



HAL
open science

Protocoles d'échantillonnage et d'analyses classiques et innovantes des échantillons de source et de mélange pour la caractérisation biogéochimique des eaux de surface

Matthieu Masson, Céline Duwig, Christine Baduel, Amine Boukra, Benoit Cournoyer, Armelle Crouzet, Sophie Darfeuil, Amandine Daval, Lysiane Dherret, Angélique Dominguez Lage, et al.

► To cite this version:

Matthieu Masson, Céline Duwig, Christine Baduel, Amine Boukra, Benoit Cournoyer, et al.. Protocoles d'échantillonnage et d'analyses classiques et innovantes des échantillons de source et de mélange pour la caractérisation biogéochimique des eaux de surface. Projet CHYPSTER, Livrable WP2-1, Rapport final, INRAE - RiverLy; IGE – Institut des Géosciences de l'Environnement; LEM - UMR 5557. 2024, 65 p. hal-04734487

HAL Id: hal-04734487

<https://hal.inrae.fr/hal-04734487v1>

Submitted on 14 Oct 2024

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



Distributed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License

Protocoles d'échantillonnage et d'analyses classiques et innovantes des échantillons de source et de mélange pour la caractérisation biogéochimique des eaux de surface

Livrable WP2-1 (rapport final)

Auteurs : Matthieu Masson¹, Céline Duwig³, Christine Baduel³, Amine Boukra¹, Benoit Cournoyer², Armelle Crouzet³, Sophie Darfeuille³, Amandine Daval¹, Lysiane Dherret¹, Angélique Dominguez Lage², Patrick Ginot³, Olivier Grandjouan¹, Laure Jullien³, Mickaël Lagouy¹, Christelle Margoum¹, Jean M.F. Martins³, Cécile Miège¹, Guillaume Nord³, Lorenzo Spadini³, Nguyen Tuyet³, Céline Voiron³, Marina Coquery¹

	¹ unité de recherche RiverLy (fonctionnement des hydrosystèmes), INRAE, Villeurbanne
	² LEM, laboratoire d'écologie microbienne (UMR), Université Lyon 1 - VetAgro Sup
	³ IGE, institut des géosciences de l'environnement (UMR 5001), Université Grenoble Alpes
	⁴ PACTE, laboratoire de sciences sociales (UMR 5194), université Grenoble Alpes

Remerciements

Ce rapport a été réalisé dans le cadre du projet de recherche CHYPSTER « Approche intégrée biogéochimique, géographique et hydrologique pour déterminer les sources de contaminants sur des bassins versants d'usage mixte », financé par l'ANR (projet ANR-21-CE34-0013).

Pour citer ce rapport :

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

Résumé

Le projet CHYPSTER repose sur l'acquisition d'un grand jeu de données biogéochimiques issues d'analyses physico-chimiques et microbiologiques d'échantillons d'eaux de surface sur les bassins versants du Ratier (sous-bassin de l'Yzeron) et de la Claduègne. Deux types d'échantillons d'eau sont prélevés : d'une part, des échantillons de sources diffuses et ponctuelles et, d'autre part, des échantillons prélevés lors d'évènements pluvieux/hydrologiques aux sites de mélange (ou exutoires) dans les rivières. Les protocoles d'échantillonnage des échantillons de source (prélèvements manuels) et de mélange (à l'aide de préleveurs automatiques) sont détaillés, ainsi que les protocoles de traitement, sous-échantillonnage et conditionnement des échantillons ramenés au laboratoire en vue de leurs analyses ultérieures. L'ensemble des techniques analytiques mises en œuvre dans le cadre du projet CHYPSTER sont décrites : techniques classiques (isotopes de l'eau, anions et cations majeurs, carbone organique dissous, caractérisation optique de la matière organique dissoute, métaux dissous (ou éléments traces métalliques), micropolluants organiques, paramètres microbiens avec le dénombrement de bactéries viables cultivables) ou innovantes (caractérisation moléculaire de la matière organique dissoute, analyse non ciblée suspectée des micropolluants organiques, paramètres microbiens avec séquençage d'amplicons de gènes / ADN). Les performances des méthodes d'analyses sont précisées, ainsi que l'ensemble des contrôles qualité (ex : blancs labo filtration, blancs terrain, répliqués d'échantillonnage) mis en place pour assurer la robustesse des résultats. La plupart des analyses ont été réalisées dans deux laboratoires différents, ce qui permet de proposer quelques recommandations afin de garantir la robustesse de la qualité des données.

Mots clefs : Yzeron, Claduègne, source, mélange, échantillonnage, eau de rivière, paramètres majeurs, matière organique dissoute, métaux dissous, contaminants organiques, isotopes de l'eau, bactéries, gènes, ADN.

Table des matières

1. INTRODUCTION	5
2. PROTOCOLES D’ECHANTILLONNAGE ET DE CONDITIONNEMENT DES ECHANTILLONS	6
2.1 Echantillons de source	6
2.1.1 Analyses physico-chimiques <i>in situ</i> (RiverLy et IGE)	6
2.1.2 Protocole pour le BV du Ratier / Yzeron (protocole RiverLy et LEM)	6
2.1.3 Protocole pour le BV de la Claduègne (protocole IGE)	9
2.2 Echantillons de mélange	12
2.2.1 Protocole pour le bassin du Ratier (Yzeron) (protocole RiverLy et LEM)	12
2.2.2 Protocole pour le bassin de la Claduègne (protocole IGE)	15
2.3 Echantillonnage complémentaire pour l’étude de la coalescence de communautés bactériennes au sein de biofilms se développant en rivière	16
3. PROTOCOLES ANALYTIQUES MIS EN ŒUVRE	18
3.1 Analyse des ions majeurs et de la silice dissoute	19
3.1.1 Analyse dans les laboratoires de RiverLy.....	19
3.1.2 Analyse dans les laboratoires de l’IGE	20
3.2 Analyse des métaux dissous	22
3.3 Caractérisation de la matière organique dissoute (MOD)	24
3.3.1 Mesure de la concentration en carbone organique dissous (COD) et azote total dissous (NTD)	24
3.3.2 Analyse par spectrophotométrie UV-visible.....	24
3.3.3 Mesure de distribution de taille des molécules organiques par chromatographie d’exclusion stérique (HPSEC)25	
3.3.4 Analyse moléculaire non ciblée de la MOD par chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse haute résolution (LC-HRMS)	27
3.3.4.1 Analyse par LC-HRMS.....	27
3.3.4.2 Traitement des données générées	28
3.4 Mesure des rapports isotopiques de l’eau	29
3.4.1 Echantillons du Ratier / Yzeron : analyse isotopique par spectroscopie d’absorption	29
3.4.2 Echantillons de la Claduègne : analyse des ratios isotopiques par spectroscopie à balayage en longueur d’onde	30

