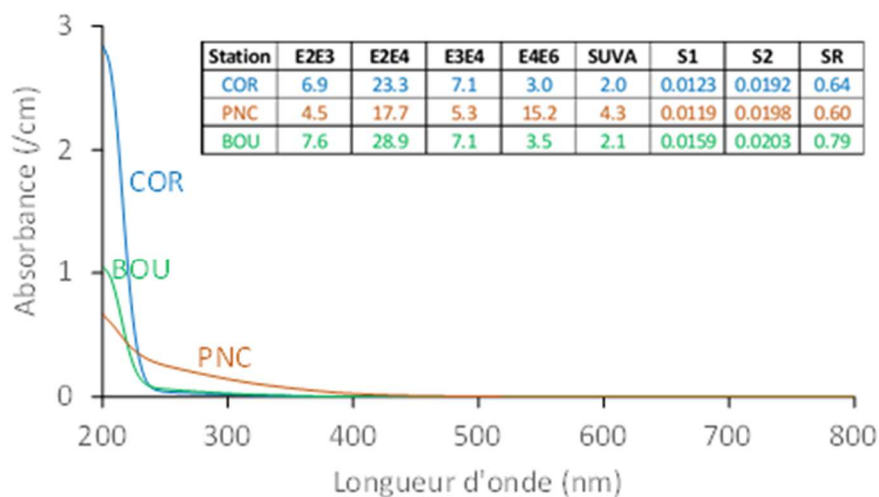


Figure A5 : Exemple de spectres UV-visible (200-800 nm) obtenus sur les échantillons d'eau des points de prélèvement de source : COR (représentatif d'un aquifère), PNC (représentatif d'une occupation de sol d'élevage) et BOU (représentatif d'une occupation de sol de forêt) sur le bassin du Ratier. Les indicateurs UV-visible (E2E3, E2E4, E3E4, E4E6, SUVA, S1, S2 et SR) calculés à partir des spectres sont donnés dans le tableau.

Tableau A3 : Indicateurs UV-visible calculés à partir des spectres d'absorbance (200-800 nm) permettant de décrire la nature de la matière organique dissoute (MOD) présente dans les échantillons d'eau. Abs<sub>x</sub> représente l'absorbance mesurée à la longueur d'onde x nm (d'après Boukra et al., 2023).

Indicateur	calcul	interprétation
E2:E3	Abs250 / Abs365	Inversement corrélé au poids moléculaire de la MOD
E2:E4	Abs254 / Abs436	MOD autichtone vs. MOD allochtone
E3:E4	Abs300 / Abs400	Inversement corrélé au degré d'humification de la MOD
E4:E6	Abs465 / Abs665	Inversement corrélé au degré d'humification de la MOD
S1 (275-295 nm)	Ajustement linéaire des coefficients d'absorption log-transformés	Inversement corrélé à la teneur en carbone aromatique
S2 (350-400 nm)		
SR	S1 / S2	Inversement corrélé au poids moléculaire de la MOD
SUVA	Abs254 / COD	Corré à l'aromaticité de la MOD



## Annexe 5 : Compléments d'information sur la mesure et l'interprétation des indicateurs microbiens

### Rendements d'extraction d'ADN pour les échantillons de la cartographie spatiale

Les résultats des rendements d'extraction d'ADN (ng/mL d'eau de surface, les valeurs de rendement sont divisées par 100 afin de représenter les données de façon optimale sur la carte) pour la campagne low-cost en période de temps sec sont présentés dans la Figure A5. Les quantités sont indiquées par des cercles de diamètre proportionnel au rendement d'ADN.

Le rendement moyen des extractions d'ADN de la campagne était de 0,25 ng/ml d'eau de surface filtrée, avec certains points bien au-dessus comme BOU-P7. En revanche il convient de noter que 7 points sur 53 ont eu des rendements très faibles [0,03 ; 0,06 ng/ ml d'eau filtrée].

