

Titre de l'action :

83- Evaluation de la dissémination de gènes BACTériens de RESISTance aux Antibiotiques à l'échelle d'un petit bassin versant rural en lien avec la pédologie, l'usage des sols et le fonctionnement hydrologique.

BACTRESIST



Rapport final

Action n° 83 du Programme 2022 au titre de l'accord cadre Agence de l'Eau ZABR

Thème Flux polluants, écotoxicologie, écosystèmes

Site Rivières Cévenoles

IGE UMR 5001 : Jean Martins, Guillaume Nord, Cédric Legout, Lorenzo Spadini, Céline Duwig, Armelle Crouzet, Marie-Christine Morel, Laurent Oxarango

LEM UMR 5557 : Sylvie Nazaret, Agnès Richaume, Sabine Favre-Bonté, Thibault Meyer, Luce Faysse, Elisabeth Brothier, Abigail Delort, Pauline Defour.

SEPTEMBRE 2025

Z A B R

Zone Atelier Bassin du Rhône

Ont contribué à la réalisation de ce projet :

IGE - université Grenoble Alpes

Jean Martins
Lorenzo Spadini
Guillaume Nord
Cédric Legout
Céline Duwig
Armelle Crouzet
Marie-Christine Morel
Laurent Oxarango

LEM

Sylvie Nazaret
Agnès Richaume
Sabine Favre-Bonté
Thibault Meyer
Elisabeth Brothier
Luce Faysse, Master 2
Abigail Delort
Pauline Defour

Z A B R

Zone Atelier Bassin du Rhône

Sommaire

I Introduction

II Matériel et Méthodes

II- 1 Description du bassin versant de la Claduègne

II- 2 Caractérisation des sous-bassins versants et identification des sources de BRA et GRA

II-2-1 Identification et localisation des sources potentielles de gènes d'antibiorésistance

II-2-2 Campagne d'échantillonnage des sols/sédiments : échantillonnage/ conditionnement

II-2-3 Sélection des sites de prélèvement et stratégie d'échantillonnage des eaux

II-3 Mesure et suivi des paramètres hydrologiques et géochimiques

II-4 Mesure et suivi des paramètres microbiologiques

II-4-1 Indicateurs d'antibiorésistance

II-4-2 Suivis des paramètres microbiologiques du bassin de la Claduègne

II-4-3 Populations et activités nitrifiantes

II-4-4 Extractions d'ADN de l'eau, du sol et des sédiments

II-4-5 Analyse microbienne par qPCR et PCR digitale

II-5- Livrable 1 : Base de données hydro-bio-géochimiques

III Résultats

III-1 Campagnes d'échantillonnage

III-2 Fonctionnement hydrologique du bassin versant

III-3 Suivi de T et EC à haute fréquence

III-4 Suivi des paramètres géochimiques

III-5 Suivi des paramètres microbiologiques

III-5-1 Caractérisation et dynamique de l'antibiorésistance dans le bassin versant

III-5-1-1 Prévalence des GRA et EGM dans les milieux récepteurs

III-5-1-2 Dynamique temporelle et saisonnalité

III-5-1-3 Dynamique spatiale en lien avec les activités humaines

III-5-1-4 Dynamique spatiale des GRA en lien avec le débit des rivières

III-5-1-5 Dynamique spatiale des GRA en lien les éléments traces métalliques

III-5-2 Antibiorésistance dans les sols et impact sur leur fonctionnement écologique

III-5-2-1 Abondance des ARG et EGM dans les sols

III-5-2-2 Abondance des populations nitrifiantes

III-5-2-3 Activités nitrifiantes potentielles

IV Discussion

V Conclusions et perspectives

VI Valorisation du projet

VII Bibliographie

VIII Annexes

Z A B R

Zone Atelier Bassin du Rhône

I. Introduction

La présence de nombreux contaminants chimiques et microbiologiques dans les écosystèmes aquatiques entraîne aujourd'hui une dégradation généralisée de l'état écologique des eaux et augmente l'exposition humaine à ces contaminants. Les connaissances sur les contaminations chimiques et leur devenir sont largement avancées. En revanche, même si certaines données spécifiques sur la dissémination d'antibiotiques (ATB), de bactéries résistantes aux antibiotiques (BRA) ou de leurs gènes de résistance (GRA) ou éléments génétiques mobiles (EGM) sont disponibles, notamment en milieu urbain avec des émissions sous forme de hotspots (e.g. Cacace et al. 2019), nous disposons de très peu d'informations sur leur comportement en contexte rural où les sources sont plus variées, plus diffuses et le plus souvent inconnues. Elles restent donc très difficiles à étudier dans ces environnements particuliers, notamment en raison de la complexité des processus impliqués, y compris hydrologiques, de la diversité des paramètres à mesurer et du caractère parcellaire, ponctuel et hétérogène des données à disposition (ANSES 2020, Alygizakis et al. 2020).

Si l'antibiorésistance est un phénomène bien étudié chez l'Homme et l'animal, son émergence et sa diffusion dans l'environnement sont moins connues. Pourtant, certains gènes de résistance qui posent actuellement problème en médecine proviennent de bactéries de l'environnement. En contexte rural, les bassins versants de méso-échelle (10-100 km²), caractérisés par des usages des sols diversifiés et par des lithologies hétérogènes, sont particulièrement sensibles aux changements d'occupation des sols 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. Il est donc particulièrement important de les étudier en tant que milieux sentinelles de l'évolution des contaminations chimiques et microbiologiques, en considérant notamment ces milieux comme des réservoirs de polluants, mais aussi de micro-organismes résistants ou tout au moins de gènes de résistance. Comme pour les solutés ou particules présentes dans la solution des sols et les eaux de surface (Martins et al. 2013, Moatar et al. 2020), il est probable que les micro-organismes et les gènes associés soient principalement transportés pendant des périodes relativement courtes, des « moments chauds », qui varient selon les bassins versants, les constituants des sols et les conditions climatiques. Il est donc important de suivre ces transferts sur des périodes caractéristiques de basses et de hautes eaux, en particulier en régions semi-arides ou en forte évolution, en lien avec le changement climatique ou d'usage des sols.

C'est dans ce contexte que s'inscrit le projet BactResist qui vise à évaluer la prévalence des GRA dans les sols et eaux de surface à l'échelle d'un bassin versant rural de 43 km² sujet à divers types d'occupation des sols et de contaminations.

Objectifs du projet :

L'objectif est de déterminer les sources et les pressions de sélection (antibiotiques ou autres polluants) contrôlant la dynamique spatiale et temporelle de ces gènes. Pour cela nous avons évalué plus particulièrement la contribution de pratiques agricoles (i.e. pâturage, épandage d'amendements organiques d'origine animale, viticulture...) et des contaminants introduits au travers de ces pratiques (antibiotiques, métaux lourds, pesticides...) connus pour (co)sélectionner

la résistance aux antibiotiques. En pratique, dans un premier temps, une méthodologie d'analyse spatiale de l'occupation des sols, des usages et pratiques, a été mise en œuvre pour identifier les sources potentielles de GRA et leur localisation. Ces sources ont ensuite été échantillonnées et analysées pendant différentes périodes de basses et hautes eaux sur les deux années du projet. Nous avons considéré également leur effet sur des groupes majeurs de micro-organismes modèles impliqués dans le cycle de l'azote, élément central du fonctionnement et de la qualité des milieux, en lien notamment avec la fertilité des sols et l'eutrophisation. L'objectif est de mettre en regard les mesures d'antibiorésistance (*e.g.* les GRA) avec la nature et l'usage des sols, l'hydrologie du bassin et sa contamination ainsi que les effets sur des groupes de micro-organismes indicateurs du fonctionnement des écosystèmes, notamment terrestres.

Démarche

La démarche utilisée est principalement une démarche de terrain (transposable à d'autres BV ruraux) visant à identifier les principales sources de GRA à l'échelle d'un bassin versant présentant des types d'occupation des sols et des niveaux d'anthropisation variables. Pour cela, et en nous appuyant notamment sur la méthodologie et les résultats d'enquêtes et d'analyses du projet Pharma BV (Martins et al. 2019) et de la thèse de N. Hachgenei (Hachgenei, 2022 ; Hachgenei et al., 2024a) nous avons mené des campagnes d'échantillonnage des sols et des eaux de surface à différents points stratégiques du bassin et à des périodes spécifiques correspondant au risque maximum attendu pour les différents types d'émissions ponctuelles ou diffuses de BRA et/ou GRA et en lien avec le cycle hydrologique très intermittent (pluies intenses entre septembre et novembre et, dans une moindre mesure, entre avril et mai) spécifique à cette région du sud-est de la France. En complément des mesures hydrologiques qui ont été menées très régulièrement dans le cadre du Service National d'Observation OHMCV, un suivi géochimique des eaux de surface a été initié pour caractériser l'origine et les chemins de l'eau s'écoulant à l'exutoire de la Claduègne (Hachgenei et al., 2024b). Les échantillonnages de sols ont été effectués selon une stratégie d'échantillonnage combinant la géologie, la pédologie et l'occupation des sols, afin de caractériser leurs propriétés physico-chimiques et évaluer leur état de fonctionnement biologique (*via* la mesure de l'activité microbienne liée au cycle de l'azote, utilisé comme indicateur), et l'abondance de GRA modèles.

Contenu :

1. Suivi à haute fréquence spatiale et temporelle des précipitations et des flux hydro sédimentaires depuis 2010 sur le Site Atelier « Rivières Cévenoles » de la ZABR et particulièrement le bassin versant de la Claduègne sur le site « Olivier de Serres » du SNO OHMCV.
2. Ce bassin versant est instrumenté pour un suivi à haute fréquence spatiale et temporelle des précipitations et des flux hydro-sédimentaires depuis 2010 dans un contexte de cours d'eau intermittents soumis à des événements hydrologiques intenses et très variables spatialement. Ce contexte hydro-météorologique donne une importance particulière aux premières crues de l'année pour la mobilisation des sédiments et des polluants/micro-organismes associés lors de la remise en eau des rivières. Cette spécificité a été prise en compte dans notre stratégie d'échantillonnage qui est calquée sur celle mise en œuvre dans le projet ZABR IDESOC (2021-2024) et impliquant le partenaire IGE qui produit des données relatives à l'hydrologie, à l'érosion des sols et aux pollutions chimiques...

3. Nous proposons de nous appuyer sur la base de données existantes et sur celles acquises dans ce projet pour affiner les corrélations entre la dynamique de l'ABR et les caractéristiques environnementales ainsi que sur les résultats obtenus dans le projet PharmaBV (2017-2019).
4. Ainsi, ce projet est basé sur la méthodologie d'échantillonnage stratégique mise au point dans le projet PharmaBV, sur la base d'enquêtes auprès d'éleveurs et de vétérinaires et sur le suivi de produits pharmaceutiques réalisé pendant la thèse de N. Hachgenei (2022) sur la dissémination de l'antiparasitaire Ivermectine des sols de versant jusqu'à la rivière. En effet, en milieu rural, l'augmentation du nombre et de la diversité d'élevages (porcins, ovins, bovins, volailles, ...) participe à l'augmentation de l'émission de nutriments et de micro-organismes vers les sols et les eaux, notamment au travers des excréments animaux sur les pâturages, avec les risques potentiels pour la santé des écosystèmes et humains (Monaghan et al., 2007). Les pratiques d'élevage peuvent donc être une source significative de pollutions chimiques et biologiques diffuses dans les zones rurales (Wilcock et al., 2006), en parallèle aux épandages de produits résiduels, contenant souvent divers métaux en traces. Dans le cadre de ce projet, nous proposons de suivre la qualité physico-chimique et bactérienne à l'exutoire du bassin versant de la Claduègne et en différents sous-bassins en fonction de l'usage des sols et des élevages présents.

II. Matériel et méthodes

II.1. Description du bassin versant de la Claduègne

Le site Rivières Cévenoles de la ZABR a fait l'objet de cette étude, et en particulier le bassin versant de la Claduègne (site « [Olivier de Serres](#) ») qui fait partie de l'observatoire OHMCV. Le bassin versant de la Claduègne (site « [Olivier de Serres](#) », membre de l'infrastructure de recherche OZCAR), est situé dans le Bas-Vivarais entre les Monts d'Ardèche et la vallée du Rhône, dans le département de l'Ardèche en région Auvergne-Rhône-Alpes. Les suivis réalisés au niveau du site « Olivier de Serres » visent à améliorer les connaissances et les capacités de prévision du risque hydro-météorologique associé aux pluies intenses et aux crues éclaircies en région méditerranéenne (Boudevillain et al., 2011). Depuis 2010 et dans le cadre des projets HyMeX (Ducrocq et al., 2013) et Floodscale (Braud et al., 2014), l'OHMCV maintient sur le bassin de la Claduègne des dispositifs d'observation hydro-météorologique et sédimentaire pour un suivi à haute fréquence spatiale et temporelle et une mise à disposition des données pour la communauté scientifique (Nord et al., 2017). Depuis 2018, ce bassin versant fait aussi l'objet d'un suivi hydro-chimique (ions majeurs, métaux et alcalinité) une fois par mois et à haute fréquence (~30 min) pendant les crues. Le bassin de la Claduègne couvre une superficie d'environ 42 km² (Figure) et 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 concentre une mixité d'usages 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 des terres sont les pâturages, les vignes et les forêts de feuillus le long des vallées incisées.

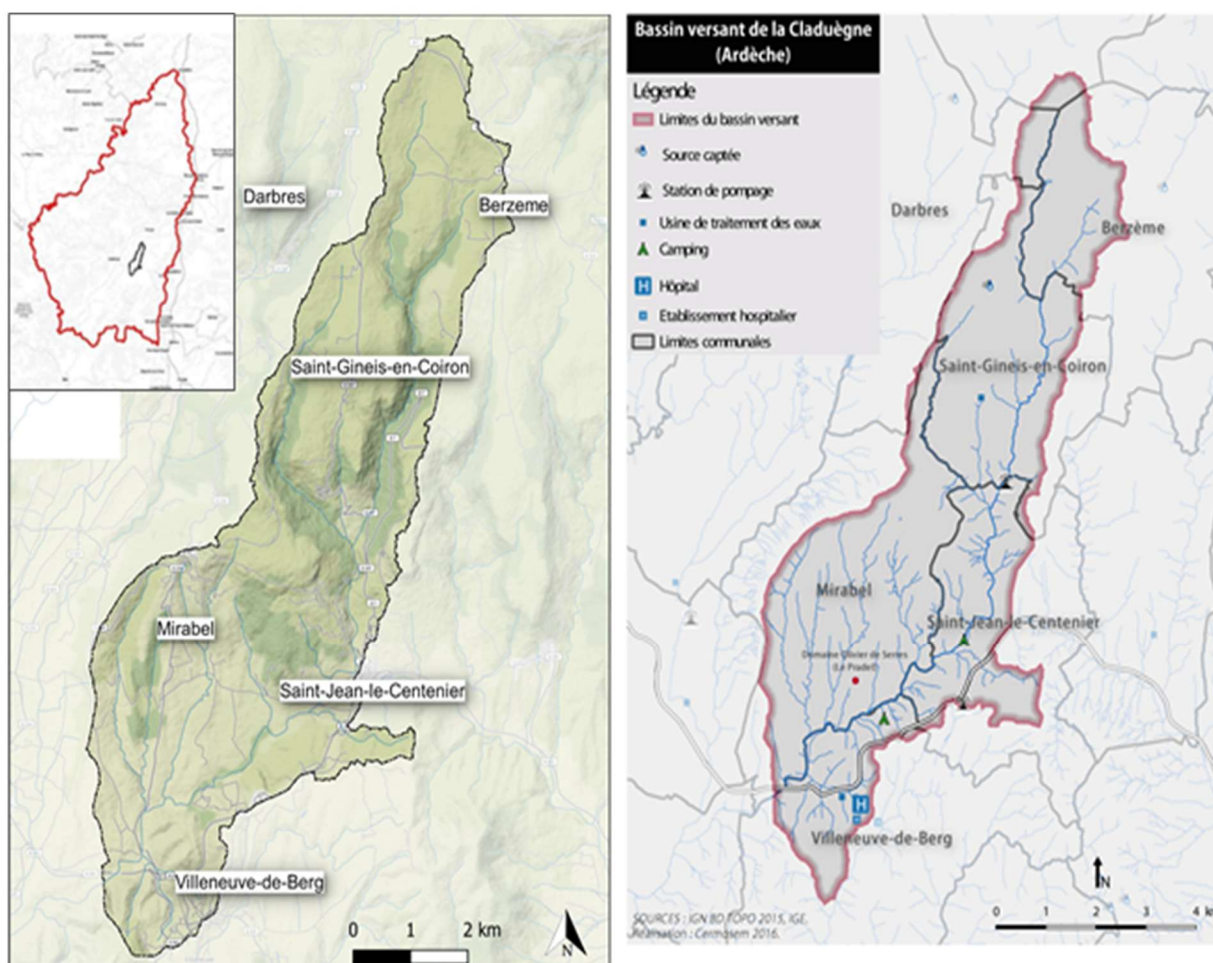


Figure 1 : Présentation du bassin versant de la Claduègne (Source : IGN BD TOPO).

La géologie 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 milieux étant séparés par un contour de falaises (Uber 2020 ; Nord et al. 2017).

- Au nord, le bassin versant est couvert par le plateau basaltique du Coiron qui représente environ 51% de la surface totale. Il est bordé par un escarpement pouvant faire jusqu'à 30 mètres de haut, composé de colonnes basaltiques.
- L'escarpement forme la limite avec la partie sud du bassin versant dont le paysage géologique correspond à des collines sédimentaires. Ainsi la géologie impacte la topographie des terrains et conditionne le fonctionnement hydrologique : le réseau hydrographique, au pied des escarpements, a creusé de profondes gorges. On y retrouve des pentes importantes ainsi que la formation de ravines marneuses (Figure 2).

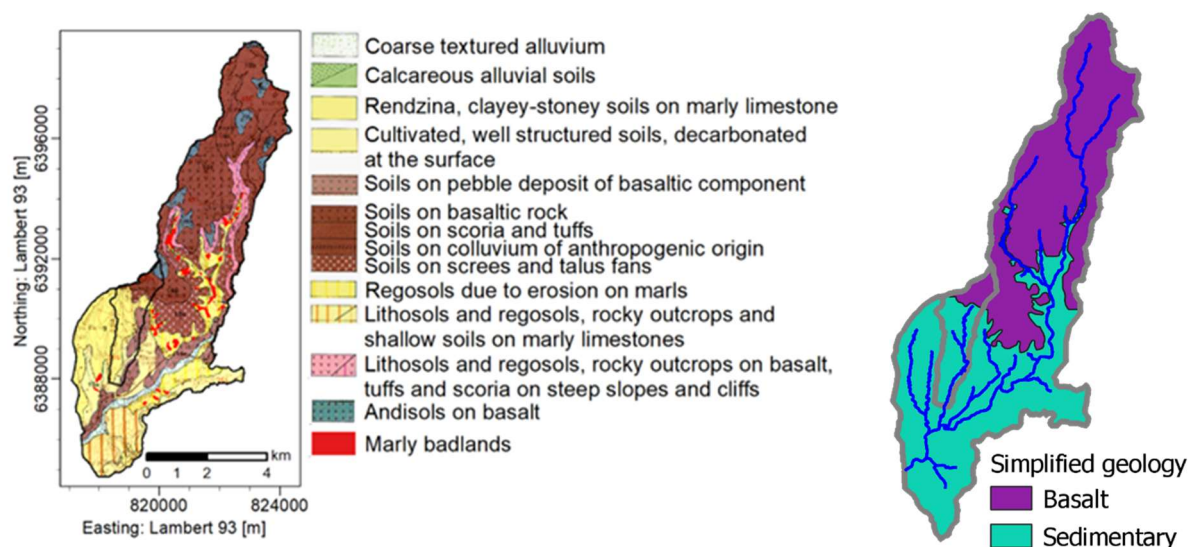


Figure 2 : Carte géologique (gauche) et carte simplifiée (droite) de la Claduègne (le sous-bassin du Gazel est également représenté) – Sources : BRGM, Nord et al. 2017.

Le Climat du BV de la Claduègne. Située à mi-chemin entre la plaine du Rhône à l'est et les monts d'Ardèche à l'ouest, la région d'étude est soumise aux influences climatiques océaniques et méditerranéennes. La précipitation moyenne annuelle est de 850 mm (Nord et al., 2017).

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 de fortes intensités et de durée prolongée (Nord et al. 2017).

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 d'ailleurs été classé en ZRE (Zone de Répartition des Eaux). Ce classement signale "une insuffisance chronique des ressources en eau par rapport aux besoins des usagers" (Eau France 2017).

Les activités sur le BV.