3.5	Analyse des micropolluants organiques	30
3.5.1	Analyse des micropolluants organiques dans les laboratoires de RiverLy	30
3.5.2	Analyse des micropolluants organiques dans les laboratoires de l'IGE.....	33
3.5.3	Analyse suspectée dans les laboratoires de l'IGE.....	36
3.6	Analyse des paramètres microbiens	37
3.6.1	Analyses microbiennes au LEM	37
3.6.1.1	Bactéries indicatrices de contaminations fécales	37
3.6.1.2	Bactéries hétérotrophes totales	38
3.6.1.3	Approches diagnostics ADN.....	38
3.6.1.4	Compléments du LEM pour la réalisation des tests qPCR de la trousse OTHU	41
3.6.2	Analyses microbiennes à l'IGE	43
4.	CONTROLES QUALITE MIS EN PLACE LORS DE L'ECHANTILLONNAGE ET DU TRAITEMENT DES ECHANTILLONS	44
4.1	Blancs terrain et laboratoire	44
4.1.1	Résultats des blancs pour les ions majeurs et la silice dissoute	45
4.1.2	Résultats des blancs pour la matière organique dissoute (MOD)	46
4.1.3	Résultats des contrôles qualité pour les métaux dissous.....	47
4.2	Reproductibilité des échantillonnages et des analyses	49
4.2.1	Reproductibilité pour les ions majeurs et la silice dissoute	49
4.2.2	Reproductibilité pour la caractérisation de la MOD.....	50
4.2.3	Reproductibilité pour les métaux dissous	52
4.3	Comparaison des préleveurs	53
4.4	Synthèse sur la qualité des échantillonnages et analyses	55
5.	CONCLUSIONS	56
	REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	58
ANNEXE 1	: Code "Campbell IGE" - déclenchement des échantillonneurs automatiques ISCO (IGE)	63
ANNEXE 2	: Extraction d'ADN : Dneasy Blood & Tissue, Qiagen (Source : Laurence Marjolet - Vetagro Sup)	65

1. Introduction

Dans le cadre du projet CHYPSTER, un jeu de données biogéochimiques est produit à partir d'analyses physico-chimiques et microbiologiques réalisées sur des échantillons d'eau de surface. Deux types d'échantillons d'eau sont prélevés sur les bassins versants (BV) du Ratier (sous-bassin de l'Yzeron) et de la Claduègne : i) des échantillons de sources diffuses et ponctuelles (notés « échantillons de source ») prélevés dans les cours d'eau en aval de sous-bassins versant homogènes en terme d'occupation et d'usage de sol, géologie, pédologie, et dans des rejets anthropiques tels que des déversoirs d'orage ou des rejets de station de traitement d'eaux usées ; et ii) des échantillons prélevés lors d'évènements pluvieux/hydrologiques aux sites de mélange (ou exutoires) dans les rivières où plusieurs sources peuvent être potentiellement mélangées (notés « échantillons de mélange »). La stratégie de choix des sites est décrite dans le livrable WP1.1. Tous ces échantillons sont analysés pour une large gamme de paramètres et de contaminants dissous (isotopes de l'eau, ions majeurs, métaux dissous, matière organique, micropolluants organiques) ou en suspension (paramètres microbiens), en utilisant des protocoles analytiques adaptés, déployés en routine dans les laboratoires de l'IGE, de RiverLy et du LEM. Les bases de données produites à partir de ces protocoles sont présentées dans les livrables WP2-2 et WP2-3.

Ce livrable décrit l'ensemble des protocoles d'échantillonnage et d'analyse des échantillons d'eau prélevés dans les BV du Ratier et de la Claduègne. Dans une première partie, les protocoles d'échantillonnage des échantillons de source (prélèvements manuels) et de mélange (à l'aide de préleveurs automatiques) sont détaillés. Dans une deuxième partie, les traitements, sous-échantillonnage et conditionnement des échantillons ramenés au laboratoire en vue de leurs analyses ultérieures sont précisés. Dans une troisième partie, l'ensemble des techniques analytiques classiques (isotopes de l'eau, anions et cations majeurs, carbone organique dissous, caractérisation optique de la matière organique dissoute, métaux dissous, micropolluants organiques, paramètres microbiens avec le dénombrement de bactéries viables cultivables) ou innovantes (caractérisation moléculaire de la matière organique dissoute, analyse non ciblée suspectée des micropolluants organiques, paramètres microbiens avec séquençage d'amplicons de gènes / ADN) mises en œuvre dans le cadre du projet CHYPSTER sont décrites. Enfin, une dernière partie présente les contrôles qualité mis en place pour l'échantillonnage et le traitement des échantillons et fait la synthèse des résultats de tous ces contrôles et tests.

2. Protocoles d'échantillonnage et de conditionnement des échantillons

2.1 Échantillons de source

Les échantillons de **sources diffuses** ont été prélevés manuellement dans les cours d'eau ou les écoulements de surface en aval de **sous-bassins versant homogènes** en terme d'occupation et d'usage de sol, géologie, pédologie. Les échantillons de **sources ponctuelles** (i.e. rejets de station d'épuration et déversoirs d'orage) ont été prélevés manuellement dans les rejets de station de traitement des eaux usées (STEU) ou les réseaux d'assainissement unitaire. La description et la localisation des échantillons de source sont détaillées dans le livrable WP1-1 ; les dates d'échantillonnage sont indiquées dans le livrable WP2-2. Naturellement, les protocoles d'échantillonnage et de conditionnement des échantillons dépendent de leur destination analytique. L'ensemble des paramètres analysés est détaillé dans le Tableau 1. Du fait des pratiques de chaque laboratoire, les protocoles d'échantillonnage sont légèrement différents pour les deux BV du Ratier (prélèvement et conditionnement par RiverLy) et de la Claduègne (prélèvement et conditionnement par l'IGE). Enfin, des mesures physico-chimiques *in situ* sont systématiquement réalisées lors des prélèvements d'échantillons de source avec une sonde multi-paramètres.