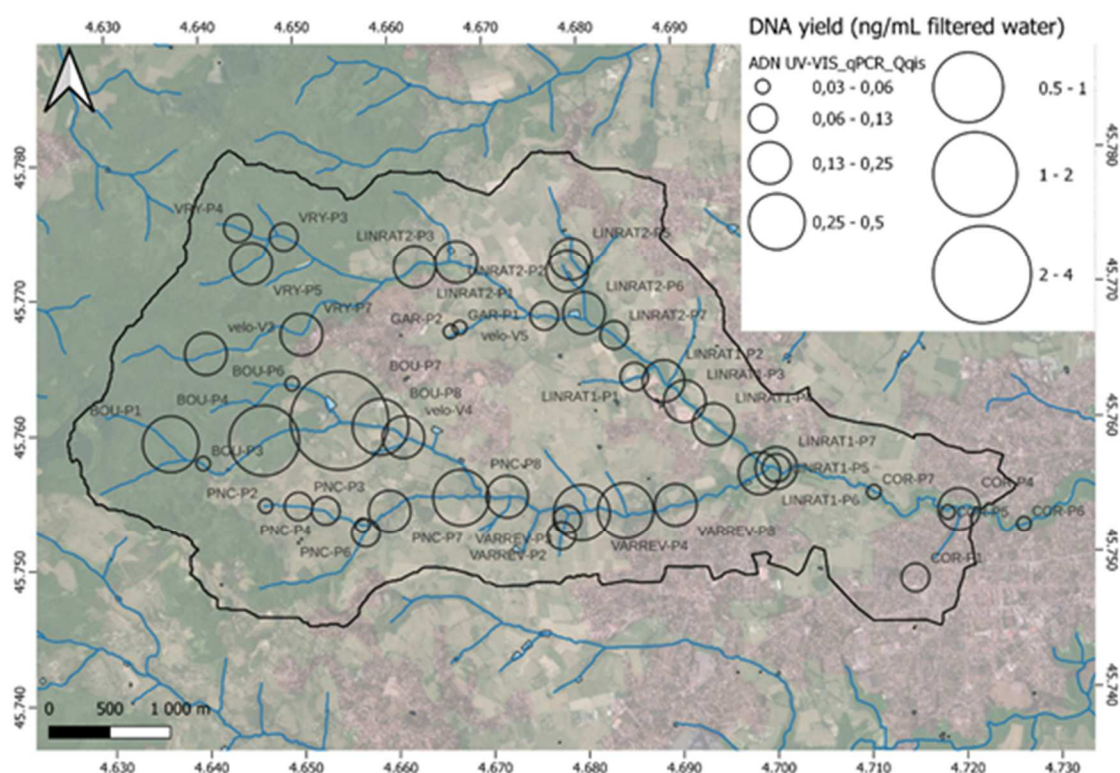


Figure A6 : Quantité d'ADN (en ng/mL d'eau filtrée, divisé par 100) extraits sur le bassin versant du Ratier en fonction des points de prélèvement pour la campagne spatiale de mars 2023.