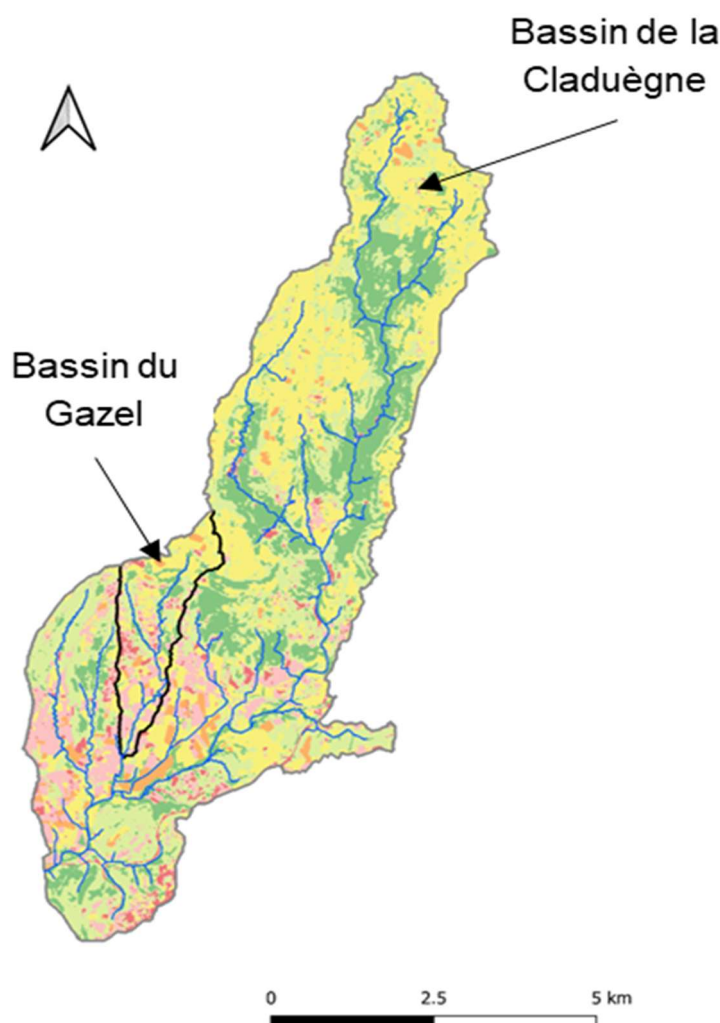
La géologie, la topographie et le climat ont un fort impact sur l'occupation du sol et les activités dans le bassin versant de la Claduègne. Sur le plateau du Coiron, l'activité principale est l'élevage extensif de bovins, c'est-à-dire que l'UGB (unité de gros bétail) est minime. Sur ce plateau, on trouve essentiellement des prairies et des pâturages séparés par des haies d'épineux (Figure 3). 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-Ginest. 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 3).

Le sud du bassin versant est aussi très agricole. 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 prairie 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 les productions. Cela permet aux exploitants ou agriculteurs d'avoir une plus grande stabilité de revenus. De manière générale un producteur cumule :

- L'élevage de volailles, poulets Label Rouge ou pondeuses plein air.
- L'élevage d'un type de bétail (bovin, ovin, caprin, ...).
- Des hectares de vignes.

Figure 3 : Carte du bassin de la Claduègne avec les usages de sol (le sous-bassin du Gazel est également représenté)



La partie sud du bassin est plus urbanisée, on y retrouve beaucoup de villages et la ville de Villeneuve de Berg (plus grande ville du bassin), avec environ 3000 habitants, un collège, un hôpital gériatrique et une station d'épuration dont les eaux traitées rejoignent un affluent de la Claduègne. Placés à mi-chemin entre Aubenas et Montélimar sur l'axe de la RN102 (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.

D'autre part, 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, ils accueillent durant la saison estivale respectivement jusqu'à 800 et 3 000 personnes.

II- 2 Caractérisation des sous-bassins versants et identification des sources de BRA/GRA

II-2-1 Identification et localisation des sources potentielles de gènes d'antibiorésistance

L'objectif de BactResist est d'échantillonner 1) des eaux dans des sites que nous appelons « source », aux propriétés spécifiques, c'est-à-dire des sites représentatifs des principaux types

d'apports de micro-organismes ou de gènes de résistance aux antibiotiques qui sont considérés dépendre de l'usage du sol (milieux urbains, viticoles, forestiers, élevage...), 2) ainsi que des sols à proximité immédiate de ces sites (généralement les berges de ces cours d'eau). La connaissance du bassin de la Claduègne par l'équipe HyDRIMZ de l'IGE Grenoble ainsi que les informations précieuses (données d'enquêtes et de cartographie) récoltées dans le cadre du projet PharmaBV (Martins et al. 2019) a permis l'identification de sous-bassins « sources » à partir des facteurs suivants : les classes de formations géologiques et les sols (Basaltique et sédimentaire, Figure 1) et les classes d'occupation du sol aux usages homogènes associé au réseau hydrographique, calculées à partir d'images satellites et corrigées par des visites de terrain et tenant compte de l'accessibilité des sites (Nord et al. (2017)).

Une problématique importante dans le bassin de la Claduègne est qu'il est difficile, voire impossible, d'**avoir un usage unique des sols, même à petite échelle**, sur le bassin versant. Ainsi, dans cette région d'Ardèche, sur les coteaux marno-calcaires, les exploitations agricoles sont de type poly-activités avec de l'élevage, de la vigne et des céréales sur des petites parcelles. Souvent, les fumiers sont épandus localement.

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 remonte 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 des bassins de tête du plateau basaltique** : prairie et forêt.

Sur les séries marno-calcaires, on rencontre tous les usages, et les prairies sont principalement destinées à l'élevage porcin, ovin, caprin et de volailles. L'association d'un site à un usage de sol est alors liée à son usage dominant et non pas exclusif. Ils sont positionnés à l'exutoire de sous-bassins élémentaires les plus homogènes possibles en termes de géologie, pédologie, occupation et usage de sol. A ces sites 'sources' s'associent les sites 'mélange'. Ce sont des points d'échantillonnage situés dans les cours d'eau à l'aval de sources multiples. En font partie, par exemple, les sites de prélèvement situés à l'exutoire des bassins versants du Gazel et de la Claduègne.

Ce travail d'importance pour le projet a permis d'identifier 16 sites d'échantillonnage dans le réseau hydrographique du bassin de la Claduègne, dont 13 sites 'source' et 3 sites 'mélange' (Tableau 1).

Les 13 sites source ont été ensuite regroupés par usage de sols. Six usages de sols ont ainsi été identifiés : Elevage (E), Urbain (U), Vigne (V), Forêt (F) et Mélange (M). Lors de l'analyse, les cours d'eaux recevant les eaux de stations d'épuration se sont distingués par des signatures chimiques et microbiologiques bien discriminantes, forçant la définition d'une classe 'station d'épuration' STEP (S) spécifique supplémentaire. Il s'agit alors plutôt d'un type d'effluent que d'un usage de sol. Par souci de clarté, on gardera toutefois le terme 'usage de sol' pour les six groupes dans ce rapport. Le Tableau 1 associe chacun des 16 sites à son usage de sol. On distingue 4, 5, 2, 1, 3, 1 sites S, E, U, V, M et F, respectivement. Naturellement, au vu des nombreuses hétérogénéités (multiples usages des sols, multiples géologies etc.) le nombre de sites classifiable n'est pas identique pour chaque usage de sol.

Z A B R

Zone Atelier Bassin du Rhône

Tableau 1 : Identification des 16 sites de prélèvement d'eau dans le bassin versant de la Claduègne.

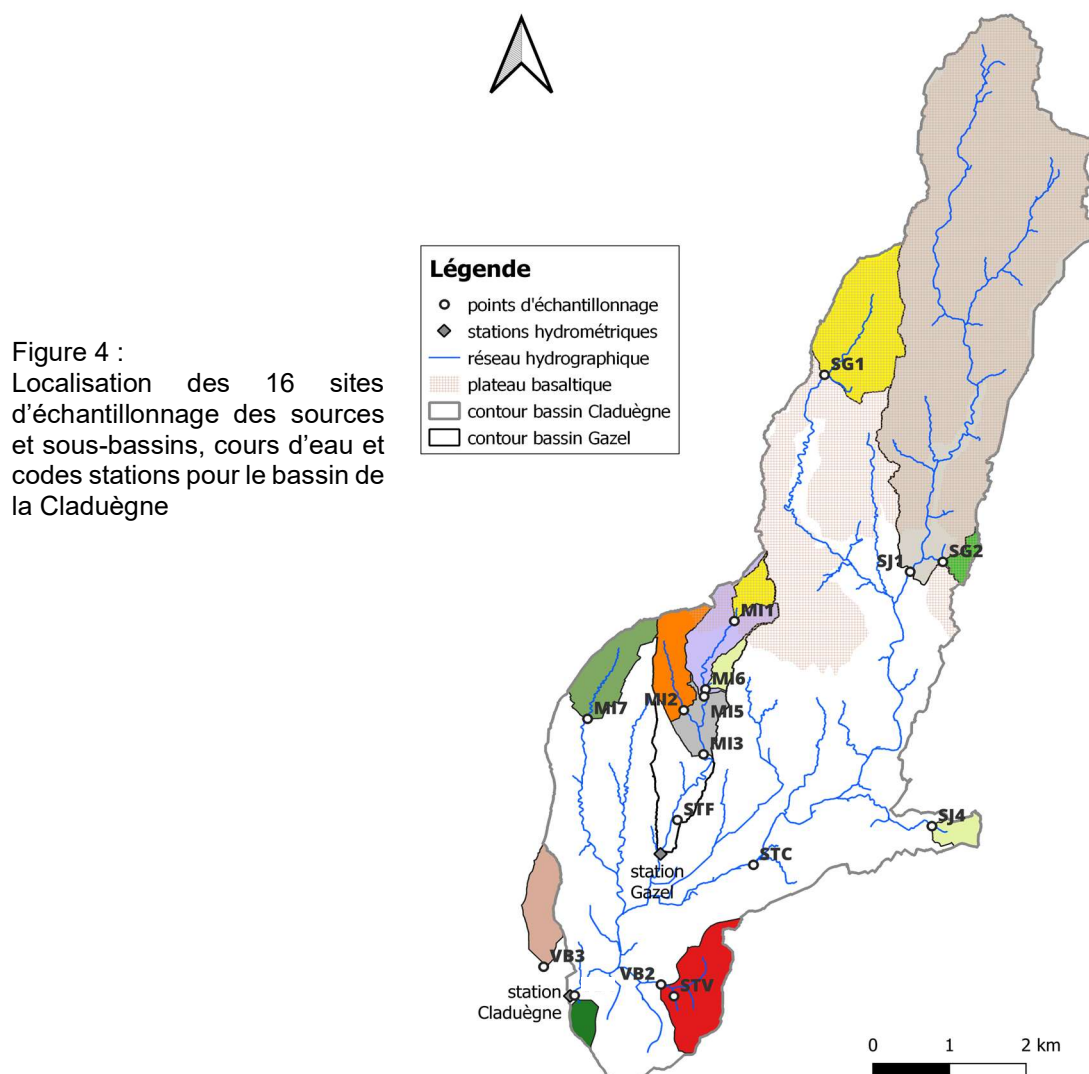
	Code station	Nom détaillé	Cours d'eau	Municipalité
1	SJ4	E: Saint Jean Le Centenier 4	Ruisseau de Théoule	Saint Jean Le Centenier
2	STV	S: STEP Villeneuve de Berg	Affluent du Chauvel	Villeneuve de Berg
3	VB2	U: Villeneuve de Berg 2	Ruisseau du Chauvel	Villeneuve de Berg
4	SJ1	F: Saint Jean 1	Captage Eau Potable	Saint Jean le Centenier
5	VB3	V: Villeneuve de Berg 3	Affluent de la Claduègne	Montfleuri
6	MI1	E: Mirabel 1 sur plateau basaltique	Ruisseau du Gazel	Mirabel
7	SG1	E: Saint Gineys en Coiron 1	Ruisseau de Bouille	Saint Gineys en Coiron
8	STC	S: Station phytoépuration Camping les pommiers	Rivière la Claduègne	Villeneuve de Berg
9	MI2	U : Mirabel 2	Ruisseau de Sauzède	Mirabel
10	MI5	E : Mirabel 5	Ruisseau du Gazel	Mirabel
11	MI6	E : Mirabel 6	Ruisseau du Gazel	Mirabel
12	GAZ	M : GAZEL	Exutoire du BV du GAZEL	Mirabel
13	CLA	M : CLADUEGNE	Exutoire du BV du GAZEL	Villeneuve de Berg
14	MI3	M : Mirabel 3	Ruisseau du Gazel	Mirabel
15	STF Ros	S : Station d'épuration de la ferme du Pradel	Rejet du bassin planté de roseaux	Mirabel
16	STF	S : Station d'épuration de la ferme du Pradel	Rejet dans un fossé qui draine directement dans le Gazel	Mirabel

S=STEP (station de traitement des eaux usées); E=Elevage, U=Urbain ; V=Vigne, M=mélange ; F=Forêt .

MI6 et SJ4 : élevage de porcs sur prairie ; VB3 : vignes et culture ; STF : rejet ponctuel de laiterie (ferme caprine du Pradel). Cette ferme a plus que doublé son nombre de chèvres dans les deux dernières années.

Sur la base de cette codification, nous avons pu établir une nomenclature particulièrement efficace pour la numérotation et l'identification de chaque échantillon collecté, qui ont ainsi pu être traités par les deux laboratoires sur toute la durée du projet.

Les 16 sites sont représentés dans la figure 4 suivante :



II-2-2 Campagne d'échantillonnage des sols : échantillonnage/ conditionnement

Les sols (n=11) ont été collectés sur les berges des cours d'eau et dans un filtre planté de roseaux au niveau de la ferme caprine du Pradel. La campagne d'échantillonnage a été menée le 11 janvier 2023. Les échantillons de sol ont été prélevés à l'aide d'une tarière dans l'horizon de surface (0 – 20 cm), placés dans des sachets plastiques et conservés dans de la glace avant d'être rapportés au laboratoire. Au laboratoire, les échantillons ont été partiellement séchés puis tamisés à 2 mm et conservés soit à - 40 °C soit à + 4 °C avant d'être utilisés pour des analyses physicochimiques et de biologie moléculaire (extraction d'ADN) et des mesures d'activités nitrifiantes, respectivement. Sur chaque site, trois prélèvements (i.e. répétitions biologiques) ont été effectués à une distance maximale de 5 m entre eux.

II-2-3 Sélection des sites de prélèvement et stratégie d'échantillonnage des eaux :

Sur la base des connaissances acquises dans le projet PharmaBV concernant 1) les usages agricoles et urbains, et 2) la temporalité d'application de produits phytosanitaires (Figure 5), nous avons prélevé des échantillons d'eau aux dates suivantes : 17 mars 2022 (n=14), 6 mai 2022 (n=12), 30

Z A B R

Zone Atelier Bassin du Rhône

juin 2022 (n=9), 11 janvier 2023 (n=16), 29 novembre 2023 (n=6), donc un total de N=71 échantillons (Tableau 2). Le nombre réduit d'échantillons sur certaines des campagnes s'explique principalement par le tarissement de sources en période estivale. En 2024, des échantillons complémentaires ont été prélevés en période de hautes eaux exclusivement à l'exutoire du Gazel et de la Claduègne le 2 avril (n=2) et le 6 mai (n=2).



Figure 5 : Synthèse des données acquises par des enquêtes auprès des acteurs locaux dans le projet PharmaBV sous forme de frise synchronique (2017) des pratiques agricoles et urbaines sur le bassin versant de la Claduègne (Martins et al. 2019)

Tableau 2 : Synthèse des campagnes d'échantillonnage effectués sur les 3 ans du projet BactResist. Les nombres inférieurs à 16 indiquent que certains sites n'étaient pas en eau lors des prélèvements.

Site \ Date	17/03/22	05/05/22	30/06/22	11/01/23	29/11/23	20/04/24	06/05/24	
Niveau d'eau	haute	basse ?	basse	haute ?	basse		haute	
SJ1		X	X	X	X			
SG1	X	X	à sec	X				
MI1	X	X	X	X				
MI6	X	à sec	à sec	X				
MI5		?	X	X	X			
STC	X	X	X	X				
MI2	X	X	à sec	X				
MI3	X	X	?	X	X			
SJ4	X	X	à sec	X				
STV	X	X	X	X				
VB2	X	X	X	X				
CLA	X	X	X	X	X	X	X	
VB3	X	X	à sec	X				
GAZ	X	X	à sec	X	X	X	X	
STF		X	X	X				
STF-roseaux		X	X	X	X			
Nb total éch. sources prélevés	12	14	9	16	6	2	2	61

Légende : : échantillonnage non programmé
? : échantillon perdu ou cassé

II-3 Mesure et suivi des paramètres hydrologiques et géochimiques

Il est à noter que la Claduègne est le seul cours d'eau permanent du bassin car soutenu par une source sous-basaltique importante du Coiron (source BRGM). Le Gazel est quant à lui le plus souvent à sec en période estivale. Dans la partie aval, proche de l'exutoire des bassins versants étudiés (sites 'CLA' et 'GAZ') sont installés depuis 2011 des stations hydrométriques enregistrant à haute fréquence (toutes les 10 et 2 min., respectivement). La station Claduègne est localisée au niveau d'un pont afin de faciliter l'accès et les manipulations lors des crues ; elle a été installée en octobre 2011. Le niveau d'eau est mesuré au moyen d'un radar. La station Gazel a été installée en avril 2011. Le niveau d'eau est mesuré à l'aide d'une sonde de pression et transformé par la suite en débit par l'intermédiaire de courbes de tarage hauteur-débit. La température, la conductivité et la turbidité de l'eau sont aussi mesurées en continu.

Des échantillonneurs séquentiels, déclenchés par la station d'acquisition, prélèvent des échantillons d'eau et de matières en suspension lorsque les valeurs seuils du niveau d'eau et de turbidité sont dépassées. Des mesures de concentration en matière solide (g/L) sont effectuées ensuite par pesée - séchage (Navratil et al. 2011).

Pour la géochimie, une double stratégie d'échantillonnage a aussi été mise en place, nécessitant : 1/ des prélèvements ponctuels effectués par les opérateurs des deux laboratoires partenaires disponibles au moment des campagnes de terrain et, 2/ des prélèvements continus ciblant une ou plusieurs crues sur des périodes de 2 à quelques jours.

En 2016, des analyses systématiques des ions majeurs par chromatographie ionique avaient été ajoutées au programme de suivi du SNO et, depuis 2021, l'analyse continue des métaux traces par ICP-MS, financée en partie sur des projets. Ces nouvelles analyses ont pu se faire grâce à l'installation de préleveurs automatiques dédiés sur le site 'CLA'. Il y a donc des séries d'analyses chimiques soutenues, avec une densité de mesures particulièrement élevée en période de crues (préleveurs automatiques) sur les sites 'CLA' et 'GAZ', auxquelles s'ajoutent les analyses ponctuelles (prélèvement manuel) sur l'ensemble des sites sélectionnés, faits par les personnels impliqués dans le projet lors des campagnes d'échantillonnages. Concernant les analyses microbiologiques (e.g. projet BactResist) seuls les analyses 'manuelles' effectuées dans le cadre de campagnes projet-spécifiques ont été exploitées au vu du conditionnement nécessaire pour les échantillons biologiques et le temps maximal (<6h) devant séparer échantillonnage et analyse.

La double vérification des mesures physico-chimiques ponctuelles *versus* automatiques (préleveurs automatiques) permet de détecter des variations éventuelles de paramètres dans les flacons des préleveurs en fonction du temps.

En effet, pour les analyses géochimiques faites à partir des préleveurs automatiques, le temps passé entre le prélèvement et la récupération des flacons peut être de 2 semaines ou plus en situation défavorable (congelés, mauvaise météo...). Ce laps de temps important est lié à l'éloignement du laboratoire avec les sites de prélèvement (5 h de route aller-retour). Cela peut également affecter des mesures autres que microbiologiques, comme les concentrations élémentaires du fait de la précipitation de minéraux, notamment la calcite en lien avec le dégazage du CO₂, qui a son tour génère une acidification de l'eau ainsi qu'une chute de la CE. Or, la comparaison de ces données mesurées au jour de la collecte avec celles des capteurs haute fréquence à l'instant du prélèvement permet de vérifier la stabilité de l'échantillon dans le

préleveur sur la durée d'attente. Les protocoles de prélèvements suivent des procédures standard, e.g. triple rinçage de la seringue de prélèvement avec l'eau de rivière pour les analyses alcalinité, majeurs et traces, avec filtration à 0.22 µm en filtres d'acétate de cellulose sur site, et avec en plus, pour les métaux traces, l'utilisation de tubes Falcon(R) 'metal free' trempé préalablement plusieurs jours dans un bain acide avant utilisation et contenant 2% en dilution finale d'acide nitrique ultrapure. Ces échantillons sont ensuite soit filtré directement sur site, soit filtré et conditionné comme décrit ci-dessous le soir même ou le matin suivant au laboratoire (filtre <0.22 µm en acétate de cellulose). Certains affluents, comme le Gazel, sont fortement incrustants, ce qui a eu comme conséquence la précipitation après les prélèvements de solides dans les tubes de prélèvements non acidifiés (alcalinité et ions majeurs). Ce problème a été résolu en diluant d'un facteur 10 ces échantillons non-microbiologiques avec de l'eau ultrapure sur site même ou le soir même de retour des échantillons au laboratoire.

II-4 Mesure et suivi des paramètres microbiologiques

II-4-1 Indicateurs d'antibiorésistance

Six gènes codant pour la résistance à 3 familles d'antibiotiques et deux gènes codant des éléments génétiques mobiles (EGM) ont été choisis pour qualifier l'antibiorésistance : les gènes *sul1* et *sul2* codant la résistance aux sulfonamides, les gènes *tetW* et *tetB* codant la résistance aux tétracyclines et 2 allèles du gène *bla_{CTX-M}* (*bla_{CTX-M-1}* et *bla_{CTX-M-9}*) codant la résistance aux β-lactamines, ainsi que les gènes *intI1* et *intI2* codant les intégrases des intégrons de classe 1 et 2.