2.1.1 Analyses physico-chimiques *in situ* (RiverLy et IGE)

Les mesures de température de l'eau, pH, conductivité (rapportée à 20°C), concentration en oxygène dissous et saturation en oxygène, turbidité, sont réalisées *in situ* à l'aide de sondes submersibles (sonde Horiba multiparamétrique pour le BV du Ratier ; sonde WTW3430 pour le BV de la Claduègne). Quand le niveau de l'eau est suffisant, les sondes sont directement immergées dans le cours d'eau. Quand les écoulements sont trop faibles, les sondes sont immergées dans un récipient (e.g. seau en inox ou contenant du fournisseur Horiba) contenant de l'eau prélevée. Les résultats obtenus sont notés sur des feuilles terrain avant d'être bancarisés dans des fichiers de résultats (stockage sur le serveur NextCloud, Cf. livrable WP2.2). La fiabilité des sondes est systématiquement vérifiée avant chaque campagne à l'aide de solutions certifiées. Les sondes sont étalonnées au laboratoire si besoin.

2.1.2 Protocole pour le BV du Ratier / Yzeron (protocole RiverLy et LEM)

Les échantillons de source sont prélevés directement à l'aide de flacons d'échantillonnage qui sont rapportés au laboratoire. Pour certaines sources (e.g. dans le réseau unitaire), une perche est utilisée pour atteindre l'eau à prélever. Lors de l'échantillonnage, il est recommandé d'éviter de remuer le fond pour ne pas remettre en suspension d'éventuelles particules sédimentées. Les flacons sont rincés trois fois avec l'eau du site avant leur remplissage jusqu'au maximum.

Les échantillons de source du bassin du Ratier sont collectés dans quatre types de flacons d'échantillonnage selon les familles d'analyses qui sont réalisées au laboratoire :

- Pour les analyses de carbone organique dissous (COD), et de caractérisation de la matière organique dissoute (MOD) (spectrophotométrie UV-visible et chromatographie d'exclusion stérique, HPSEC) : un flacon en verre (Pyrex, 250 mL) préalablement lavé au lave-vaisselle de laboratoire en utilisant de l'eau chaude et une solution diluée de détergent alcalin ; le flacon est ensuite calciné à 500°C pendant 2 h.

- Pour les analyses de micropolluants organiques et de caractérisation moléculaire de la MOD (spectrométrie de masse haute résolution - HRMS) : un flacon en verre ambré (2 L si possible ; sinon 1 L car flacon 2 L difficile à remplir pour certaines sources lorsque le niveau d'eau est bas), préalablement lavé comme celui pour le COD.

- Pour les analyses de cations et anions majeurs, métaux dissous, silice et isotopes de l'eau : un flacon en polyéthylène haute densité (HDPE, 1 L, neuf et utilisé tel quel).

- Pour les analyses de microbiologie (dénombrement bactéries viables cultivables et amplification gène / ADN) : un flacon en HDPE (1 L, neuf et utilisé tel quel).

Tous les échantillons prélevés sur site sont stockés dans des glacières à 4°C jusqu'à leur retour au laboratoire où ils sont filtrés et conditionnés dans les 24 h pour les différents types d'analyses (cf. Tableau 1).

Arrivés au laboratoire (et au plus tard 24 h après prélèvement), les échantillons pour les analyses de métaux dissous, de paramètres majeurs (anions et cations majeurs, silice dissoute et alcalinité) et d'isotopes de l'eau sont filtrés (filtre <0.45 µm en polyfluorure de vinylidène, PVDF) sur une unité de filtration en polycarbonate avec support de filtre en polypropylène (Nalgène) préalablement nettoyée (lave-vaisselle de laboratoire en utilisant de l'eau chaude et une solution diluée de détergent alcalin et rincée à l'acide acétique puis à l'eau déminéralisée ; trempage pendant 48 h minimum dans un bain d'acide nitrique 65% RPE dilué (20% v/v) et rinçage abondant à l'eau déminéralisée ; trempage pendant 48 h minimum dans un bain d'acide chlorhydrique 37% RPE (dilué à 10% v/v) et rinçage à l'eau déminéralisée et enfin à l'eau ultra-pure ; stockage à l'abri de la poussière avant utilisation dans des sacs zippés). L'unité de filtration est minutieusement rincée à l'eau ultra-pure entre chaque échantillon. Le filtrat est ensuite réparti dans différents flaconnages suivant les analyses à réaliser :

- métaux dissous : 50 mL dans un tube en polypropylène (PP, Sarstedt, neuf et utilisé tel quel). Le sous-échantillon est acidifié (HNO₃ 65 % de qualité Suprapur, 0,5% v/v) puis stocké à 4°C jusqu'à analyse ;

- anions et cations majeurs, silice dissoute : 40 mL minimum dans un flacon en HDPE (neuf et utilisé tel quel) stocké à 4°C jusqu'à analyse dans les 48 h (pour les ions majeurs) et dans les 14 jours (pour Si) après prélèvement ;

- alcalinité : 50 mL minimum dans un flacon en HDPE (neuf et utilisé tel quel) stocké à 4°C jusqu'à analyse dans les 48 h après prélèvement ;

- isotopes de l'eau : 2 mL dans un vial en verre (neuf et utilisé tel quel ; sans air) stocké à 4°C jusqu'à analyse.

Les échantillons pour les analyses de COD et de caractérisation optique de la MOD (spectrophotométrie UV-visible et HPSEC) sont filtrés (filtre <0.7 µm en fibre de verre GF/F calciné à 500°C) sur unité de filtration en verre préalablement nettoyée (lave-vaisselle de laboratoire en utilisant de l'eau chaude et une solution diluée de détergent alcalin et rincée à l'eau déminéralisée). Les pièces non rodées de l'unité de filtration sont aussi calcinées à 500°C pendant 2 h. L'unité de filtration est minutieusement rincée à l'eau ultra-pure entre chaque échantillon. Un minimum de 50 mL de filtrat sont introduits dans un flacon en verre (lavée comme les flacons en verre d'échantillonnage) pour l'analyse ultérieure de COD. Le filtrat est acidifié (HCl 2N, 1% v/v) avant d'être stocké à 4°C jusqu'à l'analyse dans un délai de 1 mois maximum. De plus, 20 mL minimum de filtrat sont introduits dans un flacon en HDPE (neuf et utilisé tel quel) stockés à 4°C pour la caractérisation optique de la MOD.