## Traitements des données qPCR

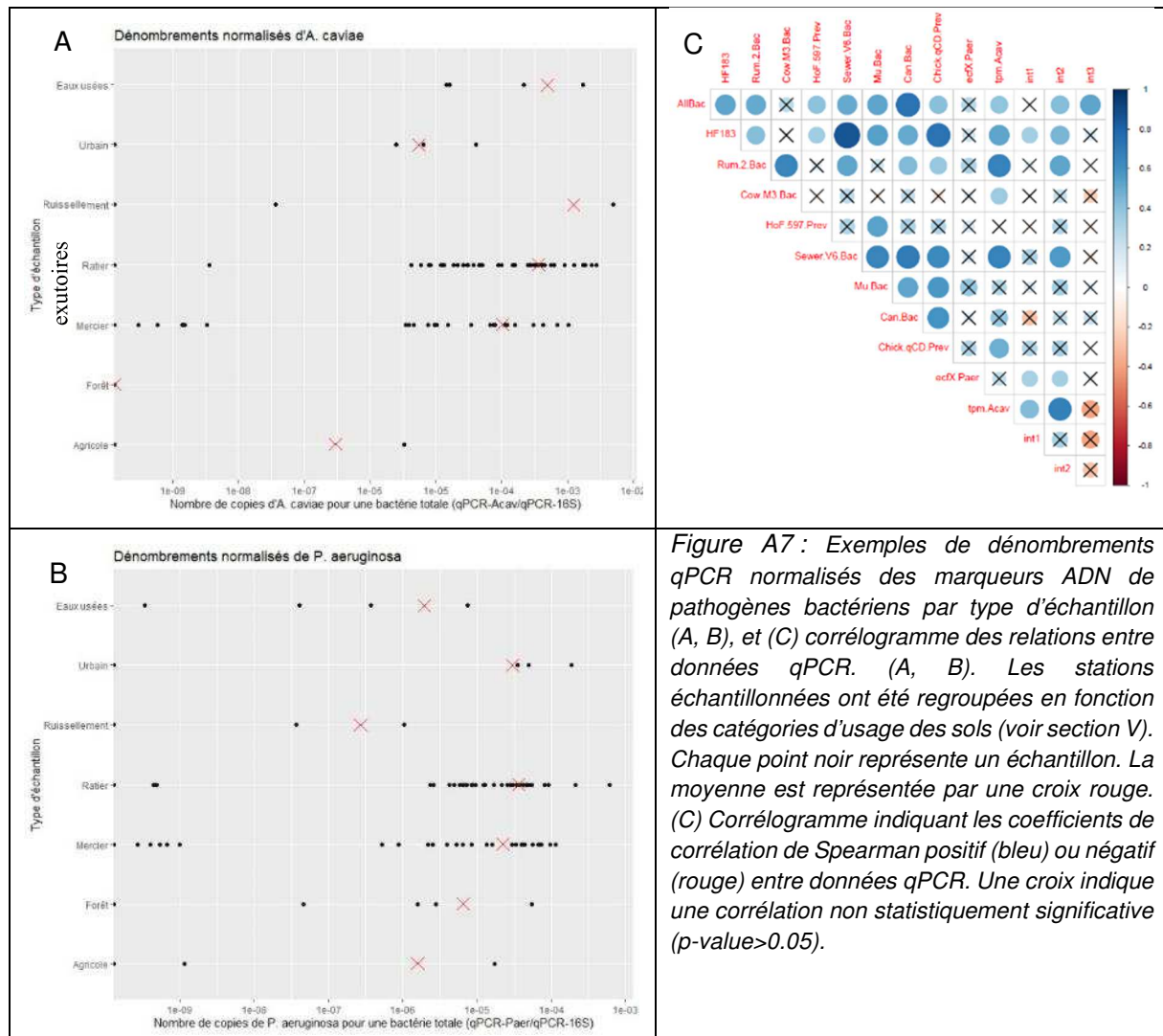


Figure A7 : Exemples de dénombrements qPCR normalisés des marqueurs ADN de pathogènes bactériens par type d'échantillon (A, B), et (C) corrélogramme des relations entre données qPCR. (A, B). Les stations échantillonnées ont été regroupées en fonction des catégories d'usage des sols (voir section V). Chaque point noir représente un échantillon. La moyenne est représentée par une croix rouge. (C) Corrélogramme indiquant les coefficients de corrélation de Spearman positif (bleu) ou négatif (rouge) entre données qPCR. Une croix indique une corrélation non statistiquement significative ( $p\text{-value} > 0.05$ ).

Le traitement des données qPCR a inclus (i) la production de cartes dans un système d'information géo-localisée (QGIS), et (ii) des analyses descriptives et tests statistiques réalisés via le package (R) (Pozzi et al., 2024). La fréquence de détection (présence), ainsi que la quantité normalisée moyenne et l'écart-type de chacun des marqueurs ADN ont été déterminés dans (a) chacun des sous-bassins versants homogènes, (b) pour des sources diffuses et (c) des exutoires des bassins versants du Mercier et du Ratier. Des tests de différence de proportion d'échantillons positifs (test à 2 échantillons d'égalité des proportions avec correction de continuité) et de différence de moyenne (test t de Welch à deux échantillons) ont été réalisés. Les rho (r) de corrélations de Spearman entre les marqueurs suivis ont été calculés. Une analyse multivariée a été réalisée pour étudier la covariance entre la présence des marqueurs ADN bactériens et le type d'échantillon (analyse en composante principale), et les catégories dominantes (cf. Tableau 1 et section V), (test d'ajustement envfit, package vegan de R). Les valeurs indicatrices des marqueurs ADN ont été estimées pour chacun des types d'échantillon (package R indicpecies). Ces valeurs indicatrices visent à obtenir des prédictions sur la contribution des sous-bassins versants en fonction des taux d'occurrence des marqueurs MST et pathogène par site.