II-4-2 Suivis des paramètres microbiologiques du bassin de la Claduègne

Pour les analyses microbiologiques, les prélèvements dans les bouteilles propres et stériles se font par immersion directe des bouteilles dans le cours d'eau après triple rinçage. Si le niveau d'eau est très bas, les bouteilles (> 500 mL) sont remplies en utilisant un bēcher stérile de 250 mL, lui-même rincé trois fois avec l'eau de rivière avant utilisation.

Après collecte, les flacons sont conservés à 4.0°C en glacière jusqu'à leur filtration à 0,2µm sur filtre dédié (soit au Pradel, soit après retour à l'IGE à Grenoble). Les filtres sont alors stockés en tube stérile à -80°C à l'IGE jusqu'à leur transfert à l'état congelé vers le LEM Lyon.

II-4-3 Mesure de l'activité nitrifiante

La mesure de la NEA dans les sols a été faite huit jours après la campagne d'échantillonnage et selon le protocole de Dassonville *et al.* (2011). Brièvement, un échantillon de sol a été placé dans des conditions optimales pour le fonctionnement des enzymes impliquées avec une source de NH_4^+ non-limitante, à 28 °C sous agitation pour assurer les conditions aérobies. Des flacons plasma (150 mL) contenant du sol frais (équivalent à 3 g de sol sec) et 6 mL d'une solution de sulfate d'ammonium (50 µg N-((NH_4)₂SO₄)/g sol sec) ont été incubés à 28 °C et sous agitation à 140 tpm (tours par minute). La production de nitrate (NO_3^-) et de nitrite (NO_2^-) a été suivie pendant 10 h à partir de prélèvements de 2 mL effectuées à la seringue toutes les deux heures pendant 10 heures (0 h, 2 h, 4 h, 6 h, 8 h, et 10 h). L'échantillon a été filtré à 0,22 µm et conservé à -20 °C jusqu'au dosage colorimétrique des NO_2^- et NO_3^- par un analyseur séquentiel (SmartChem® 200, KPM Analytics, Villeneuve-la-Garenne, France). La cinétique d'oxydation du NH_4^+ au cours des 10

heures d'incubation permet de calculer la vitesse de production du NO_2^- et du NO_3^- exprimée en $\mu\text{g N}-(\text{NO}_3^- + \text{NO}_2^-)/\text{h}/\text{gramme de sol sec}$ à partir de la pente de la régression linéaire ($R^2 > 0,975$).

II-4-4 Extraction d'ADN du sol et de l'eau

Le kit FastDNA® SPIN Kit for Soil (MP Biomedicals, Illkirch-Graffenstaden, France) a été utilisé pour extraire les ADN microbiens à partir de 0,25 g de sol frais en suivant les instructions du fabricant. Trois extractions indépendantes ont été faites pour un même échantillon puis les ADN extraits ont été regroupés. Les ADN d'échantillons d'eau ont été extraits avec le DNeasy PowerWater kit (QIAGEN) en suivant les instructions du fabricant à partir de filtres sur lesquels différents volumes d'eau ont été filtrés comme indiqué précédemment. La quantité d'ADN extrait a été mesurée à l'aide du Qubit® 2.0 Fluorometer (Invitrogen, Waltham, Etats-Unis) et la qualité par spectrophotométrie (NanoPhotometer® NP80, Implén, Munich, Allemagne) et par électrophorèse sur un gel d'agarose 1 %. Les ADN ont été stockés à -20°C jusqu'à leur utilisation.

II-4-5 Analyse microbienne par qPCR et PCR digitale

II-4-5-1 Quantification des bactéries nitrifiantes (archées- AOA et bactéries- AOB oxydatrices de l'ammonium) et des communautés bactériennes totales par qPCR.

La qPCR a été réalisée sur le CFX Connect™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad, Marnes-la-Coquette, France) pour quantifier le gène fonctionnel *amoA* des AOA et des AOB. La quantification du gène *rrs* codant l'ARNr 16S (région V3-V4), marqueur taxonomique fiable pour les procaryotes, s'est faite sur le CFX Duet™ Real-Time PCR System (Bio-Rad). Les données ont été collectées avec le logiciel CFX Maestro™ version 1.1 (Bio-Rad). Des duplicatas techniques ont été réalisés pour les quantifications des gènes *amoA*.

Les qPCR ont été faites avec la chimie de colorant SYBR Green. Le kit iTaq™ Universal SYBR® Green Supermix (Bio-Rad) a été utilisé pour les amplifications des gènes *amoA*. Le Mélange Master Mix PowerUp™ SYBR™ Green a été utilisé pour l'amplification du gène *rrs*. Le volume réactionnel final était de 20 μL avec 1 μM de l'amorce A23f et 1,25 μM de l'amorce A616r pour les AOA ou avec 1 μM du couple d'amorces pour les AOB. Celui pour la qPCR sur le gène *rrs* était à 25 μL avec 0,5 μM du couple d'amorces correspondant (Tableau 2). Le mix réactionnel pour la quantification du gène *rrs* comprenait 1 ng d'ADN et celui des AOA et des AOB comprenait 10 ng d'ADN avec en plus 0,2 mg/mL d'albumine de sérum bovin. La gamme étalon a été réalisée à partir d'un ADN plasmidique comportant les gènes *amoA* des AOA et des AOB pour des concentrations comprises entre 2,5 et $2,5 \cdot 10^6$ copies/ μL du gène *amoA* ou avec un ADN plasmidique comportant le gène *rrs* pour des concentrations comprises entre $1 \cdot 10^4$ et $1 \cdot 10^8$ copies/ μL de ce gène ($R^2 = 1$).

II-4-5-2 Quantification des GRA par qPCR

La qPCR a été réalisée sur le CFX Duet™ Real-Time PCR System (Bio-Rad) pour quantifier les gènes *sul1* et *sul2*. Les données ont été collectées avec le logiciel CFX Maestro™ version 1.1 (Bio-Rad). Les qPCR ont été réalisées en utilisant la chimie TaqMan avec le kit Sso Advanced™ Universal Probes Supermix (Bio-Rad). Le volume réactionnel final était de 20 μL avec 500 nM du couple d'amorces et 200 nM de sonde. Chaque gène a été quantifié en réalisant des duplicatas

techniques, soit deux plaques et chacune de ces plaques en comprenait également deux avec un dépôt de 10 ng d'ADN environnemental et l'autre de 1 ng d'ADN par puits.

II-4-5-3 Quantification des GRA et des EGM par PCR digitale

La ddPCR a été utilisée pour quantifier en duplex les gènes *tetW* et *tetB*, les 2 allèles du gène *bla_{CTX-M}* (*bla_{CTX-M-1}* et *bla_{CTX-M-9}*) et les gènes *intI1* et *intI2*. Cette méthode, plus sensible que la qPCR, permet la détection de très faibles différences de concentration de cibles et augmente la capacité à détecter des copies rares. Des duplicatas techniques ont été réalisés pour chacun des gènes avec 1 ng, 10 ng et 100 ng d'ADN par puits. Avec un seuil de détection fixé à 3 copies par réaction, les conditions expérimentales permettent une détection avec un seuil d'environ $5 \cdot 10^2$ à 10^3 copies/g de sol sec ou par L d'échantillon. Le kit ddPCRTM Supermix for Probes with no dUTP (Bio-Rad) a été utilisé. Le volume réactionnel final était de 20 µL avec 500 nM du couple d'amorces, 200 nM de sonde (Tableau 3). La lecture a été faite à l'aide du QX100TM Droplet DigitalTM PCR system (Bio-Rad) et les données ont été collectées avec le logiciel QX Manager 1.2, version QuantaSoft 1.7 (Bio-Rad).

II-5- Base de données hydro-bio-géochimiques

Une base de données regroupant toutes les données hydrologiques, chimiques et microbiologiques du BV de la Claduègne a été créée, et sera un livrable du projet.

La compilation de données ainsi créée permet de travailler avec des méthodes statistiques multivariées pour identifier les liens entre différentes données naturellement dispersées à l'origine entre différents fichiers, tels que :

- (1) les données hydrologiques recueillies automatiquement à haute fréquence aux exutoires de la Claduègne / du Gazel), ou la hauteur d'eau des rivières, le débit calculé, la conductivité électrique, la température, la turbidité...
- (2) le fichier des données chimiques et physico-chimiques (ions majeurs, métaux traces, pH, conductivité électrique, métaux traces, matières en suspension et matière organique), de nature 'basse fréquence' dont les échantillons sont prélevés soit automatiquement aux exutoires de la Claduègne et du Gazel, soit manuellement lors des tournées des opérateurs sur les sites. Les données sont dispersées sur plusieurs feuilles du fichiers dénommé 'OHMCV' qui cumulent environ 2000 lignes de données soit plus de 100 colonnes de données qui sont ou non renseigné.
- (3) Le fichier de données microbiologiques contenant les abondances de GRA et de leurs proxys (i.e. éléments génétiques mobiles), les abondances de gènes fonctionnels (i.e. gène de nitrification) et mesures d'activités microbiennes (i.e. activité de nitrification) se résume à ~ 200 lignes (donc ~200 échantillons). Le script Python 'HydroClad', codéveloppé dans le cadre de ce projet, permet de combiner ces fichiers en un seul fichier CSV.

On obtient un fichier centré sur les échantillons. La clef entre les banques de données chimiques et microbiologiques est le nom de l'échantillon, les données haute fréquence sont filtrées aux temps de prélèvement de l'échantillon.

L'intérêt du script réside dans :

- (1) la combinaison de fichiers dispersés en nature de données, dispersés en plage temporelle d'acquisition et dispersés en fréquence d'acquisition en un seul fichier où est associé à chaque ligne un prélèvement de l'ensemble des données disponibles. Le nombre de colonnes est de l'ordre de 200, avec ~ 40 éléments, donc 40 colonnes analysées en ICP-MS auxquelles s'ajoutent les données IC, les indications, poids, commentaires, paramètres physico-chimiques présents dans d'autres colonnes. Le script permet l'extraction de colonnes choisies, voir la combinaison de colonnes à contenu similaire (e.g. fondre les données IC et ICP d'éléments donnés) en série selon attributs attachés. Des calculs automatisés de bilan ionique et de conductivités molaires sont également intégrés.
- (2) la possibilité d'affichage de données sur des ordonnées multiples, c'est-à-dire par exemple de représenter dans une figure conjointement le débit de plusieurs rivières, les conductivités électriques acquises à haute fréquence, le pH et les concentrations des métaux en fonction par exemple du temps. N'importe quelle colonne peut être utilisée comme abscisse unique.
- (3) de faire des calculs mathématiques sur les colonnes ou sur des parties de colonne de façon simplifiée. Le logiciel se prête donc à la préparation et visualisation des données dans l'objectif d'effectuer par exemple une analyse multivariée des données sur la base des feuilles extraites. L'analyse multivariée en soit se fait avec des scripts et logiciels autres dédiés.
- (4) l'extraction facile de colonne choisies permet la préparation fiable de bases de données pour différents publics : BDD 'grand public', BDD plus fournie pour les chercheurs, etc.

III Résultats

III-1 Campagnes d'échantillonnage

Au cours des 27 mois du projet, sept campagnes de prélèvement d'eaux ont été effectuées aux dates 17 mars 2022, 5/6 mai 2022, 30 juin 2022, 11/12 janvier 2023, 29 novembre 2023, 2 avril 2024 et 6 mai 2024, qui ont permis de collecter au total 71 échantillons (Tableau 2). La Figure 6 représente une vue d'ensemble des paramètres essentiels mesurés au cours du projet BactResist : en bleu foncé et bleu clair les débits spécifiques de la Claduègne et du Gazel, les dates d'échantillonnage représentées en lignes rouges verticales, et les concentrations des 6 gènes indicateurs et de 4 métaux traces ainsi que le pH, déterminés à ces dates d'échantillonnage sont positionnés sur les lignes rouges (ou à proximité) pour une meilleure visualisation. Les débits varient fortement entre périodes d'étiage et de crues. Pour la Claduègne le débit est de l'ordre de $0.02 \text{ m}^3 \text{ s}^{-1}$ en étiage, mais peut dépasser $100 \text{ m}^3 \text{ s}^{-1}$ en période de crue.

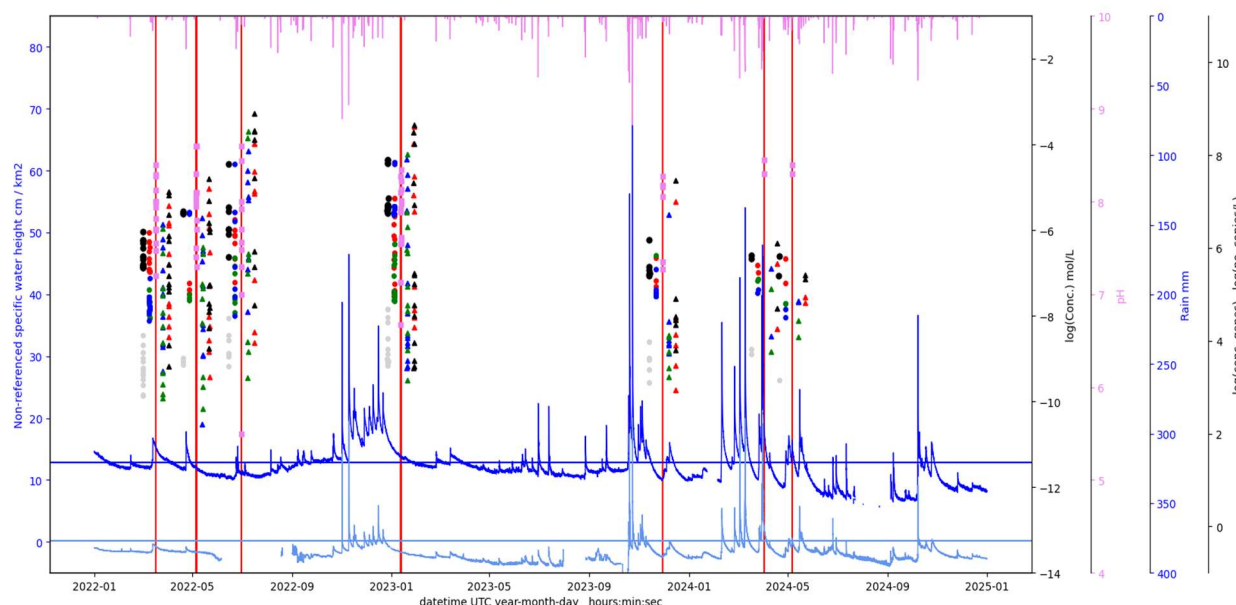


Figure 6 : Hydrogramme de la Claduègne : précipitations (lignes roses) et niveaux d'eau spécifiques pour les rivières Claduègne (bleu foncé) et Gazel (bleu clair) avec les limites hautes et basses eaux en lignes bleues horizontales. Les lignes verticales rouges indiquent les dates d'échantillonnage au cours du projet BACTRESIST avec des symboles représentant certaines données échantillonnées à ces dates : positionnées à droite des lignes pour une meilleure visualisation, les données *intI1* (cercles bleus), *sul1* (flèche rouge vers la gauche), *tetW* (carrés verts) et la somme de *intI1* + *intI2* + *sul1* + *sul2* + *tetW* + *tetB* (losanges noirs). Les métaux, symbolisés par des cercles Zn (rouge), Cu (vert), Ni (bleu), Pb (noir), sont placés à droite, tandis que le pH (carrés violets) est sur la ligne.

Les résultats du Gazel suivent les mêmes tendances, même si les pics de crues sont plus resserrés et moins élevés, en lien avec le débit plus faible de cet affluent de la Claduègne.

Les lignes horizontales représentent les limites haute et basse fixées arbitrairement à $Q=10^{0.2} \text{ L.s}^{-1} \cdot \text{km}^{-2} \cdot 43 \text{ km}^2 = 68.1 \text{ L s}^{-1}$ (Claduègne, bleu), et $Q=10^{0.6} \text{ L.s}^{-1} \cdot \text{km}^{-2} \cdot 3.4 \text{ km}^2 = 13.5 \text{ L s}^{-1}$ (Gazel, bleu clair). Avec ces limites, toutes les campagnes ont été effectuées en régime 'hautes eaux' pour

la Claduègne sauf les campagnes 5/6-5-2022 (régime limite hautes - basses eaux) et 29/11/2023 (basses eaux). Pour le Gazel, seules les campagnes 2022-03-17 et 2024-05-06 ont été menées en régime de hautes eaux. La limite définie pour le Gazel est sans doute un peu élevée. Aucune campagne n'a été effectuée en régime de crue.

III-2 Fonctionnement hydrologique du bassin versant

La Figure 7 présente l'évolution temporelle du débit mesuré à l'exutoire de la Claduègne (station 'CLA'). Les crues majeures se présentent de façon groupée en automne 2022, automne 2023 et printemps 2024, et plus précisément aux dates 1/11 à 24/12 2022, 19/10 à 13/11 2023 et 8/2 à 4/4/2024 (rectangles rouges sur fond jaune). Le printemps 2022 est caractérisé par l'absence de crues majeures, ce qui est relativement 'anormal' pour cette saison.

La crue maximale présente un débit de 116 m³/s. En incluant celle-ci, 4 événements dépassent 40 m³/s et 11 événements au total dépassent 10 m³/s, cette valeur est ici arbitrairement définie comme limite basse des crues majeures. Toutes les crues se situant en dehors des périodes de grandes crues (hors rectangles jaunes) ont des débits inférieurs à 4.5 m³/s. Les événements des dates 30/6 et 13/7/2023, se démarquent par leurs débits relativement élevés de 4 m³/s environ (flèches rouges) par rapport aux crues mineures de 0.6 à 2 m³/s, comptabilisant 14 événements sur l'ensemble de la période présentée (flèches bleues). Le régime à l'étiage se situe entre 0.015 et 0.03 m³/s, et ce sur toute la durée du projet (Figure 7, zone rosée).

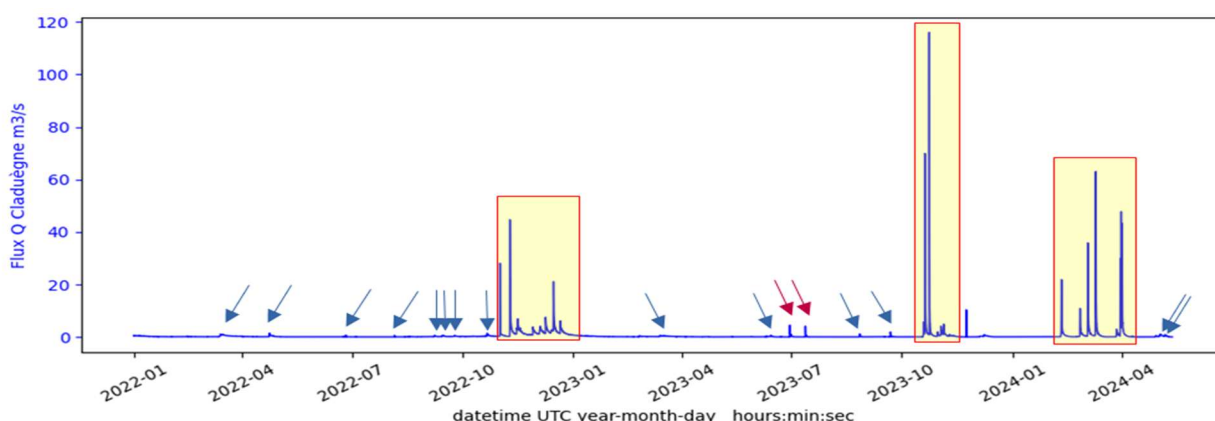


Figure 7 : Crues regroupées (rectangle rouge sur fond jaune) en période des grandes crues, et crues moyennes (flèche rouge) et faibles (flèche bleue) en période d'étiage mesuré à l'exutoire de la Claduègne.

III-3 Suivi de T et EC à haute fréquence

La Figure 8 présente les paramètres physicochimiques autres mesurés à haute fréquence (HF) aux deux stations CLA et GAZ : en traits fins rouge les mesures HF de la température de l'eau, avec leurs moyennes journalières surimposées en traits épais jaunes (CLA) et verts (GAZ). De même pour la conductivité électrique (compensée en température, 25 °C) en noir, avec les moyennes journalières surimposées.

On observe une cyclicité annuelle autant en température T ($4 \leq T \leq 23$ °C) qu'en conductivité électrique CE ($370 \leq CE \leq 570$ µS/cm) de l'eau. En période estivale (1/7 à 7/8 pour 2022 et 29/6 à 1/9 pour 2023) des valeurs aberrantes ne sont pas présentées (dénoyage des capteurs T et CE).

Les températures sont très proches dans les deux cours d'eaux tandis que la conductivité électrique est systématiquement plus élevée dans le Gazel. Certains affluents du Gazel sont extrêmement incrustants, les galets dans les lits de rivière étant souvent recouverts intégralement de précipités calcaires.