Les échantillons pour les analyses de micropolluants organiques et pour la caractérisation moléculaire de la MOD sont filtrés (filtre <0.7 µm en fibre de verre GF/F calcinés à 500°C) sur unité de filtration en verre préalablement nettoyée (lave-vaisselle de laboratoire en utilisant de l'eau chaude et une solution diluée de détergent alcalin ; le flacon est ensuite calciné à 500°C pendant 2 h). Une unité de filtration différente est utilisée pour chaque échantillon. Deux flacons en verre ambré préalablement nettoyés comme les unités de filtration sont remplis avec 250 mL de filtrat pour les analyses de micropolluants organiques ciblés « Multi-urbain » et pesticide réalisées à RiverLy. Ces sous-échantillons sont congelés à -20°C jusqu'à leur analyse. Un dernier flacon en verre est rempli avec 500 mL de filtrat pour les analyses de micropolluants organiques ciblés et non ciblés réalisés par l'IGE. Ces sous-échantillons sont aussi congelés à -20°C avant d'être expédiés à l'IGE pour leur analyse. Enfin, 6 vials en verre (Vial TruView® LCMS certifié Waters®) sont remplis avec 950 mL de filtrats (filtré sur filtre seringue en polyester <0.20 µm) pour la caractérisation moléculaire de la MOD (analyse LC-HRMS). Afin de s'assurer de la bonne conservation de ces échantillons, 3 vials sont stockés à 4°C et 3 autres sont congelés à -20°C jusqu'à leur analyse par LC-HRMS.

En ce qui concerne les échantillons pour les analyses microbiologiques, entre 370 mL et 1500 mL d'eau sont filtrés (filtre 0.22 µm en polycarbonate) selon la quantité de matières en suspension. Après

filtration, les filtres sont insérés dans un tube stérile et 500 µL de tampon GITC (Guanidine IsoThioCyanate) sont ajoutés avant conservation des filtres par congélation à -80°C, jusqu'aux manipulations suivantes.

2.1.3 Protocole pour le BV de la Claduègne (protocole IGE)

Pour le bassin de la Claduègne, compte-tenu des 3 h de route qui séparent les sites d'échantillonnage du laboratoire, les échantillons de source sont filtrés directement sur site (filtre <0.22 µm en acétate de cellulose) pour la plupart des paramètres mesurés (Tableau 1). Sauf mention contraire détaillée ci-dessous, les prélèvements par seringue pour remplissage des tubes Falcon en polypropylène (PP) se font directement en aspirant l'eau du cours d'eau dans la seringue après triple rinçage avec cette même eau. Les prélèvements dans les bouteilles se font dans la mesure du possible par immersion directe de la bouteille dans le cours d'eau, après triple rinçage. En situation d'un cours d'eau à profondeur trop faible, les bouteilles > 500 mL sont remplies en utilisant un bécher de 250 mL, lui-même rincé trois fois avec l'eau de rivière avant utilisation.

Les échantillons filtrés sont conditionnés dans différents flaconnages en fonction du type d'analyse et stockés dans des glacières à 4°C jusqu'à leur retour au laboratoire :

- Pour les métaux dissous et la silice dissoute : un tube Falcon™ 15 mL « metal-free » en PP clarifié (neuf et utilisé tel quel). Les échantillons sont ensuite acidifiés (HNO₃ 65 % de qualité Ultrapur, 2% v/v) puis stockés à 4°C après leur retour au laboratoire.

- Pour les ions majeurs, l'alcalinité et les isotopes de l'eau : trois tubes Falcon 15 mL standard en PP clarifié (neuf et utilisé tel quel) remplis au ras-bord. Ramené au laboratoire, 1/3 du contenu est jeté avant congélation à -20°C (nb. la congélation est à réaliser après dilution, cf. 3.1.2).

Pour les micropolluants organiques et la caractérisation de la MOD, un flacon d'échantillonnage en verre ambré 2 L est rempli par immersion dans le cours d'eau si sa profondeur le permet, ou alors le flacon est rempli à l'aide d'un bécher de 250 mL. Les flacons (et le bécher) sont préalablement lavés au lave-vaisselle de laboratoire en utilisant de l'eau chaude et une solution diluée de détergent alcalin puis nettoyés à l'acétone pour décontamination et calcinés à 500°C. Les échantillons sont stockés dans des glacières à 4°C jusqu'à leur retour au laboratoire. L'échantillon est filtré sur une unité de filtration (filtre <0.7 µm GF/F) pour les micropolluants organiques, le COD et la caractérisation de la MOD. Tout le matériel de filtration en contact avec l'eau prélevée lors de cette manipulation est nettoyé à l'eau déionisée entre chaque filtration d'échantillons.

Le filtrat est ensuite réparti dans les flacons d'analyses préalablement nettoyés et traités de la manière suivante :

- Les flacons en verre ambré utilisés pour les micropolluants organiques sont préalablement lavés au lave-vaisselle de laboratoire utilisant de l'eau chaude et une solution diluée de détergent alcalin. Les flacons sont ensuite nettoyés à l'acétone pour décontamination et calcinés à 500 °C. Deux flacons en verre ambré de 250 mL sont utilisés pour les méthodes du LAMA multi-urbain et pesticides, et 2 flacons de 500 mL pour les méthodes de l'IGE pour les contaminants émergents et « non-ciblé ».

- Pour le COD : un flacon de 100 mL en verre préalablement conditionné comme les flacons pour les micropolluants organiques. L'échantillon est acidifié (HCl 2N, 1% v/v) puis stocké à 4°C.

- Pour la caractérisation optique de la MOD (spectrophotométrie UV-visible et HPSEC) : un flacon de 40 mL en HDPE (neuf et utilisé tel quel) est rempli avec 20 mL d'échantillon filtré et stocké à 4°C avant l'analyse.

- Pour la caractérisation moléculaire de la MOD (analyse LC-HRMS) : 6 vials en verre ambré neuf de 1 mL. Trois vials sont gardés à 4°C et trois vials sont stockés au congélateur à -20°C.

Pour les analyses de microbiologie (abondance relative des communautés bactériennes totales, résistantes au cuivre et à certains antibiotiques), les échantillons sont collectés sur le terrain dans un flacon en verre ambré de 500 mL préalablement lavé au lave-vaisselle de verrerie en utilisant de l'eau chaude et une solution diluée de détergent alcalin puis autoclavé à 120°C pendant 20 minutes. Pour éviter toute contamination aérienne, l'ouverture, le remplissage et la fermeture du flacon se font sous l'eau, bouchon tourné vers l'amont. Après échantillonnage, les échantillons sont soit filtrés à l'issue de la journée, soit congelés à -20°C pour analyse ultérieure. La filtration (<0.22 µm, acétate de cellulose, stérile) est effectuée en condition stérile (sous PSM II). Les échantillons sont réfrigérés à 4°C entre prélèvement et analyse. Après filtration, les filtres sont insérés dans un tube de 15 mL stérile et 500 µL de tampon GITC (Guanidine IsoThioCyanate) sont ajoutés avant congélation des filtres à -80°C jusqu'à analyse.