## Annexe 6 : Compléments d'information sur les campagnes d'échantillonnage des sources et des mélanges aux exutoires des bassins versants du Ratier et de la Claduègne

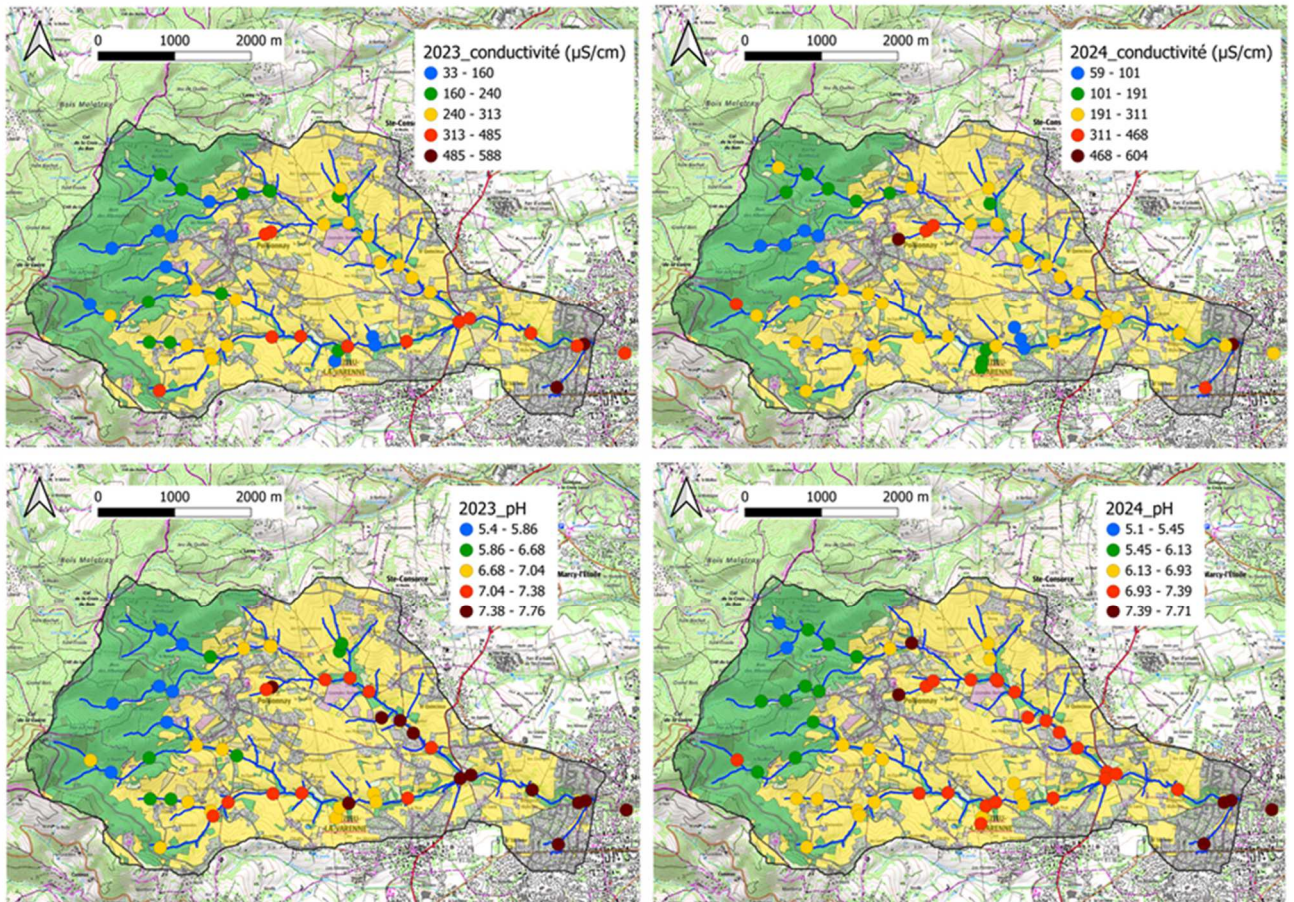


Figure A8 : Cartographie spatiale des mesures de conductivité et de pH pour les campagnes de mars 2023 et février 2024 sur le bassin du Ratier.