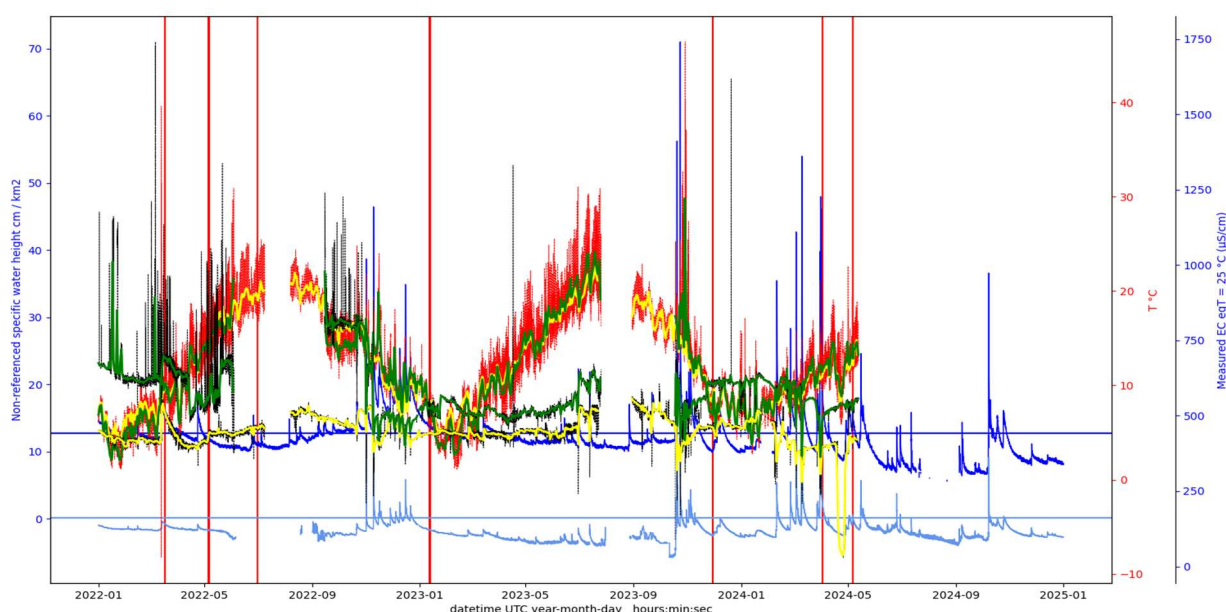


Figure 8 : Données des hauteurs d’eau de la température et de la conductivité électrique enregistrées à haute fréquence (HF) sur les deux sites ‘CLA’ et ‘GAZ’ proche des exutoires de la Claduègne et du Gazel. Les traits épais jaune (CLA) et vert (GAZ) représentent les valeurs moyennes journalières en température (sur fond des données HF en rouge) et de la conductivité électrique compensées à la température équivalente de 25 °C (sur fond des données HF en noir).

On s’attend donc à des charges ioniques un peu plus élevées dans le Gazel par rapport à la Claduègne. Ainsi les données CE enregistrées corroborent avec les observations visuelles. Les fluctuations en CE observées sur la journée sont associées aux variations de respiration-photosynthèse diurnes. Cette variabilité produit et détruit de l’acide à l’échelle journalière provoquant la précipitation et re-dissolution cyclique de minéraux, surtout calcaires. Les variations extrêmes observées en juillet sont liées à un effet de dénoyage du capteur de conductivité, la hauteur d’eau de la Claduègne pouvant se résumer alors à un filet d’eau ne recouvrant plus ledit capteur. Les données journalières moyennes sont présentées dans le Tableau 3.

Tableau 3 : Moyennes journalières des données haute fréquence des stations ‘GAZ’ et ‘CLA’ aux dates d’échantillonnage du projet BactResist

Date échantillonnage	T °C GAZ ; CLA	EEC $\mu\text{S cm}^{-1}$ GAZ ; CLA	Turb ^{a)} g L ⁻¹ GAZ ; CLA	Débit L s ⁻¹ GAZ ; CLA	HE _{nr} ^{b)} cm GAZ ; CLA
2022-03-17	9.9 ; 9.6	694.1 ; 512.3	-0.1 ; 0.4	17.4 ; 687.0	n.d. ; 65.9
2022-05-05	14.1 ; 13.9	550.9 ; 415.7	0.0 ; 0.1	10.4 ; 92.6	-5.6 ; 52.0
2022-06-30	n.d. ; 19.6	-n.d. ; 460.8	1.6 ; 0.1	n.d. ; 24.5	n.d. ; 47.2
2023-01-11	6.9 ; 7.5	525.4 ; 442.1	0.0 ; 0.2	10.5 ; 358.3	-5.5 ; 59.5
2023-11-29	6.9 ; 8.2	605.6 ; 463.2	12.1 ; 0.3	5.2 ; 18.3	-8.4 ; 43.4
2024-04-02	11.4 ; 10.9	477.1 ; 394.3	0.0 ; 19.1	136.6 ; 1661.1	7.4 ; 78.3
2024-05-06	14.4 ; 12.4	517.8 ; 410.6	0.0 ; 20.5	28.1 ; 554.0	-1.2 ; 63.0
Moyennes	10.6 ; 10.4	561.9 ; 439.7	1.9 ; 5.8	34.7 ; 561.8	-2.7 ; 59.2

a) données non critiquées. b) HE_{nr} = hauteur d’eau non référencée par rapport au niveau de profondeur absolu.

III-4 Suivi des paramètres géochimiques

Les valeurs de pH acquises à basse fréquence par insertion directe de la sonde dans la rivière (carrés violets) ou dans les bouteilles de prélèvement automatique (carrés verts) varient entre pH 7,2 et 9,5 (Figure 9). On observe des valeurs globalement plus élevées en période de crue. Cela suggère la présence d'eaux issues d'un milieu carbonaté au moins partiellement fermé, *i.e.* d'eaux qui ne sont pas en contact avec le gaz carbonique atmosphérique, responsable de l'acidification des eaux ouvertes à l'atmosphère.

De façon générale, les cations majeurs suivent en concentration la tendance classique $\text{Ca} > \text{Mg} \sim \text{Na} > \text{K}$ constatée dans la majorité des eaux sédimentaires. Il y a stabilité relative des concentrations en périodes de hautes autant qu'en basses eau, en dehors des crues ($\text{Ca} \sim 1.7$ à 2.6 , $\text{Na} \sim 0.6$ à 1 , Mg et $\text{SO}_4^{2-} \sim 0.4$ à 0.6 , $\text{Si} \sim 0.2$ à 0.4 , $\text{K} \sim 0.04$ à 0.07 mmol/L).

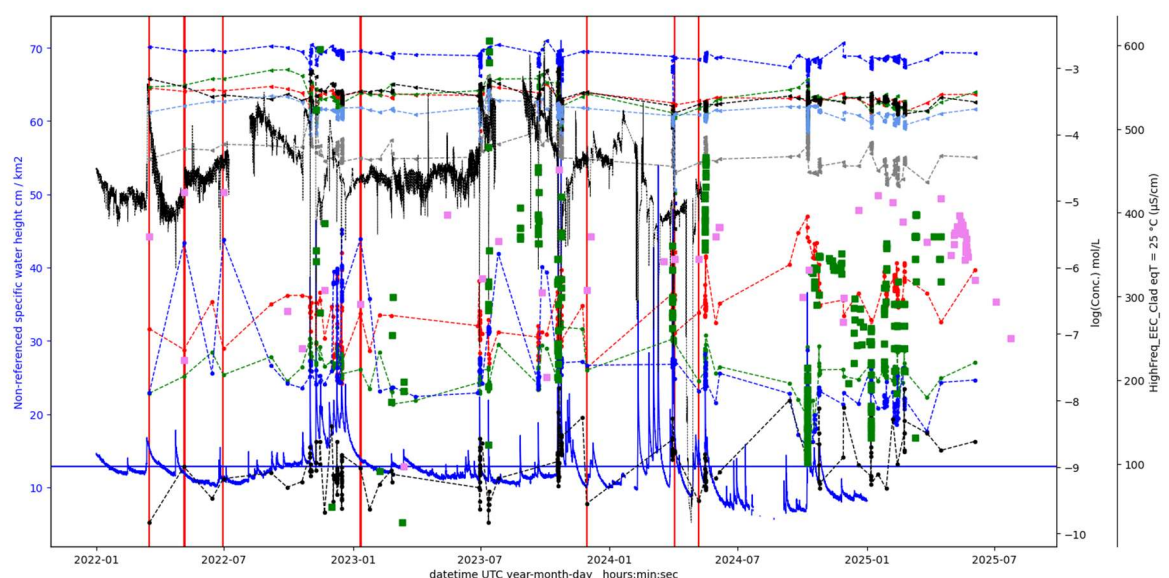


Figure 9. Série temporelle de la station 'CLA' des concentrations mesurées en ICP-MS des ions majeurs (Ca, Mg, Na, K, S, interprété en SO_4^{2-} , et Si, en triangles bleu, rouge, vert, gris, noir et bleu clair respectivement) et de métaux traces (Zn, Cu, Ni, Pb en cercles rouges, bleu, vert noir), ainsi que de la CE compensée en température (25 °C, traits noirs), et du pH, mesuré directement dans la rivière (carrés rose) ou dans les bouteilles de prélèvements ISCO (carrés verts).

Les Figures 10 et 11 représentent un zoom de la Figure 9 sur les crues les mieux documentées en concentrations métalliques. La Figure 10 présente une triple crue, dont une moyenne et deux majeurs (19 20 et 24 octobre 2023) tandis que la Figure 11 présente une crue moyenne à la date du 16 mai 2024. Sur l'ensemble des 4 événements on constate en phase de crue une diminution concertée et régulière de tous les majeurs sauf K qui lui augmente en phase de crue. Aussi, tous les majeurs rejoignent rapidement leur niveau de concentration avant crue sauf K montant une concentration post-crue inférieure aux concentrations pré-crue qui tend à remonter plus lentement que les majeurs autres. Cela suggère un réservoir d'origine différent de K par rapport aux autres éléments discutés, éventuellement un mode de rétention bien différent de cet ion. On peut suggérer une distribution différente en fonction de la propriété 'nutriment' de cet ion. Concernant les métaux trace, il y a diminution de Zn, mais augmentation constatée de Ni et Cu en phase de crue sur les quatre événements, même que les variations sont relativement atténuées sur la Figure 11.

Ces variations sont vraisemblablement liées au double processus de changement de concentration qui s'opposent l'un à l'autre : l'eau de pluie rejoignant rapidement la rivière peut s'apparenter à de l'eau distillée vu sa faible charge ionique, elle dilue de fait la charge ionique des eaux de la

rivière. A l'inverse, l'eau infiltrée dans le sol chasse l'eau du sol vers les rivières, l'eau du sol s'étant de fait enrichie en charge ionique durant les temps plus secs, ce qui augmente les concentrations ioniques dans la rivière. Les chutes de concentrations sont alors d'autant plus marquées que la période sans pluie était longue avant l'évènement observé (cas de la crue moyenne en Figure 10 versus Figure 11). Des observations tout à fait similaires sont faites sur d'autres crues autant pour 'CLA' que pour 'GAZ' (données non présentées).

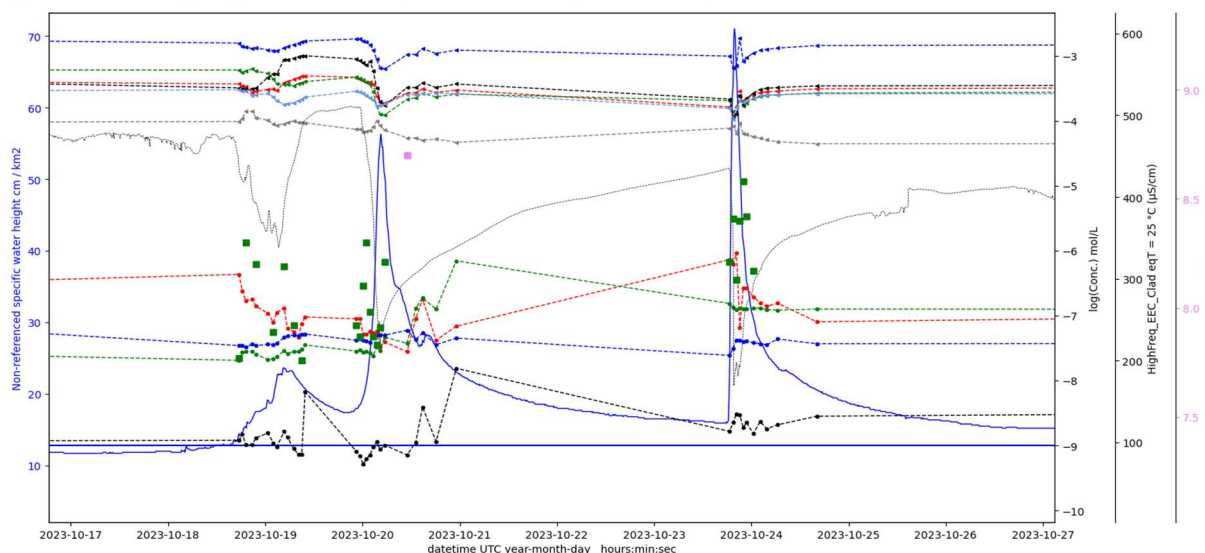


Figure 10 : Zoom de la Figure 9 sur des événements de crues visualisant leurs effets sur les concentrations des éléments majeurs et traces à l'automne 2023.

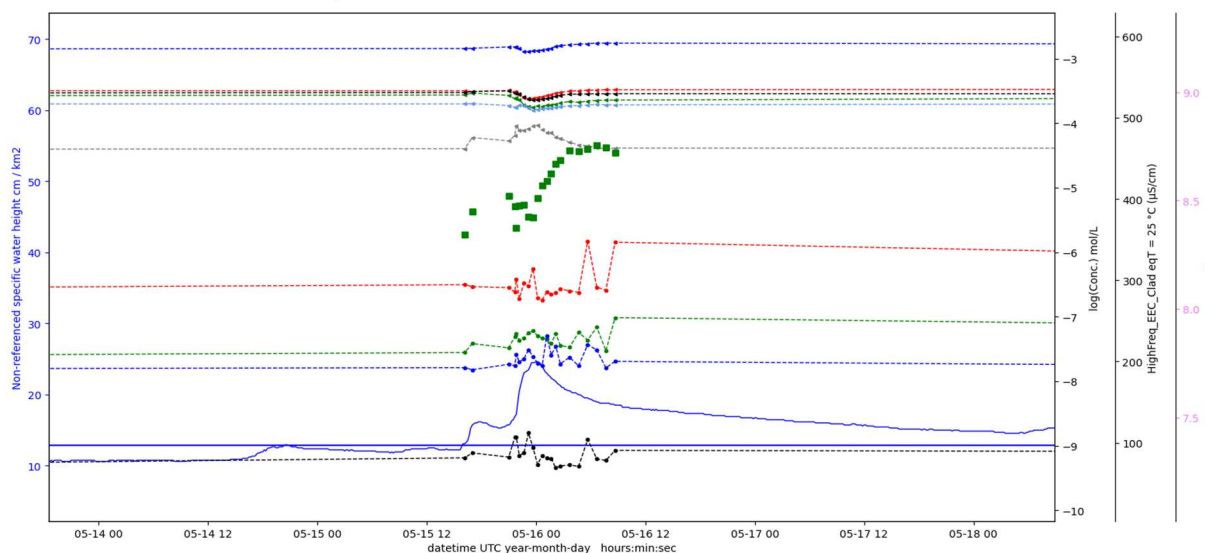


Figure 11 : Zoom de la Figure 9 sur des événements de crues visualisant leurs effets sur les concentrations des éléments majeurs et traces au printemps 2024.

Nota bene :

Les données de turbidité à haute fréquence nécessitent d'être encore validées et critiquées et ne sont pas exploitables à la date de ce rapport.

La Figure 13 peut être assimilée à une représentation spatiale des concentrations en ions majeurs et métaux traces regroupées en fonction de la typologie des sites définie dans le Tableau 1. Pour Ca, SO₄, Cu et Zn, on observe une tendance générale à la diminution des concentrations dans

l'ordre STEP > Elevage > Urbain, Vigne, Mélange > Forêts. Il sera intéressant de vérifier si les GRA et BRA suivent la même tendance dans le bassin versant.

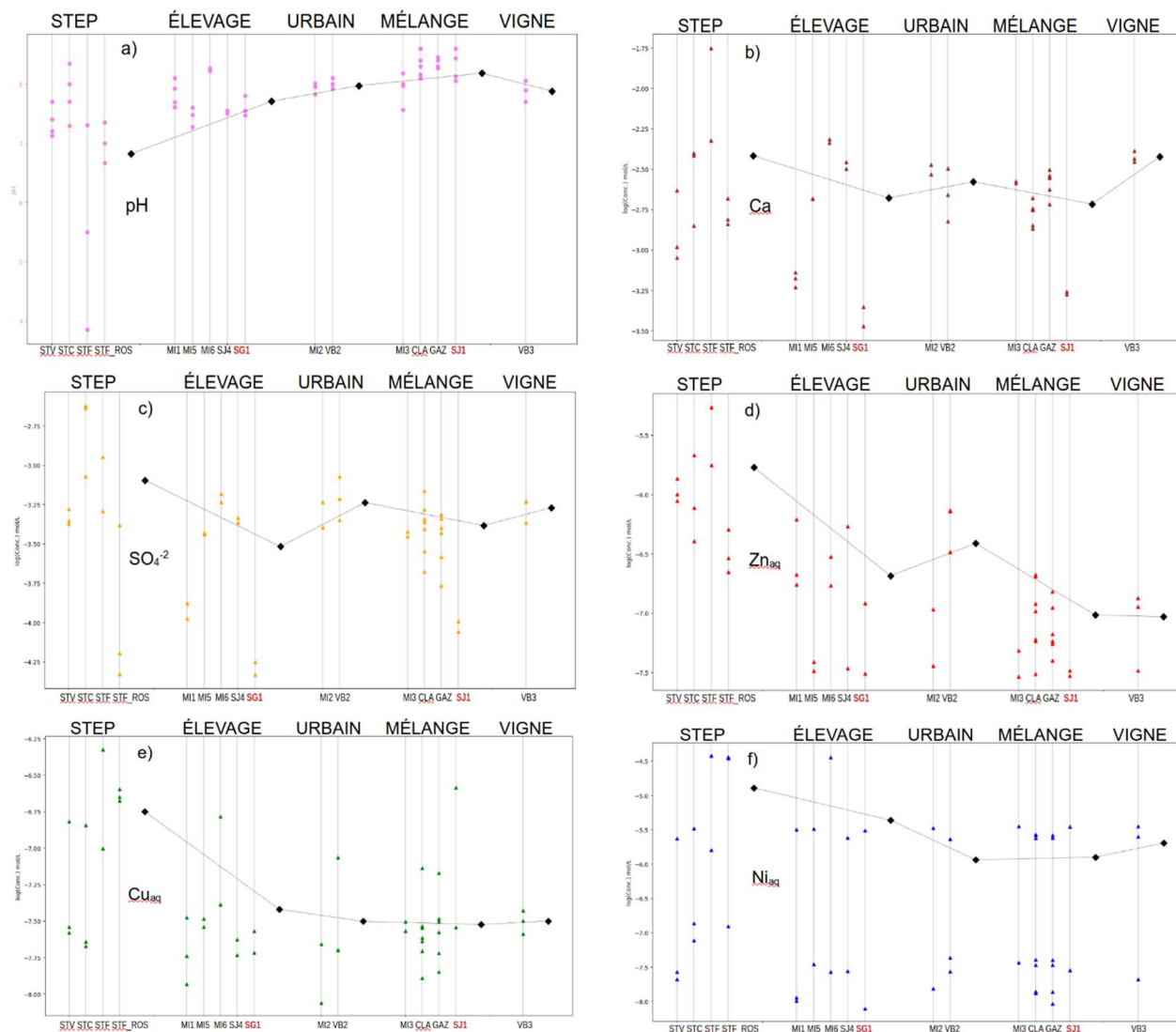


Figure 13 : Représentation spatiale du pH et des concentrations en ion majeurs et métaux traces dans les différents sites étudiés regroupés par typologie. Les moyennes des concentrations calculées pour chaque site sont présentées à gauche de chaque groupe d'usage des sols (Symboles noirs).

III.5. Suivis des indicateurs microbiens

III-5-1 Caractérisation et dynamique de l'antibiorésistance dans le bassin versant

III-5-1-1 Prévalence des GRA et EGM dans les milieux récepteurs

Les analyses de la charge en GRA et EGM des eaux du bassin versant ont porté sur des échantillons prélevés sur 16 points d'échantillonnage des 13 sites, incluant les exutoires du Gazel et de la Claduègne, au cours de plusieurs campagnes menées en 2022, 2023 et 2024. Les échantillons proviennent de cours d'eau intermittents alimentant la rivière Claduègne et son affluent le Gazel. Comme déjà indiqué, les bassins versants de ces cours d'eau sont soumis à différents types et

niveaux d'anthropisation (activités d'élevage, viticole, forestière, urbaine, touristique) contribuant directement ou indirectement à une potentielle contamination par des GRA et EGM.

Comme on peut le voir dans le Tableau 4 qui présente l'ensemble des mesures de gènes indicateurs au cours du projet en considérant la globalité des échantillons au cours de chaque campagne, les gènes *sul*, *tet* et les intégrons de classe 1 (gène *intI1*) ont toujours été détectés. En revanche, aucun gène *bla_{CTX-M}* indicateur de la présence d'*Escherichia coli* ESBL (*E. coli* productrices de bêta-lactamases à spectre élargi) n'a été retrouvé en dehors de *bla_{CTX-M1}* détecté lors de la campagne du 6 mai 2022, dans un échantillon prélevé à la station d'épuration de la ferme caprine au Pradel (site STF) et un échantillon de la station d'épuration du camping de Villeneuve de Berg (site STC).

Tableau 4 : Concentrations moyennes de chaque gène suivi pour chaque site.