Tableau 1 : Paramètres analysés et procédures de conditionnement des échantillons d'eau ramenés au laboratoire en fonction des méthodes analytiques et des laboratoires. MOD : matière organique dissoute ; HDPE : polyéthylène de haute densité ; PVDF : polyfluorure de vinylidène ; AC : acétate de cellulose ; PC : polycarbonate ; pyr. 500°C : pyrolysé à 500°C ; PET : polyéthylène téréphtalate. PP : polypropylène ; Sp : Suprapur (qualité acide) ; Up : Ultrapur (qualité acide).

type de paramètres / famille substances	description détaillée	laboratoire	Analyse		Filtration et conditionnement des échantillons au laboratoire ou sur le terrain avant analyse				
			méthode	référence normative	type flaconnage	nettoyage flaconnage	filtration	volume min. (mL)	conservation
cations majeurs	ammonium, potassium, sodium, calcium, magnésium	RiverLy	chromatographie ionique	NF EN ISO 14911 (1999)	HDPE	neuf	< 0.45 µm PVDF	10	4°C, dosage <48h
		IGE		-	Falcon™ 15 mL (metal-free)	neuf	< 0.22 µm AC	15	10 mL, -20°C
anions majeurs	nitrate, nitrite, phosphate, chlorure, sulfate	RiverLy	chromatographie ionique	EN ISO 10304-1 (2009)	HDPE	neuf	< 0.45 µm PVDF	10	4°C, dosage <48h
		IGE		-	Falcon™ 15 mL (metal-free)	neuf	< 0.22 µm AC	15	10 mL, -20°C
alcalinité	hydrogénocarbonates et carbonates	RiverLy	dosage potentiométrique	NF EN ISO 9963-1 (1996)	HDPE	neuf	< 0.45 µm PVDF	50	4°C, dosage <48h
		IGE	chromatographie ionique	EN ISO 10304-1 (2009)	Falcon™ 15 mL (metal-free)	neuf	< 0.22 µm AC	15	10 mL, -20°C
silice soluble	silice soluble	RiverLy	spectrophotométrie au molybdate d'ammonium	NF T90-007 (2001)	HDPE	neuf	< 0.45 µm PVDF	20	4°C, dosage <14j
		IGE	ICP-MS (voir métaux)	-	-	-	-	-	-
carbone organique dissous	concentration en carbone organique dissous (COD)	RiverLy	thermique (850°C) + catalyseur (Pt), mesure directe	NF EN 1484	verre, 100 mL	lave vaisselle et pyr. 500°C	< 0.7 µm GF/F calcinés 500°C	50	acidifié HCl pH2, 4°C
spectre UV-visible	spectre d'absorbance de 200 à 800 nm	RiverLy	spectrophotométrie	-	HDPE	neuf	< 0.7 µm GF/F calcinés 500°C	10	4°C
Caractérisation taille MOD	HPSEC avec spectres 200-400 nm et 4 couples fluorescence ex/em	RiverLy	HPSEC-UV/fluorescence	-	HDPE	neuf	< 0.7 µm GF/F calcinés 500°C	10	4°C
Caractérisation MOD	analyse non ciblée empreinte MOD	RiverLy	LC-HRMS avec approche non ciblée empreinte	-	flacon verre, 20mL	lave vaisselle et pyr. 500°C	< 0.22 µm PET	10	4°C et -20°C
métaux dissous	Li, B, Al, Ti, V, Cr, Mn, Fe, Co, Ni, Cu, Zn, As, Rb, Sr, Mo, Cd, Ba, Pb, U (+ Si pour IGE)	RiverLy	ICP-TQ-MS	NF EN ISO17294-2 (2005)	PP	neuf	< 0.45 µm PVDF	50	ac. HNO ₃ Sp 0,5% v/v, 4°C
		IGE	ICP-MS	Note technique ICPMS iCAP TQ Thermo Fisher Scientific + mise au point S. Darfeuil	Falcon™ 15 mL (metal-free)	neuf	< 0.22 µm AC	10	ac. HNO ₃ Up 2% v/v, 4°C
isotopes de l'eau	² H et ¹⁸ O	RiverLy	Spectroscopie laser	-	vial verre, 2mL	neuf	< 0.45 µm PVDF	2	sans air, 4°C
		IGE	picarro	-	Falcon™ 15 mL (metal-free)	neuf	< 0.22 µm AC	10	10 mL, -20°C
Paramètres microbiens : dénombrement bactéries viables cultivables	Hétérotrophes totaux	LEM	dilution/étalement/TSA 1/10		HDPE, 2L	neuf	non	10	réalisé le jour même
	<i>E.coli</i> / coliformes totaux		NPP IDEXX	réalisé le jour même					
	Entérocoques intestinaux		NPP IDEXX	réalisé le jour même					
Paramètres microbiens : DNA meta-barcoding d'amplicons du gène (i) 16S rRNA, et (ii) tpm	gene ARNr 16S, <i>A. caviae</i> (tpm) et <i>P. aeruginosa</i> (ecfX, tpm)	LEM	qPCR	selon Aigle et al. (2021)	HDPE, 2L	neuf	<0.22 µm PC	100 (événements) 1000 (sources)	4°C
	<i>L.monocytogenes</i> , <i>S.aureus</i>								
	Integron classe 1, 1 clinique, 2 et 3								
	Bactéroidales totales								
	Bactéroides humain (HF183), ruminant, chien, porc, vache, rat								
	Bactéroides résidents tuyaux réseaux eaux usées								
<i>Prevotella</i> cheval, poulet/canard									
Paramètres microbiens : dénombrement bactéries totales	Gène 16SrRNA	IGE	qPCR						
Paramètres microbiens : dénombrement bactéries résistantes	Gène <i>su1</i>	IGE	qPCR	selon Aigle et al. (2021)	verre borosilicaté, 500 mL	lave vaisselle et autoclave 120°C	< 0.22 µm AC, stérile	100 (événements) 1000 (sources)	4°C (événements) -20°C (sources)
	Gène <i>su2</i>								
	Gène <i>tetM</i>								
	Gène <i>copA</i>								
Micropol organiques ciblés RiverLy "type pharmaceutique"	pharmaceutiques (n=43) et pesticides (n=2)	RiverLy	LC-MS-MS		verre ambré	lave vaisselle et pyr. 500°C	< 0,7 µm GF/F, pyr. 500°C	250	-20°C
Micropol organiques ciblés RiverLy "type pesticide"	37 pesticides		LC-MS-MS						
Micropol organiques ciblés IGE	120 molécules		LC-MS-MS						
Micropol organiques suspectés IGE	analyse non ciblée	IGE	LC-HRMS						

2.2 Echantillons de mélange

Les échantillons de mélange sont récupérés aux exutoires des sous-bassins du Ratier et du Mercier (pour le bassin de l'Yzeron) et des sous-bassins du Gazel et de la Claduègne (pour le bassin de la Claduègne). Ces échantillons correspondent au mélange des différentes sources prélevées en amont lors d'évènements pluvieux. Une série d'échantillons est prélevée à intervalle de temps régulier par préleveurs automatiques durant des évènements pluvieux. Plus de précisions sur ces échantillons (localisation des stations de prélèvements, dates de prélèvements...) sont apportées dans le livrable WP2-2.