## Annexe 7 : Compléments d'information sur les campagnes d'échantillonnage des sources et des mélanges aux exutoires des bassins versants du Ratier et de la Claduègne

*Tableau A4 : Synthèse des prélèvements effectués pour les sources sur le bassin du Ratier et conditions hydro-météorologiques correspondant à chaque campagne de prélèvement.*

Point de prélèvement	09/02/22	14/02/22	17/05/22	27/06/22	30/06/22	07/12/22	17/01/23	14/03/23	28/03/23	Nb. echant.
	Hautes eaux - Sec	Hautes eaux - Humide	Basses eaux - Sec	Basses eaux - Humide	Basses eaux - Humide	Basses eaux - Humide	Hautes eaux - Humide	Hautes eaux - Humide	Hautes eaux - Humide	
BOU	✓	✓	✓	✓	-	✓	-	-	-	5
VRY	✓	✓	✓	✓	-	✓	-	-	-	5
VRN	✓	✓	-	✓	-	✓	-	-	✓	5
REV	✓	✓	-	-	-	-	✓	-	✓	4
PNC	✓	✓	✓	-	-	-	✓	-	✓	5
GAR	✓	✓	-	✓	-	✓	-	-	✓	5
BAL	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0
BID	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0
PLR	-	-	-	-	✓	✓	✓	✓	✓	5
COR	✓	✓	✓	✓	-	✓	-	-	-	5
RES	-	-	-	✓	-	✓	✓	✓	✓	5

*Tableau A5 : Synthèse des prélèvements effectués pour les sources sur le bassin de la Claduègne.*

Point de prélèvement	17/03/22	30/06/22	20/10/22	01/12/22	15/05/23	20/10/23	29/11/23	15/02/24	Nb. echant.
MI1	✓	✓	✓	✓	✓	-	✓	-	6
MI2	✓	-	✓	✓	✓	-	✓	-	5
MI6	✓	-	-	✓	-	✓	✓	✓	5
MI7	✓	-	-	✓	✓	-	✓	✓	5
SG1	✓	-	-	✓	✓	-	✓	✓	5
SG2	✓	✓	✓	✓	✓	-	✓	-	6
SJ4	✓	-	-	✓	-	✓	✓	✓	5
STC	✓	✓	✓	✓	✓	-	✓	-	6
STF	-	✓	✓		✓	-	✓	-	4
STV	✓	✓	✓	✓	✓	-	✓	-	6
VB1	✓	-	-	✓	✓	-	✓	✓	5
VB2	✓	✓	✓	✓	✓	-	✓	-	6
VB3	✓	-	✓	✓	✓	-	✓	-	5

*Tableau A6 : Description des événements pluvieux lors des prélèvements aux exutoires du bassin du Ratier et Mercier (source : Grandjouan, 2024).*

Prélèvement	Type d'évènement	duration <sub>p</sub> (h)	cumtot (mm)	lame (mm)	ET_cum_5j (mm)	dry_period (h)	API (mm)	P_cum_5j (mm) Classe
Mars 2019	petit évènement hivernal	20	6.6	0.3	8	55	0	3.4
Mai 2021	évènement majeur	44	92	11.6	13	70	0	10.2
Octobre 2021	évènement majeur	80	89	5.8	13	147	0	0
Juin 2022	orage estival	116	57	0.3	38	291	0	0
Septembre 2022	orage estival	44	9	0.1	15	94	0	2
Mars 2023	petit évènement hivernal	19	18	0.7	7	13	1	27

*Tableau A7 : Nombre d'échantillons d'eau prélevés aux exutoires par station (Claduègne - CLA et Gazel - GAZ) et par date pour les événements de crues sur le bassin de la Claduègne.*

Dates	Nombre d'échantillons	station
02/11/2022	7	CLA
01/12/2022	5	CLA
03/07/2023	14	CLA
20/10/2023	20	CLA
25/10/2023	11	CLA
25/10/2023	5	GAZ
02/04/2024	11	CLA