Site	No. Echant.	Log(<i>intI1</i>)	Log(<i>intI2</i>)	Log(<i>sul1</i>)	Log(<i>sul2</i>)	Log(<i>tetW</i>)	Log(<i>tetB</i>)	Log(Som_Gènes)
STEP								
STV	4	7.39 ± 0.63	5.07 ± 0.94	7.97 ± 0.68	7.72 ± 0.85	6.27 ± 0.76	5.02 ± 0.90	8.24 ± 0.70
STC	4	7.49 ± 1.40	5.89 a)	7.64 ± 1.69	7.58 ± 2.13	7.91 ± 2.30	5.62 a)	8.29 ± 1.68
STF	8	7.36 ± 0.68	6.35 ± 0.66	7.93 ± 0.89	7.51 ± 1.02	7.75 ± 1.70	5.33 ± 0.47	8.30 ± 0.85
STF_ROS	4	7.37 ± 0.47	5.88 ± 0.36	8.19 ± 0.81	7.73 ± 0.50	6.02 ± 1.36	5.54 a)	8.37 ± 0.62
Élevage								
MI1	4	3.91 ± 0.04	3.62 a)	3.78 a)	4.72 a)	3.73 ± 0.57	b)	4.88 ± 0.84
MI5	4	5.15 ± 0.61	b)	4.82 ± 0.51	4.16 ± 0.26	4.35 ± 0.35	2.51 ± 0.17	5.38 ± 0.36
MI6	4	6.04 ± 0.04	5.03	6.68 ± 0.17	6.65 ± 0.99	6.23 ± 0.36	3.71 a)	7.09 ± 0.20
SJ4	4	b)	b)	b)	4.32 a)	b)	b)	4.32 a)
SG1	4	4.33 ± 0.20	3.07 a)	4.06 ± 0.91	4.97 ± 1.27	5.10 ± 0.11	b)	5.41 ± 0.25
Urbain								
MI2	4	4.74 ± 0.86	b)	b)	b)	2.38 a)	b)	4.74 ± 0.86
VB2	4	6.75 ± 0.43	4.70 ± 0.69	6.99 ± 0.35	6.38 ± 0.41	5.66 ± 0.74	4.20 ± 0.86	7.27 ± 0.36
Mélange								
MI3	5	4.62 ± 0.65	3.72 a)	5.11 ± 0.73	5.43 ± 1.43	4.60 ± 0.94	2.15 a)	5.68 ± 0.86
CLA	7	5.35 ± 0.80	3.15 ± 0.72	5.73 ± 1.08	4.90 ± 0.78	4.57 ± 0.56	3.35 ± 0.75	5.94 ± 0.83
GAZ	6	4.90 ± 0.70	3.98 ± 0.79	5.03 ± 0.62	4.90 ± 0.80	4.45 ± 0.89	3.45 ± 0.22	5.48 ± 0.70
SJ1	4	4.27 ± 0.54	b)	3.89 ± 0.71	3.50 ± 0.11	2.91 ± 0.01	2.50 ± 0.02	4.48 ± 0.66
Vigne								
VB3	4	3.56 ± 0.88	3.09 a)	3.94 ± 0.38	4.44 ± 1.39	2.84 a)	b)	4.62 ± 0.86

Les écarts types sont calculés à partir des valeurs en Log des concentrations de gènes. a) Valeur unique supérieure à la limite de détection. b) Aucune valeur déterminée au-dessus de la limite de détection ou échantillon non disponible (ruisseau à sec).

Ainsi, en considérant la globalité des échantillons, toutes campagnes confondues, ce sont les gènes *sul1*, *sul2*, *intI1* et *tetW* qui sont les plus fréquemment retrouvés sur le BV, et dont l'abondance est la plus élevée, avec des valeurs allant de 10^2 à 10^8 copies, suivis d'*intI2* et de *tetB*, avec des valeurs allant respectivement de 10^2 à 10^7 et de 10^2 à 10^6 copies. Globalement, pour un échantillon donné, les abondances de *intI1* et des gènes *sul*, notamment celle de *sul1*, sont équivalentes *i.e.* du même ordre de grandeur, en accord avec les données de la littérature.

Pour faciliter les interprétations sur la charge en GRA, nous avons fait le choix de caractériser chaque site à chaque campagne par la somme de l'abondance de tous les GRA détectés (Tableau 5) présentés en plus des valeurs individuelles mesurées (Figure 14).

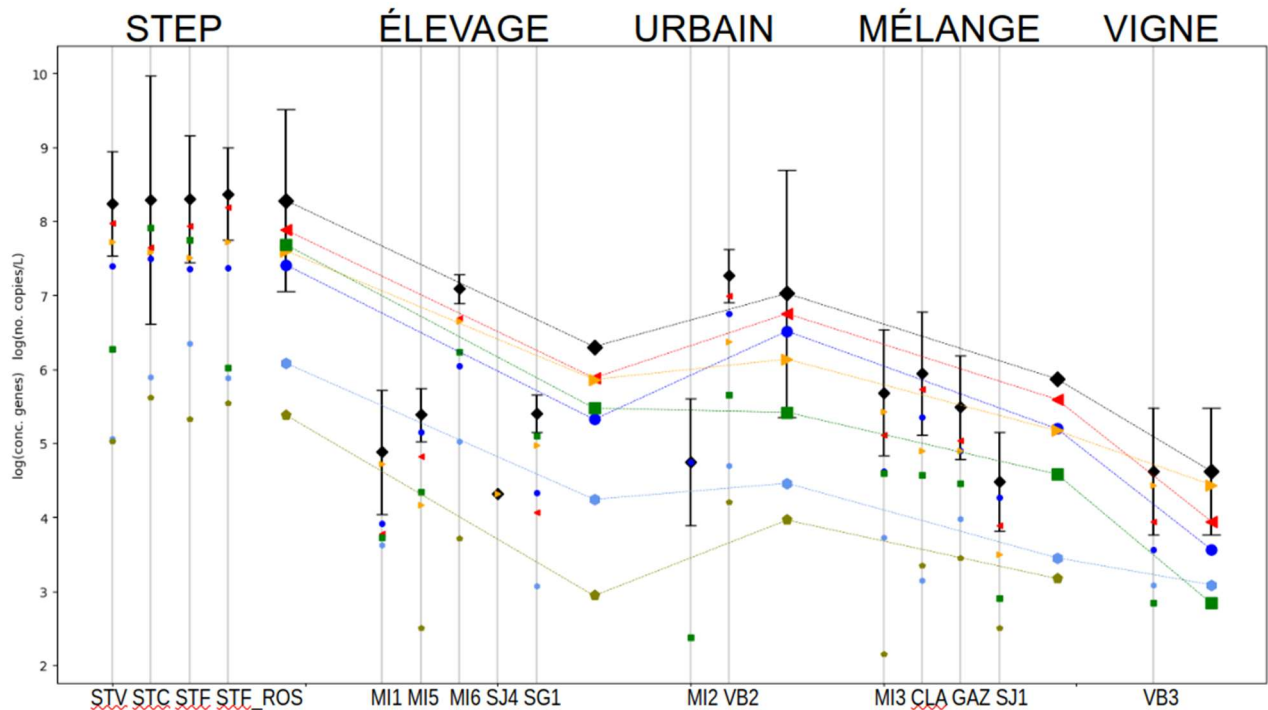


Figure 14 : Abondances (en Log) des 4 gènes de résistance aux antibiotiques (*sul1*, *sul2*, *tetB*, *tetW*) et des 2 gènes de mobilité (*intI1*, *intI2*) dans les différents sites du bassin versant de la Claduègne mesurées au cours des campagnes d'échantillonnage de 2022, 2023 et 2024 (symboles sur lignes grises) présentées selon usage du sol/activité humaine. Les symboles agrandis à droite des lignes verticales représentent les concentrations moyennes de chaque gène pour une typologie de sites. Les symboles noirs grossis représentent les moyennes des abondances cumulées de tous les gènes. Pour plus de clarté visuelle, ces valeurs moyennes sont reliées par des lignes et présentent des barres d'erreur.

Les abondances observées de ces gènes sont clairement liées à la nature des sources et/ou au contexte d'anthropisation avec une diminution des charges en gènes indicateurs dans les eaux depuis les sites plutôt urbains (STEP, Urbain) vers les sites plus agricoles et les exutoires. Cette diminution est en accord avec les données de la Figure 13 qui montre cette même diminution de concentration (avec une certaine variabilité intra et inter-sites, sans doute liée à l'intermittence et la variabilité des rejets) pour les ions majeurs (Ca et SO₄) et les éléments traces, (notamment le zinc (surtout dans les eaux de STEP), et l'acidité des eaux (i.e. évolution d'eaux de rejets acides vers des eaux moins anthropisées, au pH plus « naturel » vers l'exutoire).

En combinant les données des figures 13 et 14, nous avons pu dégager une corrélation significative positive entre usage des sols/activités humaines, métaux traces et gènes indicateurs, montrant que l'usage du sol apparaît comme une variable déterminante pour la dynamique de l'antibiorésistance dans le bassin versant de la Claduègne. Ces résultats de corrélations observées restent toutefois fragiles au vu des fortes variations de données entre sites et entre campagnes, et du nombre relativement faible d'échantillons.

La Figure 15 présente les résultats sous forme d'une matrice de corrélation qui permet une appréciation plus nuancée et quantitative des données et des tendances, en intégrant d'autres

Z A B R

Zone Atelier Bassin du Rhône

paramètres tels que la hauteur d'eau ou le débit des rivières, ou encore leur turbidité. Comme attendu, on observe une très bonne corrélation des différents paramètres exprimant l'écoulement de l'eau pour un cours d'eau donné (hauteur d'eau versus débit) et entre les deux cours d'eau (Gazel versus Claduegne), compte tenu de la similitude de l'hydrologie des 2 bassins à cette échelle spatiale

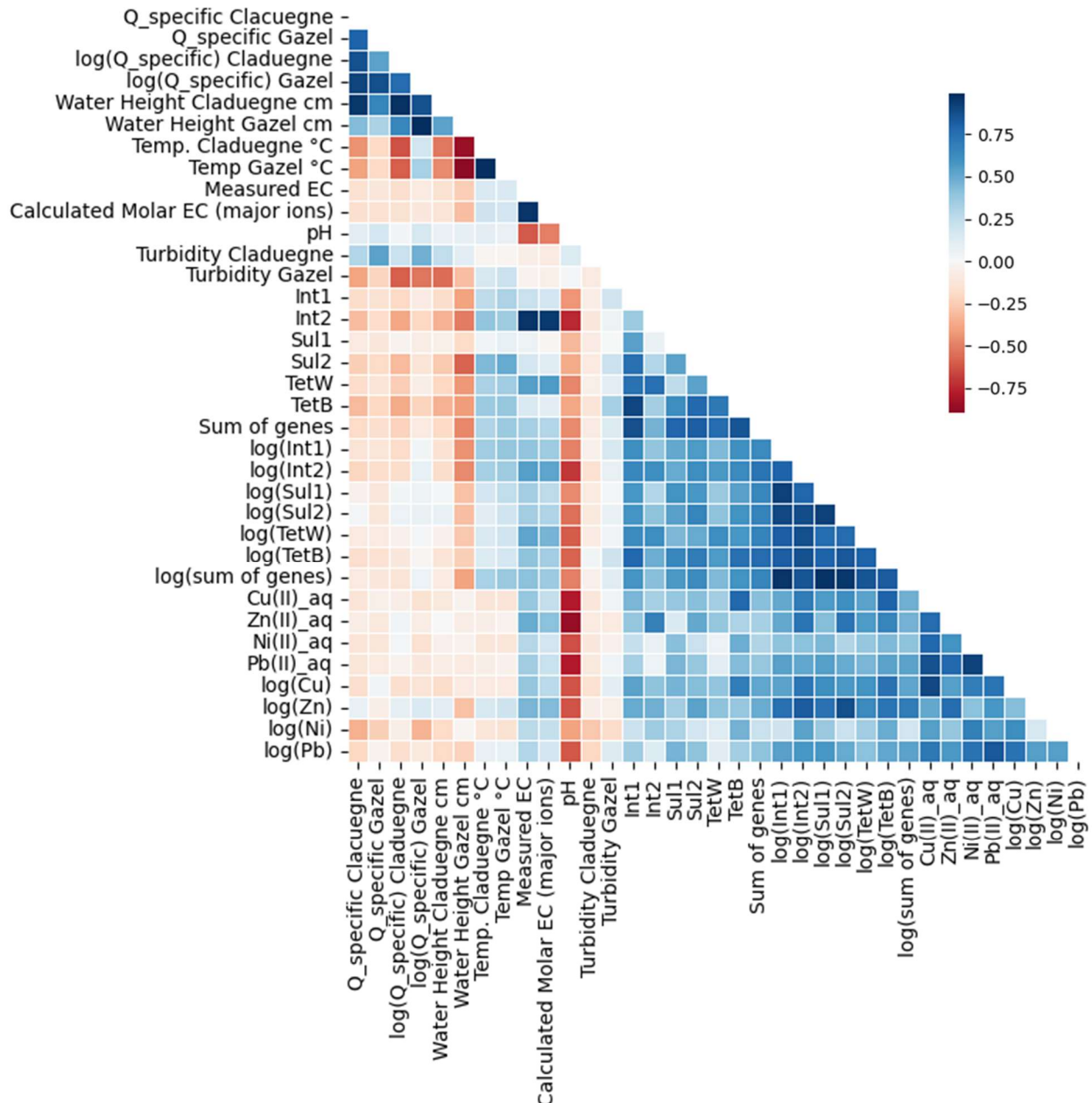


Figure 15 : Matrice de corrélation des différents paramètres hydro-bio-géochimiques mesurés et calculés. La couleur bleue ou rouge indique corrélation positive ou négative, respectivement.

On peut aussi observer une bonne corrélation entre les concentrations des différents gènes indicateurs, ce qui suggère des sources et rejets similaires pour les 6 gènes suivis (voir Figure 17 ci-après). La même observation peut être faite pour les éléments traces, indiquant sans doute des co-émissions entre métaux et avec les gènes indicateurs.

Par ailleurs, les concentrations en éléments traces apparaissent très bien corrélées au pH des eaux (anti-corrélation) en cohérence avec la solubilité des métaux plus élevée en milieu acide. On observe cette même tendance pour les gènes indicateurs avec le pH, ce qui est aussi cohérent si on considère la nature des rejets observés (eaux de STEP ou de laiterie) sur les sites sources (STEP, Urbain).

Enfin, la figure 15 semble montrer que la dynamique des gènes indicateurs ne semble pas du tout corrélée au débit et à la turbidité des rivières, ce qui semble pour le moins étonnant, mais s'explique sans doute par des effets opposés de certains facteurs (débit et dilution) conduisant à des évolutions non linéaires. Ceci sera évalué plus en détail dans la figure 21 ci-après.

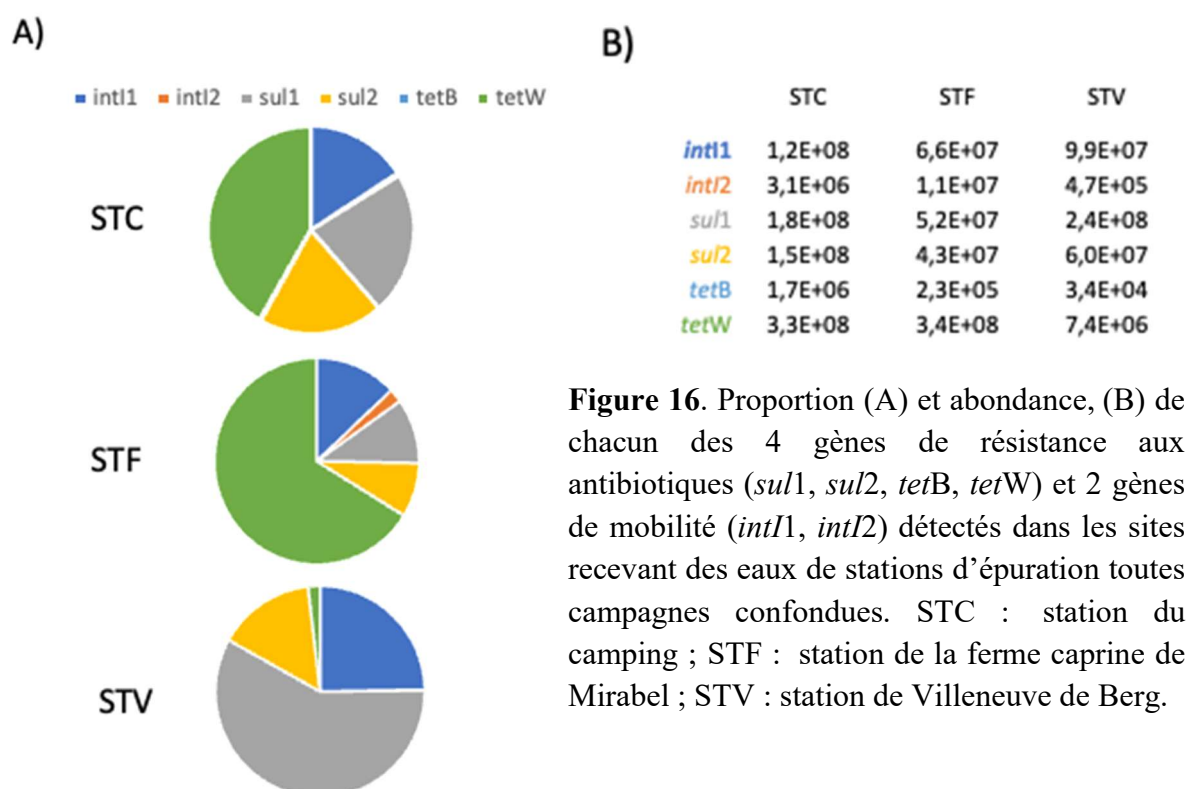
Globalement, on peut estimer que, quelle que soit la campagne d'échantillonnage, et comme attendu, les échantillons prélevés en zone de forêt peu anthropisée (site SJ1) sont les moins chargés en gènes d'antibiorésistance. Au contraire, et comme attendu, les eaux prélevées à proximité ou en sortie de STEP sont les plus chargées, aussi bien en quantité qu'en diversité de gènes détectés. Ainsi, les 4 gènes de résistance et les 2 gènes de mobilité sont détectés dans tous les sites STF, STC et STV avec des valeurs supérieures à 10^7 copies de gène (Figure 16).

Tableau 5 : Concentrations moyennes cumulées de chaque gène à chaque typologie de sites.

Site	No. Echant	$\log(int11)$	$\log(int12)$	$\log(sul1)$	$\log(sul2)$	$\log(tetW)$	$\log(tetB)$	$\log(\text{Sum_Genes})$
STEP	16	7.41 ± 0.97	6.08 ± 1.21	7.88 ± 1.32	7.60 ± 1.06	7.68 ± 1.60	5.38 ± 0.95	8.28 ± 1.23
Elevage	20	5.32 ± 0.83	4.24 ± 0.94	5.88 ± 1.23	5.86 ± 1.03	5.47 ± 0.98	2.94 ± 0.79	6.30 ± 0.92
Urbain	8	6.51 ± 1.41	4.46 ± 0.69	6.75 ± 0.35	6.13 ± 0.41	5.42 ± 1.28	3.96 ± 0.86	7.02 ± 1.67
Mélange	12	5.19 ± 0.81	3.45 ± 0.86	5.59 ± 0.93	5.17 ± 0.95	4.58 ± 0.71	3.17 ± 0.68	5.87 ± 0.84
Vigne	4	3.56 ± 0.88	3.09 a)	3.94 ± 0.38	4.44 ± 1.39	2.84 a)	b)	4.62 ± 0.86

Les écarts-types sont calculés à partir des concentrations des gènes en Log. a) Valeur unique supérieure à la limite de détection.

b) Aucune valeur déterminée supérieure à la limite de détection, ou échantillons non disponibles (e.g. cours d'eau à sec).



Parmi les échantillons prélevés sur une zone d'élevage, on note une plus forte charge pour les échantillons provenant d'une zone d'élevage porcin (site MI6) que pour ceux provenant d'élevage bovin et/ou ovin (SG1, MI1, MI5) (Figure 14). Les échantillons de zone viticole (site VB3), mais également de la zone urbaine du site MI2 sont également faiblement chargés. Il est à noter qu'à activité/source identique *i.e.* élevage, urbanisation, la charge en GRA/EGM semble liée à la surface/intensité de l'activité. Ainsi, les 2 sites sous influence de l'urbanisation, VB2 et MI2, diffèrent par leur charge en GRA/EGM, avec une charge plus élevée pour le premier, probablement en lien avec la surface de la zone considérée (surface plus importante pour VB2 correspondant à Villeneuve de Berg (3029 habitants) que pour MI2 correspondant à un lotissement de Mirabel (commune de 767 habitants). De même, on notera l'absence de détection de GRA/EGM sur le site SJ4 sur lequel un élevage de porc vient juste de s'installer alors que le site MI6, très chargé en ARG, est concerné par un élevage intensif de porcs installé de longue date et situé en prime près des berges du Gazel.

III-5-1-2 Dynamique temporelle des GRA et saisonnalité

Les échantillons prélevés aux exutoires de la Claduègne et du Gazel présentent, quant à eux, une grande variabilité aussi bien dans la diversité que dans l'abondance des GRA et EGM détectés, selon les campagnes d'échantillonnage, comme on peut le voir dans la Figure 17.