2.2.1 Protocole pour le bassin du Ratier (Yzeron) (protocole RiverLy et LEM)

Pour le bassin du Ratier, deux préleveurs automatiques pour les eaux de surface sont utilisés sur chacune des deux stations de mélange (Mercier et Ratier) (Figure 1) :

- un préleveur IJINUS ISCO 3700 (dénommé ISCO) équipé d'un tuyau de pompage en Téflon permet de remplir 24 flacons en verre de 300 mL pour les micropolluants organiques et la caractérisation de la MOD par HRMS ;

- un préleveur Endress+Hauser Liquiport CSP44 (dénommé Liquiport) équipé d'un tuyau de pompage en plastique permettant de remplir 24 flacons en plastique (polyéthylène, PE) de 1 L pour les paramètres majeurs, les métaux dissous, les isotopes de l'eau, la caractérisation de la MOD par mesure de COD, spectrophotométrie UV-visible et HPSEC, ainsi que pour les paramètres microbiens.

En plus du tuyau de pompage, les préleveurs possèdent un tuyau d'écrasement en silicone d'une pompe péristaltique. Ces préleveurs permettent de collecter les 24 échantillons dans le cours d'eau lors d'un même évènement pluvieux. La fréquence d'échantillonnage dépend du type d'évènement (durée, intensité...) et varie de 15 à 45 minutes (informations données pour chaque évènement dans le livrable WP2-2). Chaque flacon est rempli en une seule fois, avec 300 mL d'eau de rivière pour les flacons en verre du préleveur ISCO et avec 900 mL d'eau de rivière pour les flacons en PE du préleveur Liquiport.

Les préleveurs sont installés la veille de l'évènement pluvieux et sont déclenchés manuellement pour que le premier échantillon soit collecté avant la pluie. Des chaînes et des cadenas sont disposés autour afin de sécuriser le matériel.



Figure 1 : Emplacement des préleveurs automatiques sur la station débit du Mercier au pont D640 (photos A et B) et emplacement des préleveurs sur la station débit du Ratier à Saint-Genis-les-Ollières (photos C et D), sur le bassin du Ratier / Yzeron.

Avant chaque campagne de prélèvement, les préleveurs automatiques et les tuyaux sont systématiquement nettoyés. Le bon état de toutes les parties du préleveur qui entrent en contact avec l'eau prélevée est vérifié et toutes ces parties sont rincées à l'eau déminéralisée pour le préleveur ISCO et avec de l'eau du réseau d'adduction pour le préleveur Liquiport. L'extérieur des tuyaux est rincé abondamment à l'eau déminéralisée ou de réseau et essuyé avec un chiffon propre. Un nettoyage minutieux des tuyaux de pompage en Téflon du préleveur ISCO est nécessaire en appliquant successivement les réactifs suivants à l'intérieur du tuyau (Eymery et al., 2011) :

- eau déminéralisée (5 L) ;
- solution de détergent alcalin diluée (1 L) ;
- eau déminéralisée (1 L) ;
- eau acidifiée (acide acétique 80% dilué au quart avec de l'eau déminéralisée) (1 L) ;
- eau déminéralisée (1 L) ;
- acétone ultra-pure (0.25 L) ;
- eau déminéralisée (5 L).

Pour cela, les différents réactifs sont successivement mis à circuler en appliquant un temps de contact de 2 minutes environ pour chaque produit nettoyant et lors du rinçage.

Les tuyaux de pompage du préleveur Liquiport ne sont pas nettoyés selon ce protocole, ils sont uniquement rincés avec de l'eau du réseau d'adduction puis avec l'eau du site avant le prélèvement.

Les tuyaux d'écrasement en silicone des deux types de préleveurs sont rincés avec de l'eau déminéralisée (préleveur ISCO) et avec de l'eau du réseau d'adduction puis autoclavés en laboratoire (préleveur Liquiport) entre chaque campagne. Une fois les préleveurs installés, les tuyaux de prélèvement sont rincés avec l'eau du site avant le prélèvement. Un cycle de rinçage des tuyaux de prélèvement avec l'eau du site est programmé avant et après chaque remplissage des flacons.

Les flacons d'échantillonnage sont traités de la manière suivante :

- les flacons en plastique utilisés avec le préleveur Liquiport sont pré-nettoyés avec de l'eau déminéralisée, puis passés au lave-vaisselle de laboratoire avec un cycle HCl/NaOH pour éliminer les traces de contaminants. Ces flacons sont ensuite autoclavés ;

- les flacons en verre utilisés avec le préleveur ISCO sont préalablement lavés au lave-vaisselle de laboratoire utilisant de l'eau chaude et une solution diluée de détergent alcalin. Les flacons sont ensuite nettoyés à l'acétone pour décontamination.

Une fois les échantillons de mélange échantillonnés, les préleveurs et flacons sont ramenés rapidement au laboratoire (moins de 12 h après le dernier échantillon prélevé). Afin de récupérer suffisamment de volume d'échantillon pour réaliser l'ensemble des analyses, les flacons des préleveurs Liquiport sont regroupés deux par deux (même volume pour les deux échantillons, par pesée) dans des bouteilles en HDPE (2 L, neuves et utilisées tel quel). Chaque échantillon ainsi regroupé (environ 500 mL) est sous-échantillonné dans une nouvelle bouteille en HDPE (neuve et utilisée tel quel), puis stocké à 4°C avant leur traitement pour les analyses des paramètres microbiens (laboratoire LEM). Le reste de l'échantillon (environ 1.3 L) est stocké à 4°C jusqu'à son traitement pour les analyses des paramètres majeurs, des métaux dissous, et pour la caractérisation de la MOD par mesure de COD, spectrophotométrie UV-visible et HPSEC (laboratoire RiverLy). De la même manière, les flacons en verre du préleveur ISCO pour l'analyse des micropolluants organiques et la caractérisation moléculaire de la MOD sont regroupés deux à deux (même volume pour les deux échantillons, par pesée) avant l'étape de filtration des échantillons au laboratoire.