## Annexe 8 : Résultats des contributions aux exutoires du Ratier et du Mercier

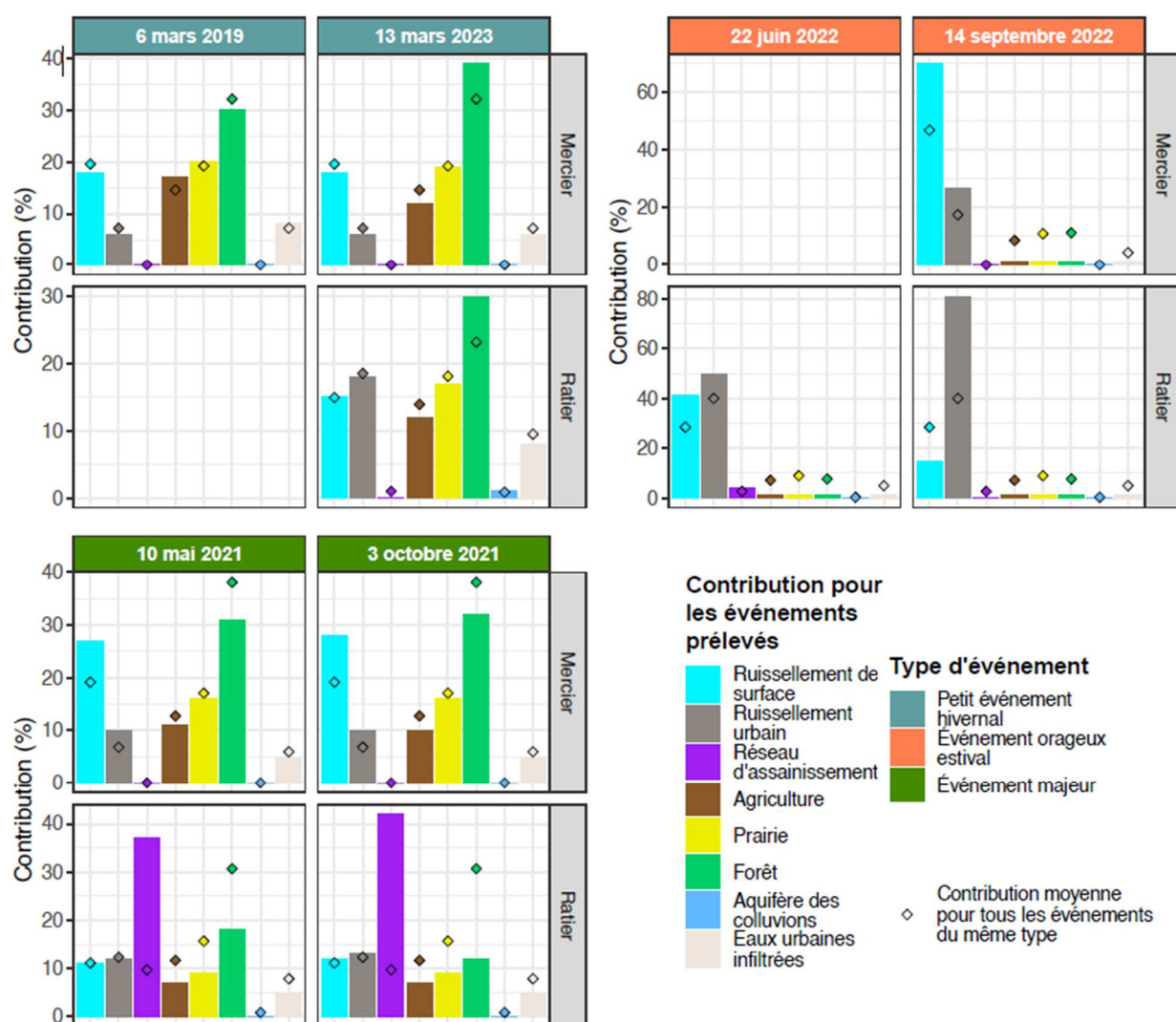


Figure A9 : Contributions pour les autres événements prélevés prédites par le modèle biogéochimique de mélange (source : thèse d'Olivier Grandjouan, 2024).