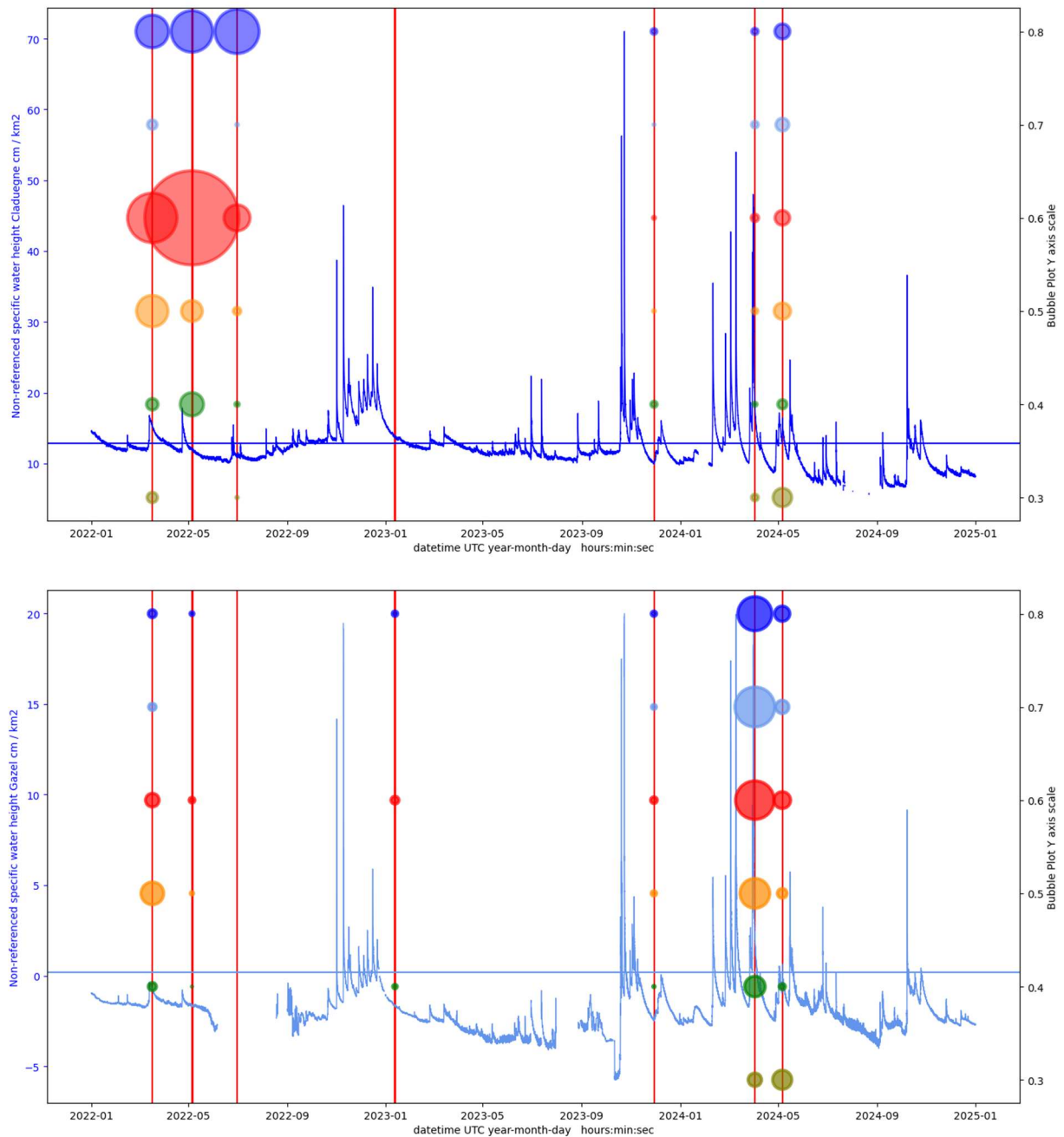


Figure 17. Visualisation de l'abondance des 4 gènes de résistance aux antibiotiques *sul1*, *sul2* (rouge, orange), *tetB*, *tetW* (vert, olive) et des 2 gènes de mobilité *intI1*, *intI2* (bleu, bleu clair) détectés à l'exutoire du bassin versant de la Claduègne (haut) et du Gazel (bas) au cours des campagnes d'échantillonnage de 2022, 2023 et 2024. La taille des cercles des deux gènes les moins abondants *intI2* et *tetB* est augmentée par rapport aux autres pour une meilleure visualisation. Les valeurs numériques sont présentées dans le Tableau 5. Le site GAZ a fait l'objet de 6 campagnes (pas de données le 30 juin 2022, car sites à sec) alors que le site CLA a été échantillonné 7 fois. Pour la Claduègne, lors de la campagne du 11 janvier 2023 tous les GRA et EGM analysés présentaient des concentrations inférieures à la Limite de détection, LD (LD < 10 copies /L).

Ainsi, si certains gènes tels que *sul*, *tetW* et *intI1* sont détectés dans la quasi-totalité des campagnes pour les 2 exutoires, leurs abondances varient jusqu'à 2 log entre les campagnes peut être en lien avec la variation de débit. On notera que ces gènes étaient les plus abondants lors des 2 campagnes de 2022 pour la Claduègne alors qu'ils ont été les plus abondants en avril et juin 2024 pour le Gazel. Cette variabilité saisonnière de l'abondance des GRA/EGM est également observée pour les différentes sources alimentant les exutoires. Elle est illustrée pour les sites STC, STF et STV sur la figure 18. Pour STC, les résultats sont très cohérents, avec une très forte augmentation de l'activité du camping en été, induisant de forts rejets de GRA. Pour STF, on note des rejets relativement homogènes entre l'hiver et l'été en accord avec le nombre stable d'animaux. Pour STV, on peut observer de plus grands rejets de GRA en hiver, probablement liés à de plus nombreux traitements aux antibiotiques des humains à cette saison.

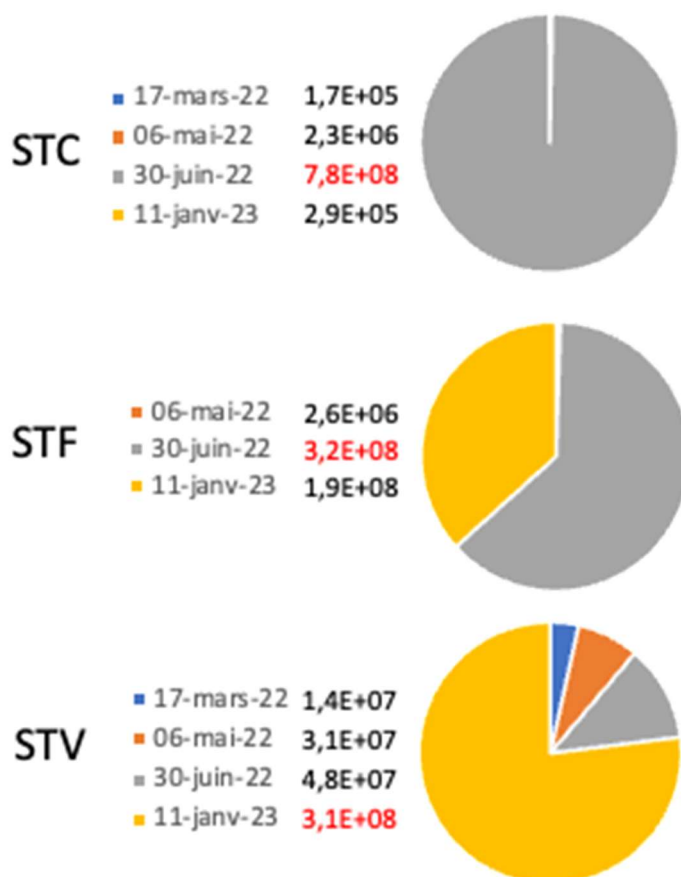


Figure 18. Abondance et proportion de la somme des 4 gènes de résistance aux antibiotiques (*sul1*, *sul2*, *tetB*, *tetW*) et 2 gènes de mobilité (*intI1*, *intI2*) détectés, lors de chaque campagne, dans les sites recevant des eaux de stations d'épuration. STC : station du camping ; STF : station de la ferme caprine de Mirabel ; STV : station de Villeneuve de Berg.

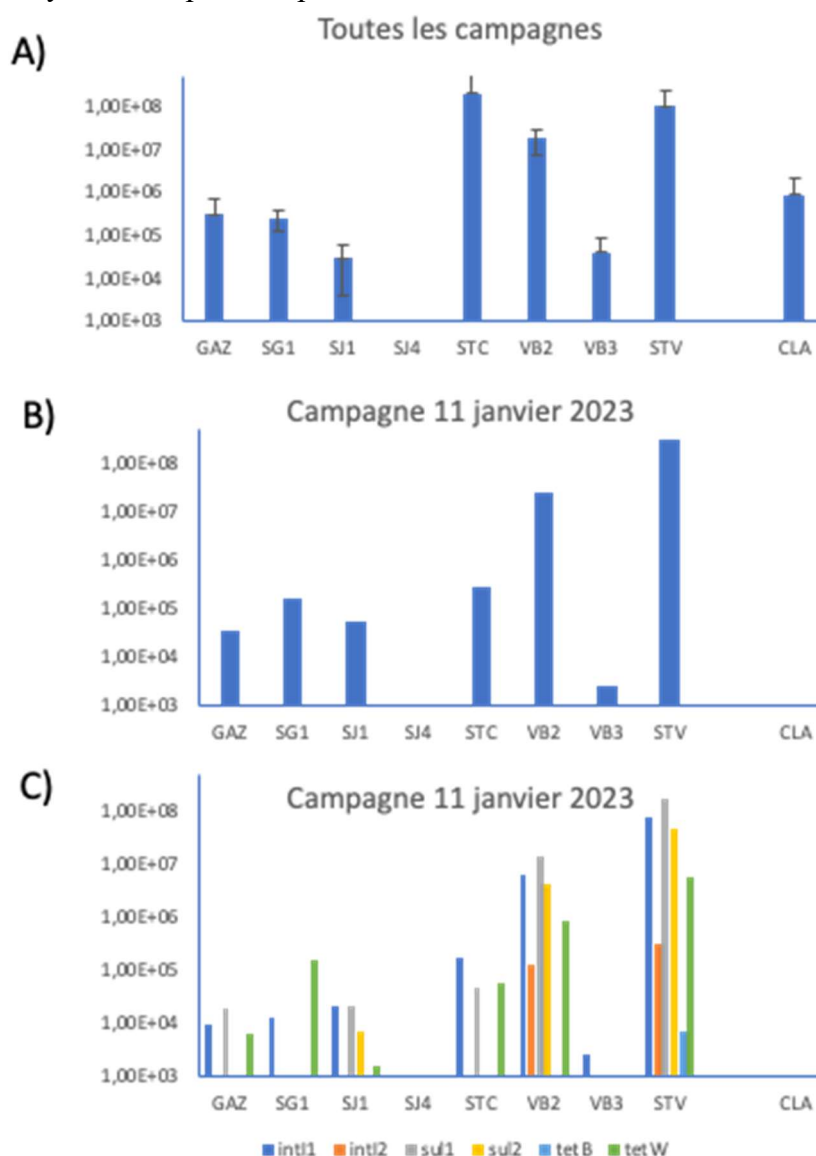
III-5-1-3 Dynamique spatiale des GRA en lien avec les activités humaines

Les contributions des diverses sources du bassin versant de la Claduègne et de celles de son sous-bassin le Gazel ont été regardées en analysant, d'une part, les données cumulées de toutes les campagnes et, d'autre part, plus spécifiquement la campagne du 11 janvier 2023. Les résultats sont présentés dans les Figures 18 et 19 pour le bassin versant de la Claduègne et le sous-bassin du Gazel, respectivement. Pour l'analyse des données regroupées des différentes campagnes (Figure 19A), on observe de manière assez prévisible que les sources qui relarguent le plus de GRA/EGM dans le BV de la Claduègne sont les 2 stations d'épuration (STC et STV) et la ville de Villeneuve de Berg (site VB2, ruisseau du Chauvel), suivies du Gazel et du site SG1 exposé à de l'élevage bovin. Les activités associées aux sites SJ1, SJ4 et VB3 (forêt, élevage récent, et vignobles)

contribuent bien plus faiblement. En s'intéressant plus spécifiquement à la campagne de janvier 2023 (Figure 19B) on observe la même tendance avec une moindre contribution de la station d'épuration du camping (STC), sans doute en lien avec l'activité réduite du camping en hiver.

Lors de cette campagne on observe très clairement la présence de tous les gènes sur les sites STV et VB2 (Figure 19C). On notera que pour cette campagne aucun gène n'a été détecté à l'exutoire de la Claduègne alors que des gènes ont été détectés sur ce site lors de toutes les autres campagnes. Cette absence de détection pourrait s'expliquer par un fort effet de dilution lié aux fortes précipitations précédentes et/ou leur possible lessivage accru. Il a en effet été observé un très faible rendement d'extraction, laissant supposer une faible biomasse, à partir de cet échantillon. Une répétition des analyses est cependant prévue afin de vérifier l'absence de biais méthodologique.

Figure 19. Contribution des différentes sources à l'antibiorésistance observée à l'exutoire de la Claduègne. En A) les données d'abondance de la somme de tous les gènes cumulés sur toutes les campagnes ; en B) les données d'abondance de la somme de tous les gènes pour la campagne de janvier 2023 ; en C) les données d'abondance de chacun des gènes sur chacun des sites lors de la campagne de janvier 2023.

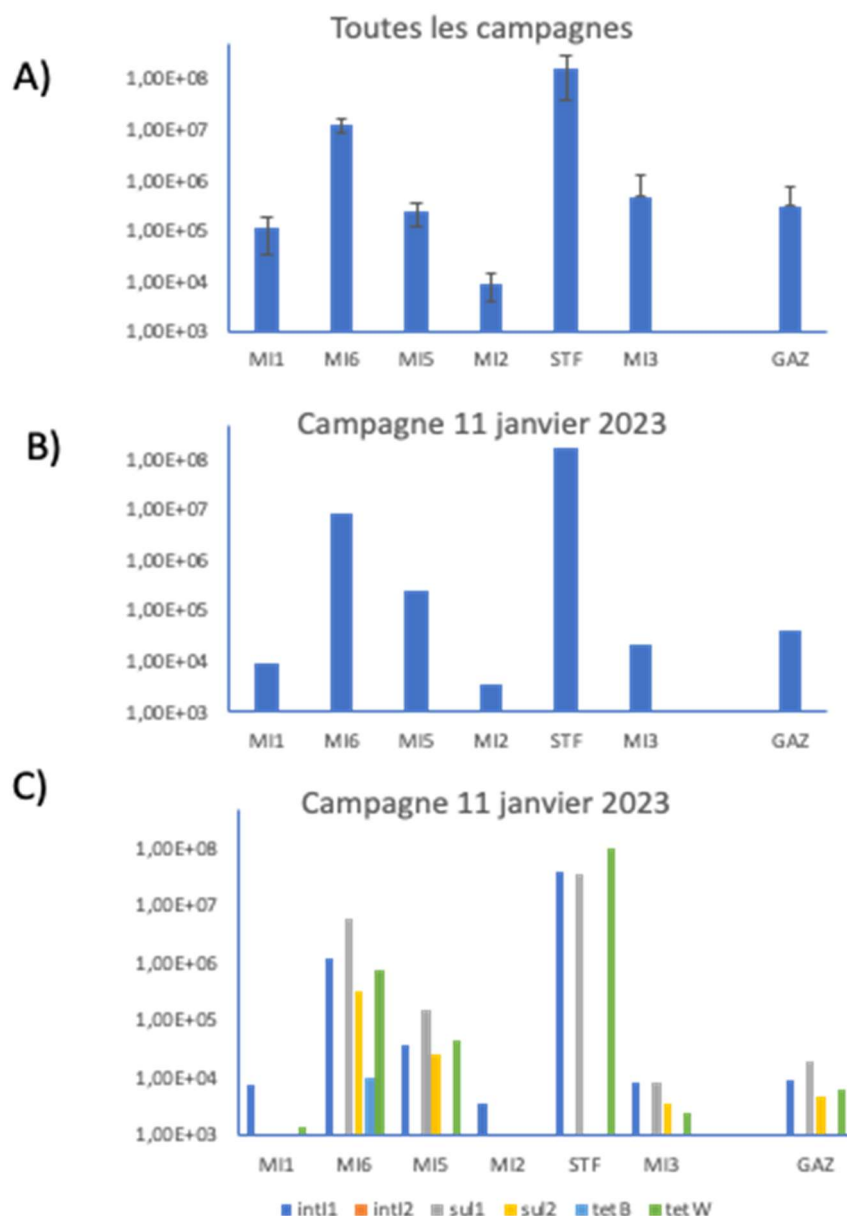


Pour le sous-bassin versant du Gazel, on observe, toutes campagnes confondues (Figure 20A), que la station d'épuration de la ferme caprine, site STF, est la source la plus chargée en GRA/EGM suivie du site MI6, élevage de porc, suivis des 2 sites MI1 et MI5 soumis à de l'élevage.

On notera que le site MI3, qui reçoit des eaux soumises à l'ensemble de ces sources, a un niveau de GRA/EGM comparable à celui observé à l'exutoire du Gazel (GAZ). La figure 20B, qui

représente les données de la campagne de janvier 2023, montre une contribution de chacune des sources similaires à celles observées toutes campagnes confondues. On notera que lors de cette campagne, la plus grande diversité de gènes est observée dans le site MI6, soumis à l'élevage de porc, avec la présence de 5 des 6 marqueurs d'antibiorésistance contre 3 ou 4 dans les autres sites, mais aussi que les plus fortes abondances de gènes sont mesurées sur le site de la station d'épuration de la ferme caprine.

Figure 20. Contribution des différentes sources à l'antibiorésistance observée à l'exutoire du Gazel. En A) les données d'abondance de la somme de tous les gènes cumulés sur toutes les campagnes ; en B) les données d'abondance de la somme de tous les gènes pour la campagne de janvier 2023 ; en C) un exemple de données d'abondance de chacun des gènes sur chacun des sites lors de la campagne de janvier 2023.



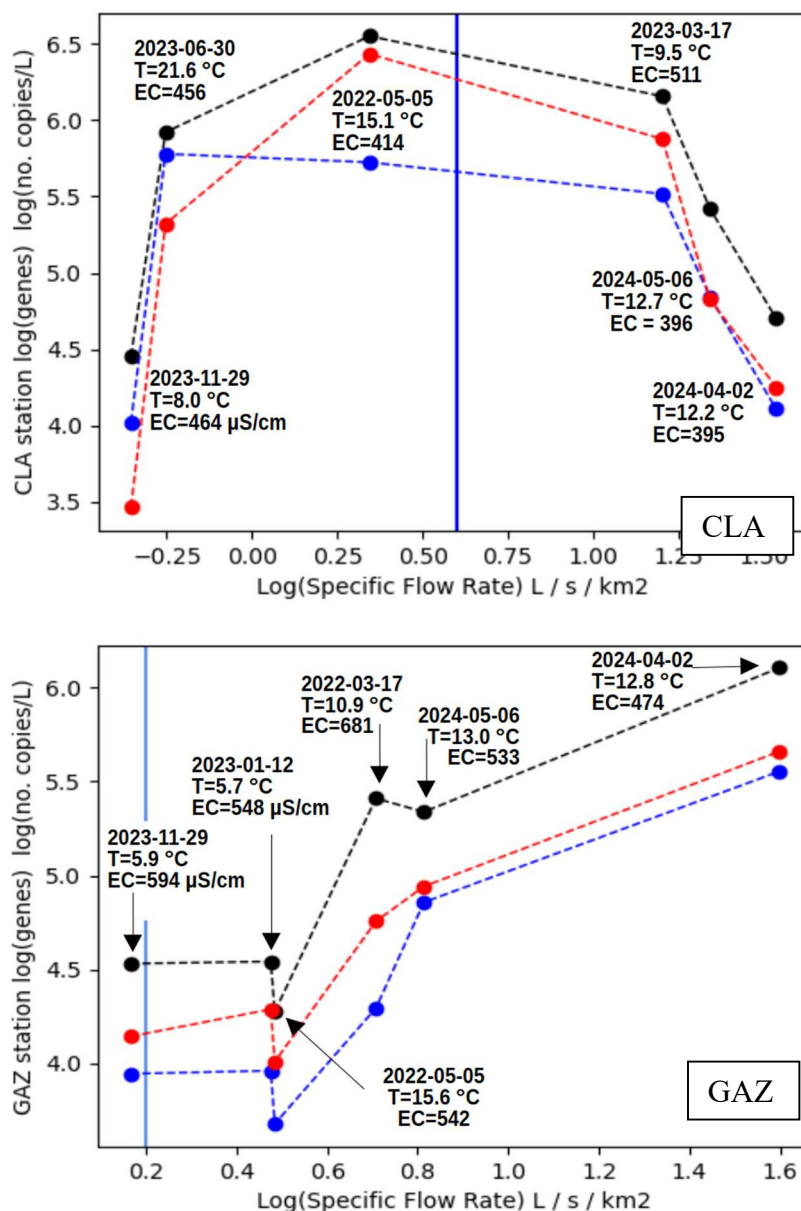
La dynamique temporelle de l'antibiorésistance dans les bassins de la Claduègne et du Gazel est bien visualisée dans les hydrogrammes de la Figure 17. On voit que pour la Claduègne, les concentrations maximales des gènes les plus abondants *sul1* et *int11* apparaissent dans les trois premières campagnes de mesures tandis que pour le Gazel les concentrations maximales de tous les gènes présentés sont mesurés dans l'avant-dernière campagne. Il n'y a donc pas de cohérence temporelle en termes de concentrations de gènes entre ces deux cours d'eaux. Aussi, globalement, les abondances sont plus importantes dans la Claduègne que dans le Gazel. La contribution

spécifique en GRA et EGM du Gazel vers la Claduègne semble donc bien faible par rapport à l'antibiorésistance globale mesurée à l'exutoire de la Claduègne, d'autant plus si on considère le débit bien plus important de la Claduègne, qui est 34 fois plus élevé en moyenne que celui du Gazel lors des journées de prélèvements (Tableau 3).