Tous les échantillons des préleveurs ainsi regroupés deux par deux sont filtrés, conditionnés et stockés pour analyse en suivant le même protocole que celui des échantillons de source du bassin du Ratier (protocole RiverLy et LEM ; Tableau 1 ; Cf. § 2.1.2).

2.2.2 Protocole pour le bassin de la Claduègne (protocole IGE)

Pour le bassin de la Claduègne, des préleveurs automatiques ISCO 3700 sont utilisés pour prélever les eaux de mélange à l'exutoire des bassins versants du Gazel et de la Claduègne (Figure 2). Chaque préleveur permet de collecter 24 flacons plastiques (PP) de 1 L dans le cours d'eau lors d'un même évènement pluvieux. Les préleveurs sont équipés de tuyaux d'écrasement en silicone et de tuyaux de prélèvement en vinyle. Les deux sites de prélèvement étant éloignés des laboratoires (3 h de route), les préleveurs sont installés sur site indépendamment des évènements à échantillonner. Des chaînes et des cadenas sont disposés autour afin de sécuriser le matériel. Avant chaque prélèvement, la pompe péristaltique située dans la partie supérieure de l'ISCO s'actionne pour rincer les tuyaux avec l'eau du site (0.5 à 1 L). Les flacons ISCO sont nettoyés avant chaque campagne de prélèvement au lave-vaisselle de laboratoire, puis dans un bain d'acide nitrique à 5% avant d'être rincés dans un bain d'eau déionisée type I. Ils sont ensuite nettoyés deux fois avec du méthanol puis rincés 2 fois avec 100 mL d'eau ultra-pure.

A l'exutoire de la Claduègne, deux préleveurs sont programmés pour collecter un échantillon en parallèle toutes les 50 min selon des conditions de variations de niveau d'eau dans la rivière (voir code "Campbell IGE" commenté en annexe 1). Afin de récupérer assez de volume d'échantillon pour les besoins analytiques, les flacons de chacun des deux préleveurs collectés en même temps sont regroupés au laboratoire.

A l'exutoire du sous-bassin du Gazel un seul préleveur ISCO est installé. On obtient le volume nécessaire de 2 L en regroupant, au laboratoire, deux flacons consécutifs (comme sur le BV du Ratier, même volume pour les deux échantillons). Là aussi, les prélèvements sont automatisés selon des seuils de turbidité et de niveau d'eau dont les limites varient en fonction de la saison. Lorsque les deux conditions sont remplies, la fréquence d'échantillonnage est de 30 minutes.



Figure 2 : Emplacement des préleveurs automatiques pour la collecte des échantillons de mélange sur la station débit du Gazel (photos A et B) située à proximité du lycée agricole du Pradel, et sur celle de la Claduègne (photos C et D) située à proximité de la commune de Villeneuve-de-Berg.

Une fois les échantillons prélevés, les flacons sont récupérés (dans les 48 h après prélèvement du fait de la distance importante avec les laboratoires) et stockés à 4°C jusqu'à leur retour au laboratoire. Comme indiqué ci-dessus, les flacons des préleveurs sont alors regroupés deux par deux pour atteindre le volume nécessaire aux analyses. Ces échantillons composites sont ensuite filtrés puis conditionnés au laboratoire en suivant le protocole appliqué pour les échantillons de source prélevés sur la Claduègne (protocole IGE ; Tableau 1 ; Cf. § 2.1.3).

2.3 Echantillonnage complémentaire pour l'étude de la coalescence de communautés bactériennes au sein de biofilms se développant en rivière

Cette étude a été réalisée pour différencier les phénomènes de mélange et les phénomènes d'installation (coalescence) des micro-organismes des sources au sein du cours d'eau. L'étude de la coalescence impliquant la démonstration d'une implantation, un système intégratif (Germcatcher) permettant de développement des micro-organismes sous la forme de biofilms a été utilisé (Cf. Mermillod-Blondin et al., 2019 ; Colin et al., 2020). L'analyse des biofilms des Germcatchers permettra d'estimer (i) les taux de bactéries provenant des sources pouvant former des assemblages avec les formes plus endogènes du cours d'eau, et (ii) d'inférer l'impact des contaminants chimiques et des paramètres physico-chimiques sur les assemblages bactériens des biofilms.

Cette étude est réalisée sur les bassins versants du Mercier et du Ratier. La coalescence des taxa endogènes et exogènes a été étudiée sur des supports physiques (biofilms sur billes d'argile, Germcatcher) et dans la colonne d'eau (sans support). Cette étude a été réalisée sur une période de 15 semaines (du 6 mars au 19 juin 2023). Pour cela, des Germcatchers ainsi que des POCIS (Polar Organic Chemical Integrative Sampler ; Mathon et al., 2022) ont été installés dans les eaux de surface de 4 sites (Figure 3) sur le linéaire du Mercier et du Ratier, plus ou moins impactés par les sources étudiées (sous-bassins homogènes en termes d'occupation des sols). Pour chaque site, l'échantillonnage des biofilms a été réalisé à l'aide de 3 lots de Germcatchers, chaque lot installé à 0, 3 et 6 semaines, et exposés sur une durée de 3 semaines (18 Germcatchers au total) (Figure 4). Ces Germcatcher permettent d'étudier l'influence de facteurs externes (pluies, exposition à des contaminants chimiques ou influence des paramètres physico-chimiques du cours d'eau) sur les assemblages microbiens. Par ailleurs, pour chaque site, l'échantillonnage passif de micropolluants organiques a été réalisé avec des duplicats de POCIS déployés toutes les 3 semaines (10 POCIS au total). En complément, des triplicats d'eau de surface ont été prélevés également toutes les 3 semaines (18 échantillons au total).