III-5-1-4 Dynamique spatiale des GRA en lien avec le débit des rivières

La Figure 21 présente le lien entre les concentrations cumulées de la somme de tous les gènes indicateurs suivis en fonction des débits spécifiques de la Claduègne (Haut) et du Gazel (Bas).

Figure 21 : Abondance de la somme des gènes (noir) et des gènes *sul1* (rouge) et *int11* (bleu) en fonction du débit, mesurés à l'exutoire de la Claduègne (Haut) et du Gazel (Bas). Les lignes verticales représentent les limites hautes et basses eaux de la Claduègne (bleu) et du Gazel (bleu clair). Les étiquettes présentent les données physiques associées pour CLA (noir) et GAZ (bleu). Une étiquette vaut pour les trois abondances de gènes de même débit et date de prélèvement. Les valeurs indiquées sont celles de l'horaire précis d'échantillonnage tandis que le Tableau 3 présente les moyennes journalières de la date de campagne.



Cette figure montre que pour les deux bassins versants, les concentrations de GRA sont plus basses en périodes de basses eaux. Dès que le débit augmente (hautes eaux), les concentrations de GRA augmentent d'un facteur 10 à 100 avant de diminuer pour la Claduègne. Pour la Claduègne, la dynamique de l'antibiorésistance semble être surtout liée aux rejets d'eaux usées (STV et STC) avec le gène *sul1* comme principale contamination.

Dans le bassin versant du Gazel, les niveaux de concentration des GRA dans les eaux sont plus divers et environ 10 fois plus faibles que ceux de la Claduègne, comme déjà observé précédemment (Figures 19 et 20). Ils augmentent principalement lors d'évènement hydrologiques importants (forts débits) nécessaires pour déclencher un ruissellement de surface suffisant pour entraîner les GRA plus abondants dans les sols de ce sous-bassin, en comparaison avec le reste du bassin, à l'exception des sols proches de la STEP de Villeneuve de Berg (Figures 23 et 24).

Dans les deux rivières, les deux valeurs maximales de débit vont de pair avec des valeurs de CE minimum confirmant l'effet de dilution aux forts débits caractérisé par les ions majeurs. Pour la Claduègne, on peut suggérer un effet de dilution simultané des GRA et des ions majeurs aux forts débits. D'une façon générale, le lien entre la concentration en GRA et le débit n'est pas linéaire (pas de corrélation observée dans la figure 15), ce qui suggère que des facteurs autres que le débit affectent la dynamique de l'antibiorésistance.

III-5-1-5 Dynamique spatiale des GRA en lien les éléments traces métalliques

Les éléments traces métalliques sont connus pour pouvoir co-sélectionner certaines résistances bactériennes aux antibiotiques.

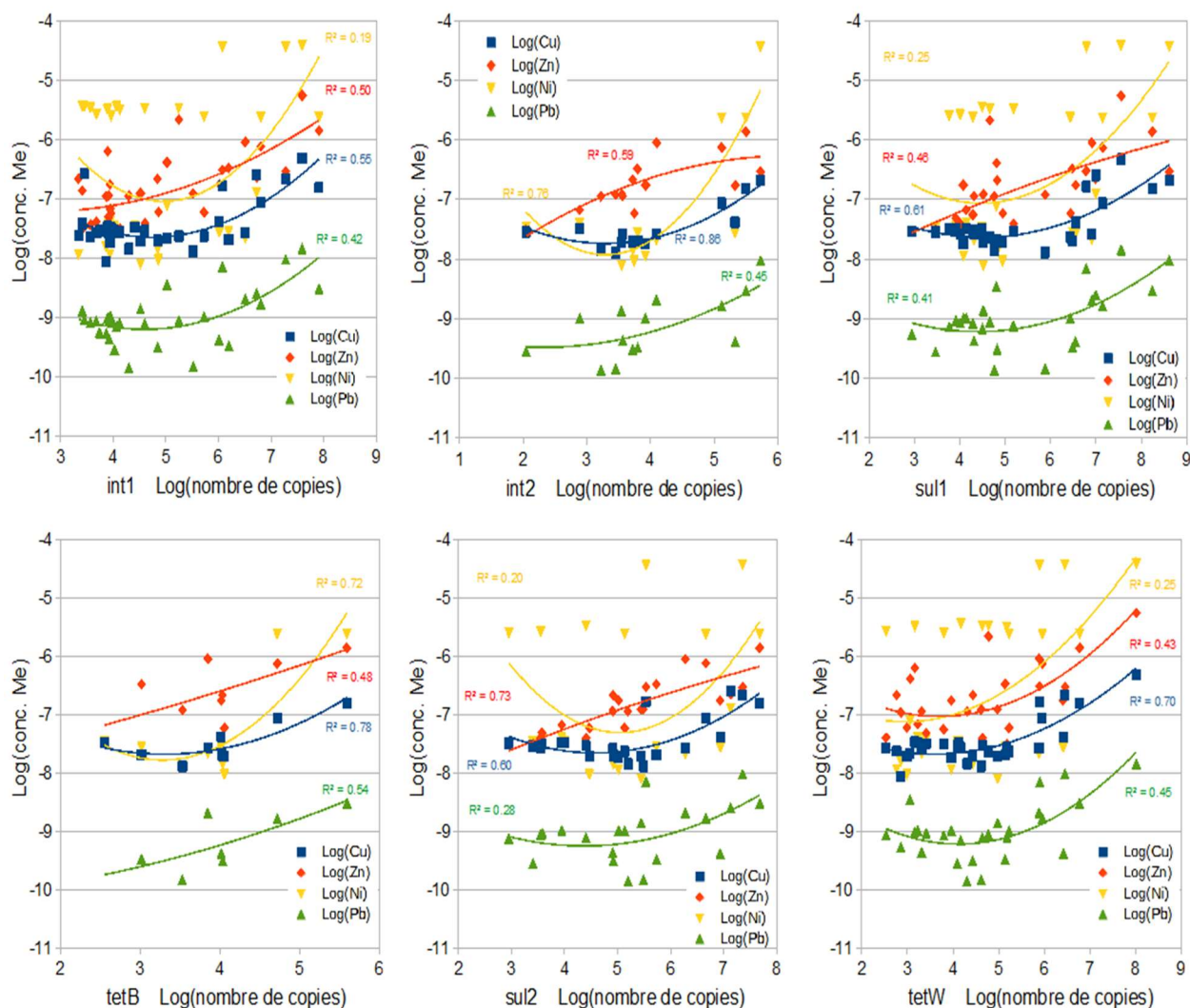


Figure 22 : Visualisation des liens entre les concentrations en métaux traces et l'abondance des 6 gènes indicateurs étudiés dans les eaux de la Claduègne.

Dans les sites étudiés, les métaux traces présentent des concentrations assez variables selon les sources et les périodes (Figure 13). L'évaluation des corrélations entre leurs concentrations et l'abondance des 6 gènes étudiés dans les eaux de la Claduègne est présentée dans la Figure 22 ci-dessous). Cette figure permet de montrer que la plupart des gènes étudiés présentent effectivement des corrélations assez fortes avec les concentrations de cuivre, parfois de zinc et plus rarement de plomb. Nous avons vérifié pour *intI1* que cela n'est pas représentatif d'un ou deux sites ou usages de sol particulier, mais bien d'au moins 6 ou 7 sites pour chaque gène. Déjà décrites dans la littérature, ces corrélations semblent donc clairement confirmées dans ce bassin rural.

III-5-2 Antibiorésistance dans les sols et impact sur leur fonctionnement écologique

L'abondance des communautés bactériennes totales a été évaluée par la quantification du gène *rrs*. L'abondance de ce gène est assez homogène sur l'ensemble des sites échantillonnés et varie de $2,9.10^9$ à $2,7.10^{10}$ copies/ g de sol sec.

III-5-2-1 Abondance des ARG et EGM dans les sols

Les sites présentant les plus grands nombres de copies de GRAs et d'EGMs correspondent à ceux où l'on trouve des systèmes d'épuration (Figure 23).

L'abondance totale des GRAs et des EGMs dans ces sites, STF-ROS et STV, est respectivement de $5,7.10^7$ et $1,8.10^7$ copies/g de sol sec.

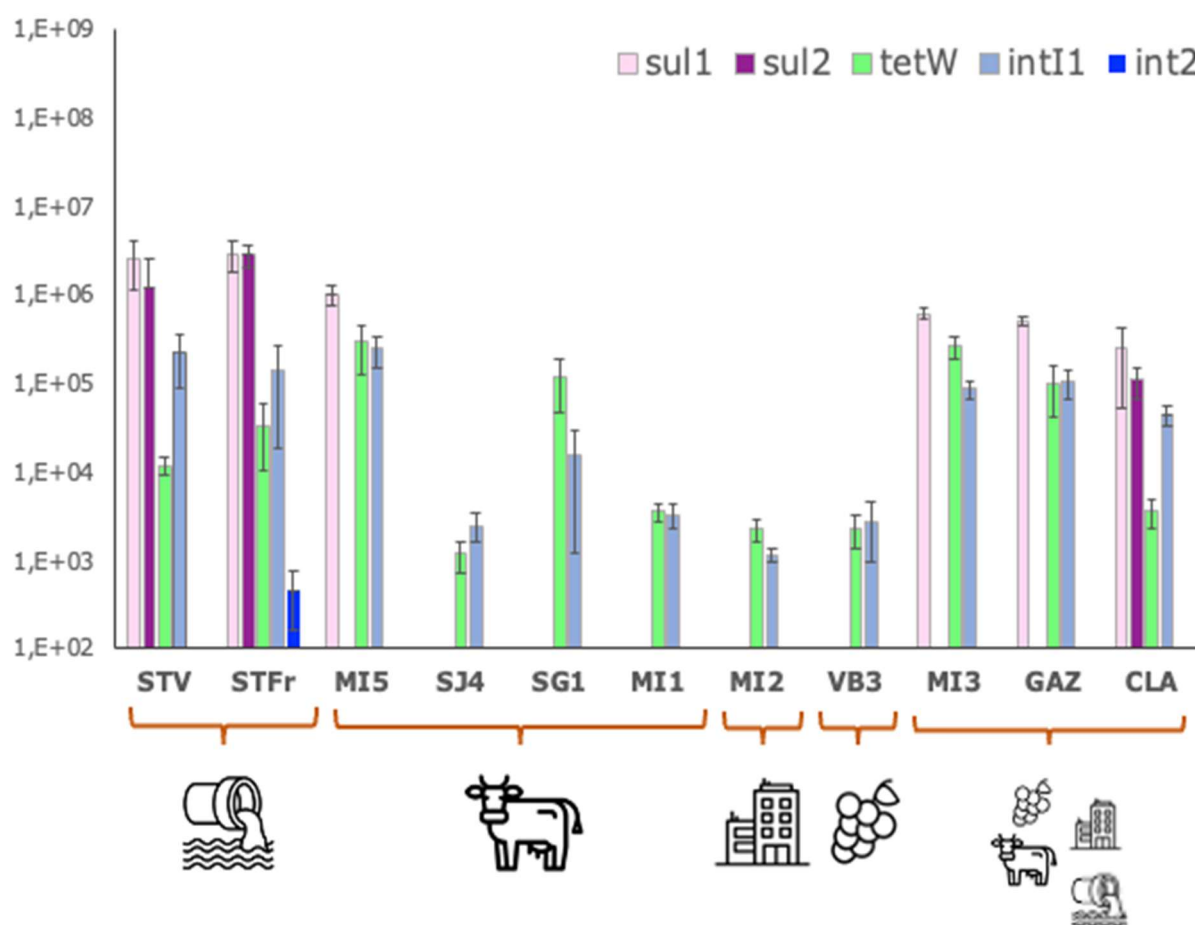


Figure 23. Contribution des différentes sources étudiées à l'antibiorésistance observée à l'exutoire du Gazel et de la Claduègne lors de la campagne de janvier 2023.

Les exutoires présents dans le bassin versant (MI3, GAZ et CLA) et un site caractérisé par la présence d'élevage (MI5) ont des abondances totales allant de $2,2 \cdot 10^6$ à $5,5 \cdot 10^6$ copies/g de sol sec. Enfin, les sites les moins contaminés aux GRA/EGM du bassin versant correspondent à ceux caractérisés par les pâturages (SG1 et MI1), les zones urbaines (MI2), la viticulture (VB3) et l'élevage (SJ4). Leur abondance totale en nombre de copies de GRAs et d'EGMs se situe entre $1,6 \cdot 10^4$ et $4,7 \cdot 10^5$ copies/g de sol sec (Figure 23).

Parmi les six GRAs étudiés, les gènes *bla_{CTX-M}* et *tetB* n'ont été détectés dans aucun des sites échantillonnés. Le gène *sul1* a été détecté à $1,2 \cdot 10^6$ - $3,5 \cdot 10^7$ copies/g de sol sec dans les sites caractérisés par la présence de systèmes d'épuration d'eaux usées (STV et STF-ROS), au niveau des exutoires des différents cours d'eau (MI3, GAZ et CLA) et dans un des sites caractérisés par des élevages (MI5). Le gène *sul2* a aussi été détecté au niveau des systèmes d'épuration et dans un des trois exutoires (l'exutoire du bassin-versant de la Claduègne, CLA) à $2,1 \cdot 10^7$ (STF-ROS), $4,8 \cdot 10^6$ (STV) et $5,4 \cdot 10^5$ (CLA) copies/g de sol sec. Enfin, le gène *tetW* a été détecté dans la totalité des sites à raison de $3,6 \cdot 10^3$ à $1,1 \cdot 10^6$ copies/g de sol sec (Figure 23).

Concernant les EGMs, le gène *intI1* a été détecté dans la totalité des sites à raison de $1,2 \cdot 10^4$ à $3,3 \cdot 10^6$ copies/g de sol sec. L'intégron de classe 2 n'a été détecté que dans le site STF-ROS à hauteur de $2,1 \cdot 10^3$ copies/g de sol sec. Il ne représente que 0,004 % de l'abondance totale en GRAs et EGMs de ce site (Figure 23).

Pour les deux sites regroupés par la présence de systèmes d'épuration, les trois exutoires et l'un de deux sites caractérisés par la présence d'élevage (MI5), le gène *sul1* est celui avec la plus forte proportion (57 à 73 %) de l'ensemble des gènes détectés par site. Le gène *intI1* a la plus forte proportion pour le second site caractérisé par la présence d'élevage (SJ4) et celui situé près d'une vigne (VB3). Sa proportion est à 64,8 % pour VB3 et à 76,8 % pour SJ4. La proportion du gène *tetW* est la plus importante pour l'une des deux zones caractérisées par du pâturage (SG1) et pour la zone urbaine (MI2) : 85 et 60 %, respectivement. Autant de copies du gène *tetW* que du gène *intI1* sont détectées dans la zone de pâturage MI1 (Figure 23).

La figure 24 permet de visualiser la distribution spatiale de l'abondance de l'antibiorésistance dans les sols et les eaux du bassin versant Claduègne (exemple de l'élément Génétique Mobile (EGM) *intI1*). Sans surprise on observe bien l'accumulation des gènes d'antibiorésistance au plus près des sources les plus significative de ces gènes : dans les sols des zones d'élevage dans le sous-bassin versant du Gazel à Mirabel et ceux à proximité de la station d'épuration de Villeneuve de Berg.

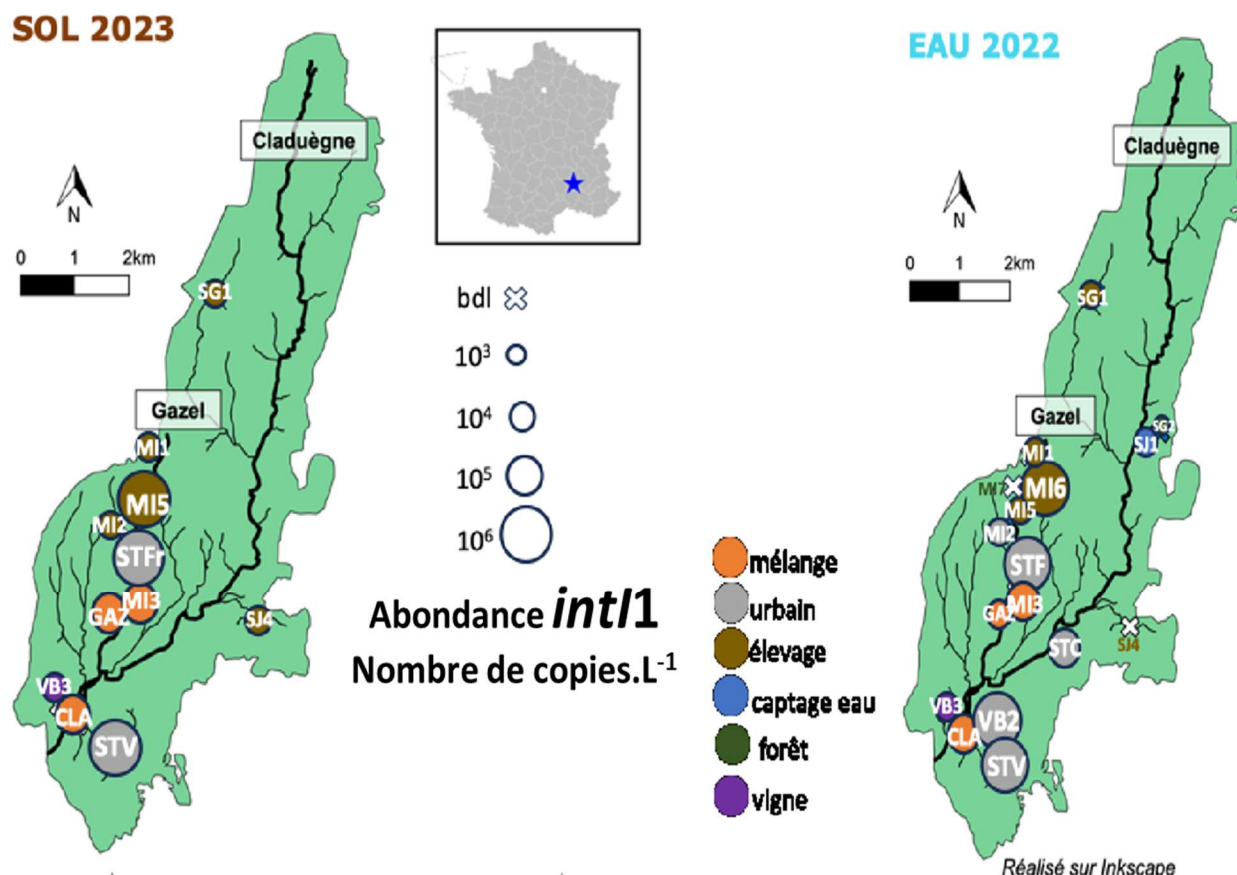


Figure 24. Comparaison de la distribution spatiale de l'abondance de l'antibiorésistance mesurée dans les sols et les eaux du bassin versant Claduègne (exemple de l'élément Génétique Mobile (EGM) *int11*).

III-5-2-2 Abondance des populations nitrifiantes dans les sols

Dans tous les sites, à l'exception de STF-ROS, les AOA sont dominantes. Le ratio AOA/AOB est homogène et systématiquement supérieur à 1 sauf dans le cas de STF-ROS ($p < 0,05$). Dans ce site, l'abondance des AOB est 63,4 fois supérieure à celle des AOA, ce qui peut être expliqué par la teneur en azote ammoniacal, connu pour être plus favorable aux AOB qu'aux AOA dans le sol du système d'épuration d'eau de la ferme caprine (Figure 25).

III-5-2-3 Activité nitrifiante potentielle dans les sols

L'activité nitrifiante potentielle ($\mu\text{g N}-(\text{NO}_2^- + \text{NO}_3^-)/\text{g de sol sec/h}$) dans les sols des différents sites est présentée dans la figure 25. Certains sites (STF-ROS, SJ4, MI1, GAZ et CLA) présentent des activités nitrifiantes faibles ($\text{NEA} \leq 1$) par rapport aux autres sites échantillonnés ($\text{NEA} > 1$). C'est le cas pour les deux systèmes d'épuration (STV : 2,57 vs. STF-ROS : 0,68) et les deux sites caractérisés par la présence d'élevage (MI5 : 2,34 vs. SJ4 : 0,48). Le site avec la NEA la plus importante correspond à l'un des exutoires du bassin-versant, MI3 (3,29). Sa NEA est différente significativement de celle des sites STF-ROS (0,68), SJ4 (0,48) et CLA (0,19) ($p < 0,05$). Compte tenu de la variabilité des mesures entre les échantillons d'un même site, la significativité des résultats pourrait cependant être limitée (Figure 25).

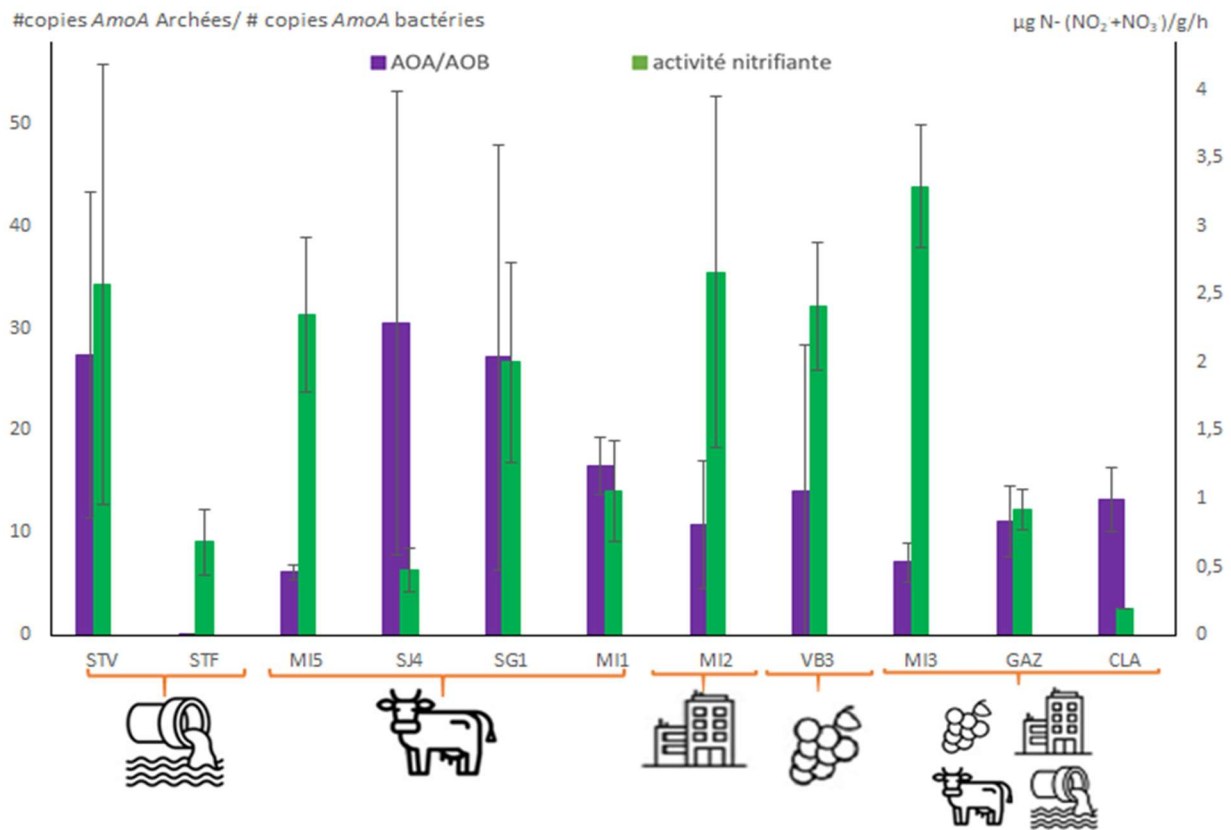


Figure 25. Ratio entre les archées et les bactéries oxydantes de l'ammonium (AOA/AOB) (en violet) et activité nitrifiante potentielle (en vert) dans les échantillons de sols prélevés lors de la campagne de Janvier 2023.

IV Discussion.

IV-1 Suivis Hydro-Géo-chimiques

Les suivis hydrologique et géochimique menés pendant la durée du projet ont confirmé la complexité des processus impliqués, autant au niveau des précipitations, très intermittentes et variablement réparties au cours des saisons (pluies intenses entre septembre et novembre et entre avril et mai) que de l'origine et les chemins de l'eau s'écoulant à l'exutoire du BV de la Claduègne (Hachgenei et al., 2024b). La bonne compréhension des processus hydrogéochimiques est donc indispensable pour mieux comprendre la dynamique de l'antibiorésistance dans ce BV rural.

En particulier, bien que ce contexte hydro-météorologique donne une importance particulière aux premières crues de l'année pour la mobilisation des sédiments et probablement des micro-organismes associés lors de la remise en eau des rivières (spécificité qui avait été prise en compte dans notre stratégie d'échantillonnage initiale), des spécificités géochimiques de certains sites ont pu être observées, en lien notamment avec la saisonnalité des activités humaines (camping estival, épandages agricoles, élevage intérieur ou en pâturage ...). Ces spécificités ont clairement contraint une partie de la dynamique de l'antibiorésistance dans le BV.

IV-2 Suivis Microbiologiques

L'analyse de la dynamique de l'antibiorésistance observée sur les 30 mois du projet montre que l'on retrouve tous les ARG et les EGM recherchés à des concentrations variables dans les eaux et sols échantillonnés, à l'exception du gène *bla_{CTX-M}*. La non-détection de ce dernier met en évidence l'absence de sources de ce gène ou *a minima* des concentrations très faibles et inférieures à notre seuil de détection dans ces sources (environ 500 (i.e. ddPCR) à 5000 (qPCR) copies par gramme de sol ou litre d'eau), et par conséquent un faible risque de dissémination dans ce bassin versant rural. Cette observation était attendue du fait que ce gène est majoritairement retrouvé parmi des souches bactériennes pathogènes opportunistes, majoritairement des Enterobactériacées isolées dans les hôpitaux, notamment des grandes zones urbaines.

La prévalence des autres ARG, aussi bien dans les eaux que dans les sols, et la variabilité des abondances selon les sources (abondances élevées dans les sources STEP, urbaine et élevage intensif porcin) étaient également attendues, d'après l'analyse de la littérature très fournie sur les milieux urbains ou les zones d'élevage intensif. La présence des gènes *sul* et *tet* dans une grande diversité de taxons bactériens, et leur dissémination environnementale sont très largement documentées et en lien avec l'usage important et de très longue date des sulfonamides et des tétracyclines en médecines humaine et vétérinaire. Les sulfamides sont par ailleurs connus pour diffuser entre les compartiments (transfert vertical sol-eau) et les tétracyclines pour leur persistance dans les sols. Ainsi la présence de ces gènes dans les sols échantillonnés sur les différents sites du BV met en évidence le rôle de réservoirs de GRA joué par les sols contribuant ainsi à leur dissémination *via* la circulation de l'eau et leur présence fréquente dans les exutoires de la Claduègne et du Gazel.

L'analyse des matières en suspension des échantillons récoltés lors des crues nous permettra d'évaluer la contribution des sols dans la dissémination de ces GRAs lors des événements pluvieux. En parallèle de l'analyse des GRA, nous nous sommes intéressés à 2 éléments génétiques mobiles dont la fonction est d'être un proxy de l'antibiorésistance et un indicateur du potentiel de dissémination de gènes entre taxons bactériens. Les eaux de STEP et urbaines et celles provenant de zones d'élevage contribuent majoritairement à la dissémination des 2 intégrons confirmant qu'ils sont de bons proxys de l'antibiorésistance.

La présence fréquente de l'intégron 1 dans toutes les sources, dans les sols et à l'exutoire est elle aussi en accord avec les données de la littérature qui indiquent leur large distribution dans l'environnement. Cela met en évidence que les bassins versants ruraux n'échappent pas à l'influence des activités anthropiques, quand bien même les activités sont de moindre ampleur que dans des bassins versants fortement urbanisés avec des activités industrielles et/ou agricoles intensives (i.e. rejets d'une plus grande diversité et en plus grande quantité de contaminants chimiques co-sélecteurs de résistances et/ou de contaminants biologiques porteurs de gènes de résistance). On notera que l'intégron 2 bien que présent dans diverses sources n'a pas été détecté dans les sols, a rarement été détecté aux exutoires, seules les campagnes de 2024 ont été positives et qu'il n'a pas été détecté dans les sols. Cette non-détection suggère ainsi la faible survie des taxons présents dans les sources lorsque ceux-ci sont introduits dans l'environnement, eau et sol, et ou une faible prévalence (en-dessous des limites de détection) des taxons qui auraient pu recevoir par transfert horizontal ces gènes.

Enfin l'analyse des corrélations avec les constituants chimiques des milieux ont mis en évidence le rôle potentiel des métaux, et notamment le cuivre ou le zinc, dans la co-sélection de résistances et donc le potentiel de ces éléments à favoriser la survie des bactéries résistantes et la dissémination des ARG dans l'environnement.

V Conclusions et perspectives

Le projet multidisciplinaire BACTRESIST était particulièrement ambitieux, compte tenu de sa relative faible durée et de ses divers objectifs microbiologiques, hydrologiques et géochimiques et de son niveau de financement qui n'a permis de cibler que quelques dates d'échantillonnage, stratégiquement choisies. La plupart des objectifs ont été atteints. Des résultats novateurs, notamment en lien avec le contexte rural et le climat spécifique, ont été obtenus et sont présentés dans ce rapport. Ils mettent notamment en évidence la validation de la démarche interdisciplinaire et transposable que nous avons mise en place et optimisée grâce aux précieux retours d'expérience des différents partenaires.

La question centrale visait à évaluer le caractère spécifique des bassins ruraux pour l'antibiorésistance (plus grande diversité d'occupation et usage des sols, mais aussi des activités humaines et donc de la plus grande mixité de sources diffuses et ponctuelles), en comparaison à des bassins très urbanisés (sources plutôt ponctuelles).

Les résultats obtenus autant dans les eaux que les sols montrent la présence systématique de gènes de résistance dans tous les sites suivis, avec des concentrations variables selon les sites et les marqueurs analysés. Ainsi, certains marqueurs comme les gènes *sul* sont détectés dans tous les sites du bassin versant, alors que *bla*_{CTX-M} n'est jamais détecté. On observe que les eaux de surface sont nettement marquées par les rejets domestiques (sites d'élevage et sites en aval de la station d'épuration et du camping et de l'Hôpital de Villeneuve de Berg) notamment en période de basses eaux. La détection de GRA est ainsi très souvent liée à des concentrations géochimiques élevées (Conductivité électrique, ions majeurs, éléments trace...), elles-mêmes spécifiques de certains sites et activités, notamment d'élevage intensif (porcin, caprin, bovin, ...), de camping, de traitement d'eaux usées domestiques ou hospitalières.

L'analyse plus approfondie de tous les résultats obtenus jusqu'à récemment dans le projet BactResist fera l'objet prochainement d'une publication scientifique qui sera associée à ce rapport.

L'analyse fine de la dynamique de l'antibiorésistance en période de crue n'a pas pu être évaluée car nécessitant plus d'échantillons (difficulté de collecte et de récupération rapide des échantillons) et un protocole microbiologique adapté aux eaux très chargées en particules, et plus coûteux. Cette analyse sera conduite prochainement sur le même site dans le cadre du projet DynACrue, financé par la MITI du CNRS, et dont les résultats viendront enrichir notre Base de données bio-hydro-géochimique développée dans le présent projet.

VI. Valorisation du projet

Le projet a permis le développement d'un stage de Master 2 (Luce FAYASSE, 2023). Les résultats du projet ont été présentés lors des journées Eau & Santé du GRAIE (14&15/11/2023) et de la journée Rivières Cévenoles à Alès le 7 novembre 2024.

La valorisation du projet sous forme d'articles scientifiques est en cours, avec l'analyse fine et détaillée des résultats présentés dans ce rapport et d'autres en cours d'interprétation, nécessitant notamment des protocoles d'extraction de l'ADN spécifiques en raison de la forte charge en particules solides.

Nos résultats ont aussi été présentés du 27 au 31/07/2025 à la Conférence Internationale MedGeo25 à Aveiro (Portugal) (Martins et al. 2025a) et seront aussi présentés au 12^e colloque de l'Association Francophone d'Ecologie Microbienne (AFEM) du 18 au 21 novembre 2025 à Beaune (F) (Martins et al. 2025b).

Comme envisagé initialement dans le projet BactResist, une journée de restitution des résultats obtenus dans ce projet et dans les projets associés PharmaBV (Martins et al. 2019) et IDESOC (Coquery et al. 2024), menés récemment sur le même bassin versant, a été organisée le 28/11/2023 au Pradel à Mirabel, en présence d'élus, d'habitants, d'usagers et d'associations locales par l'IGE, le Cermosem IUGA, et l'INRAE de Lyon, tous partenaires de ces 3 projets. Les retours très positifs recueillis lors de cette journée ont montré la forte attente d'information sur les études et recherches menées dans ce territoire.

Enfin, une base de données au format BDOH a été construite selon le principe FAIR. Elle centralise l'ensemble des données obtenues pendant le projet BactResist et sera disponible en ligne prochainement.

Livrables :

1. Une base de données de la qualité physico-chimique des eaux de surface de la Claduègne collectées pendant le projet.
2. Une base de données de la distribution des GRA dans les sols et les eaux de surface de la Claduègne collectées pendant le projet.
3. Une meilleure compréhension de la dynamique de l'antibiorésistance dans un bassin versant rural en lien avec les sources potentielles identifiées et monitorées et les caractéristiques pédo-hydrologiques du bassin.
4. Présentation des résultats aux acteurs locaux du bassin versant (chambre d'agriculture, autorités, Associations...) et aux agriculteurs, éleveurs, vétérinaires... (Conférences, formations, entretiens, débats...).

VII. RÉFÉRENCES CITÉES :

- Alygizakis et al. Evaluation of chemical and biological contaminants of emerging concern in treated wastewater intended for agricultural reuse. *Environ Int.* 2020 May; 138:105597).
- ANSES, Rapport d'expertise collective. Antibioresistance et environnement, 2020,
- Boudevillain, B., Delrieu, G., Galabertier, B., Bonnifait, L., Bouilloud, L., Kirstetter, P. E., et al. (2011). The Cevennes-Vivarais Mediterranean Hydrometeorological Observatory database. *Water Resources Research*, 47
- Braud, I., Ayrat, P. A., Bouvier, C., Branger, F., Delrieu, G., Le Coz, J.. Multi-scale hydrometeorological observation and modelling for flash flood understanding. *Hydrology And Earth System Sciences*, 18(9), 3733–3761. 2014.
- Cacace et al. Antibiotic resistance genes in treated wastewater and in the receiving water bodies: A pan-European survey of urban settings. *Water Res.* 160 : 320-330. 2019.
- Coquery M., A. Boukra, F. Branger, L. Dherret, M. Lagouy, O. Grandjouan, M. Masson, L. Richard, M. Baduel, C. Duwig, G. Nord, L. Spadini, C. Legout, J.M.F. Martins, A. Crouzet, L. Jullien, S. Darfeuil, O. Chtiba, L. Elszear, P. Dusseux, N. Robinet, I. Créti, M. Betemps, J. Josse, L. Marjolet, A. Dominguez-Lage, A. Meynier-Pozzi, B. Luton, W. Galia, V. Rodriguez-Nava, E. Bergeron, D. Mouniée, S. Guesmi, C. Wybraniec, B. Cournoyer. Le projet IDESOC : Identification et caractérisation des sources de contaminants dans des bassins versants d'usage mixte - approche intégrée. Action n°79 du Programme 2021. Rapport Final du projet IDESOC pour l'Agence de l'eau RMC et la Zone Atelier BR. 2024.
- Dassonville N., N. Guillaumaud, F. Piola, P. Meerts, And F. Poly. Niche construction by the invasive Asian knotweeds (species complex *Fallopia*): Impact on activity, abundance and community structure of denitrifiers and nitrifiers. *Biological Invasions* 13: 1115– 1133. 2011.
- Ducrocq, V., Drobinski, P., Lambert, D., Molinie, G., & Llasat, C. Preface: Forecast and projection in climate scenario of Mediterranean intense events: uncertainties and propagation on environment (the MEDUP project). *Natural Hazards And Earth System Sciences*, 13(11), 3043–3047. 2013
- Faisse L., A. Crouzet, E. Brothier, L. Spadini, A. Richaume, S. Favre-Bonté, J. Martins et S. Nazaret. Dissémination de gènes bactériens d'antibiorésistance à l'échelle d'un bassin versant rural : rôles de l'usage des sols et du cycle hydrologique. *J. Eau & Santé du GRAIE*. Lyon, France. 14-15/11 /2023.
- Faysse Luce. Impact des pratiques agricoles et de l'usage des sols sur la dissémination de l'antibiorésistance dans les eaux de surface et le sol à d'un bassin versant rural. EUR H20. Master 2. Lyon. Juin 2023.
- Hachgenei Nico. Transfert d'eau et de résidus pharmaceutiques vétérinaires dans un bassin versant agricole de méso-échelle soumis aux crues éclaircs. Thèse ED Sciences de la Terre et de l'Univers et de l'Environnement de l'Université Grenoble Alpes. Soutenue le 30/03/2022.
- Hachgenei N., N. Robinet, C. Baduel, G. Nord, L. Spadini, J.M.F. Martins, C. Duwig. Catchment-scale rapid transfer of agricultural pharmaceuticals under Mediterranean climate. 10.1016/j.scitotenv.2023.166650. *STOTEN*. 906: 166650. 2024a.
- Hachgenei N., Nord G., Spadini L., Mora H., Courvoisier F., Sutra J-F., Vandervaere J-P., Legoût C., Morel, M.-C., Martins, J.M.F., Lespine, A. and C. Duwig. A device to simulate contaminant transfer and surface/subsurface flow through undisturbed soil monoliths. *Vadose Zone J.* 2021. VZJ-2021-10-0073-TN. DOI: 10.1002/vzj2.20184.
- Martins J.M.F., S. Majdalani, E. Vitorge, A. Desauay, A. Navel, V. Guiné, J.F. Daïan, E. Vince, H. Denis and J.P. Gaudet. (2013) Importance of macropore flow for the transport of *Escherichia coli* cells in undisturbed cores of a brown leached soil. *Environ. Sci.: Processes Impacts*, DOI: 10.1039/C2EM30586K. 15: 347-356. 2013.
- Martins J.M.F. G. Nord, C. Duwig, C. Legout, M.-C. Morel, Spadini L., Hachgenei N., J. Némery, P. Mao, N. Robinet, C. Margoum, C. Miège, A. Daval, B. Mathon, L. Liger et M. Coquery. Rapport final du projet Pharma BV : Origine et devenir des contaminants PHARMaceutiques dans les Bassins Versants agricoles : cas de la Claduègne (Ardèche). Rapport final pour l'Agence de l'eau RMC et la Zone Atelier Bassin du Rhône. 2019. <https://hal.inrae.fr/hal-02609731>
- Martins J.M.F., C. Legout, G. Nord, L. Spadini, M.-C. Morel, C. Duwig, J. Némery, N. Hachgenei, M. Hirigoyen, J. Jene, E. Vince, S. Boubkraoui, N. Robinet, T. Duplus, P. Mao, C. Margoum, C. Miège, B. Mathon, L. Ligier and M. Coquery (2019). Coupling processes studies, field observations and surveys for identifying the main sources of pharmaceuticals contaminations and produce vulnerability maps in an agricultural Mediterranean basin. SSS8.5/BG2.67/HS8.3.15 – Soils as a non-point source of

- contamination by emerging contaminants, including pesticides or their degradation products. European Geophysical Union Congress. Vienna (A). April 8th 2019.
- Martins Jean, G. Nord, C. Legout, L. Spadini, C. Duwig, A. Crouzet, M.-C. Morel, L. Oxarango, A. Richaume-Jollion, S. Favre-Bonté, T. Meyer, L. Faysse, E. Brothier, A. Delort, P. Defour et S. Nazaret. Le projet BACTRESIST. Journée Rivières Cévenoles. Alès France. 7 novembre 2024.
- Martins J.M.F., L. Spadini, G. Nord, A. Richaume, T. Meyer, C. Legout, A Crouzet, C. Duwig, A. Delort, P. Defour, S. Favre-Bonté, & S. Nazaret. 2025a. Environmental factors influencing the dynamics of bacterial resistance to antibiotics (bra) in a small rural watershed in France. 11th MEDGEO Congress. Aveiro (Portugal), 27-31/07/2025.
- Martins J.M.F., L. Spadini, A Crouzet, T. Meyer, A. Richaume, G. Nord, C. Legout, C. Duwig, M.C. Morel, L. Oxarango, A. Delort, P. Defour, S. Favre-Bonté, E. Laroche, et S. Nazaret. 2025b. evaluation de la dynamique de la résistance bactérienne aux antibiotiques dans un petit bassin versant rural en ardeche. 12^e colloque de l'AFEM. Beaune (F) 18-21 Nov. 2025.
- Moatar et al. (2020) Stream Solutes and Particulates Export Regimes: A New Framework to Optimize Their Monitoring. doi: 10.3389/fevo.2019.00516. Front. Ecol. Evol. 7:516).
- Navratil, O., Esteves, M., Legout, C., Gratiot, N., Nemery, J., Willmore, S., et al. Global uncertainty analysis of suspended sediment monitoring using turbidimeter in a small mountainous river catchment. J. Hydrology, 398(3-4), 246–259. 2011.
- Nord, G., Boudevillain, B., Berne, A., Branger, F., Braud, I., Dramais, G., et al. A high space-time resolution dataset linking meteorological forcing and hydro-sedimentary response in a mesoscale Mediterranean catchment (Auzon) of the Ardeche region, France. Earth System Science Data, 9 (1). 2017.
- Uber 2020; Origine et redistribution spatio-temporelle des matières en suspension dans les bassins versants : approche combinant observations des flux, traçage et modélisation distribuée. Thèse Océan, Atmosphère, Hydrologie de l'Université Grenoble Alpes. Soutenue le 30/06/2020