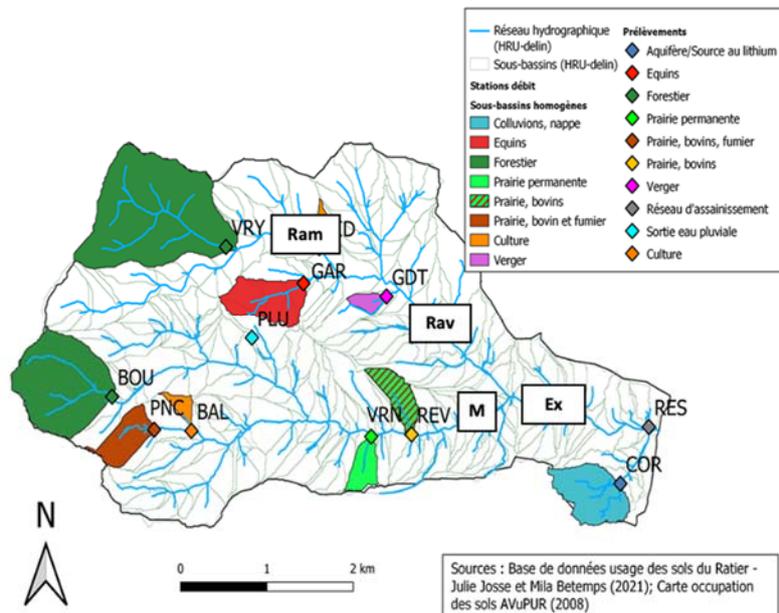


Figure 3 : Localisation des 4 sites de déploiement (Ram, Rav, M et Ex) des dispositifs d'échantillonnage (Germcatchers et POCIS) sur les cours d'eau du Mercier et du Ratier (rectangles noirs).

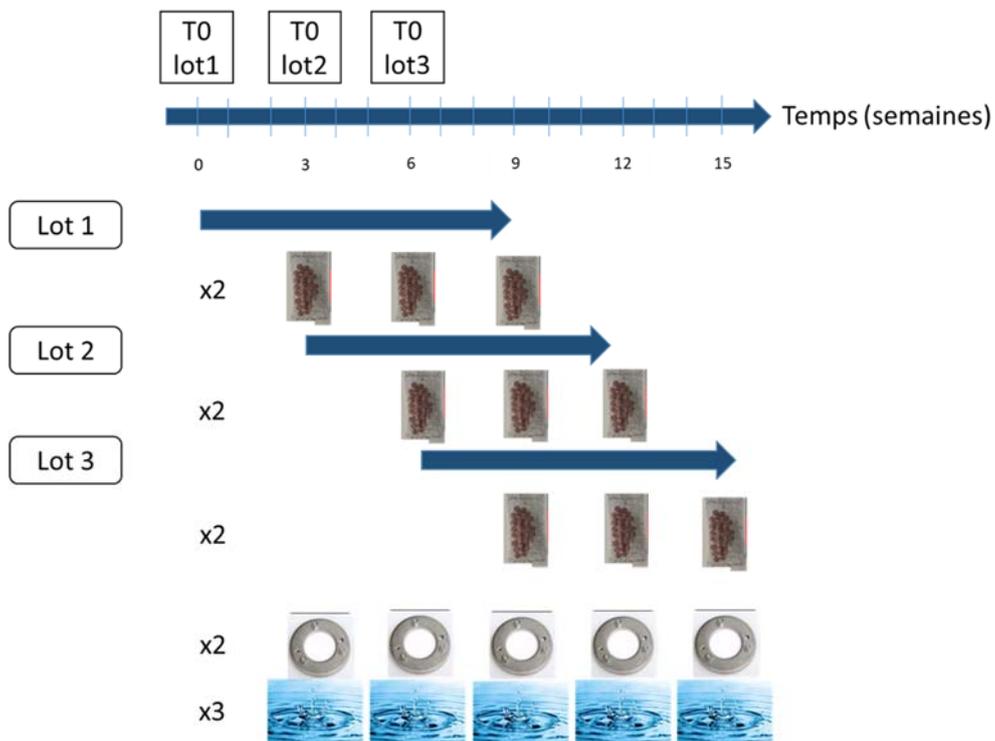


Figure 4 : Stratégie d'échantillonnage des dispositifs d'échantillonnage intégratif passif (3 lots de duplicats de Germcatchers, duplicats de POCIS), et d'échantillons ponctuels d'eaux de surface (triplicats) pour chaque site.

3. Protocoles analytiques mis en œuvre

Les analyses réalisées dans le cadre du projet CHYPSTER peuvent être regroupées suivant les types de paramètres ou familles de substances à analyser. Ainsi, 18 types d'analyses sont effectués (Tableau 1), ces types d'analyses étant assemblés en familles de paramètres :

- Paramètres majeurs : concentrations en anions majeurs (chlorure, sulfate, nitrate, nitrite, phosphate), cations majeurs (sodium, potassium magnésium, calcium, ammonium) et en silice dissoute.

- Matière organique dissoute (MOD) : concentration en carbone organique dissous (COD), spectre UV-visible (avec calcul d'indicateurs : SUVA, rapports d'absorbance, pentes spectrales), chromatographie d'exclusion stérique (avec calcul d'indicateurs sur la taille apparente de la MOD) et analyse non ciblée par chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse haute résolution (LC-HRMS).

- Métaux dissous : concentrations en Li, B, Al, Ti, V, Cr, Mn, Fe, Co, Ni, Cu, Zn, As, Rb, Sr, Mo, Cd, Ba, Pb et U.

- Rapports isotopiques de l'eau : δD et $\delta^{18}O$.

- Paramètres microbiens : flore totale cultivable (hétérotrophes totales), marqueurs contamination fécale cultivables (coliformes totaux, *Escherichia coli*, entérocoques intestinaux), bactéries totales qPCR (G16S), intégrons (navette génétique) avec ARG (gènes de résistance aux antibiotiques) qPCR (intégrons 1, intégrons 2, intégrons 3), marqueurs origine contamination fécale qPCR (Bactéroidales totaux, Hommes (HF183), ruminants (RUM2), chiens, porcs, vaches, résidents tuyaux réseaux eaux usées, rats, chevaux, poulets/canards), bactéries pathogènes qPCR (*ecfX* de *P. aeruginosa*, *tpm* de *P. aeruginosa*, *tpm* d'*A. caviae*, *S. aureus nuc*, *L. monocytogenes hlyA*), et bibliothèques de séquences d'ADN générées par approches méta-barcoding d'amplicons PCR.

- Micropolluants organiques avec 4 protocoles d'analyses ciblées pour des micropolluants d'origine urbaine, agricole et industrielle, couvrant plusieurs familles chimiques dont des phytosanitaires (insecticides, fongicides et herbicides), des produits pharmaceutiques (dont des antibiotiques et des produits de soin personnels), des produits industriels (tels que les PFAS – substances per- et poly-fluoroalkylés, benzothiazoles, benzotriazoles, plastifiants, retardateurs de flamme et additifs de pneu). Ces analyses ciblées sont réalisées par chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse en tandem (LC-MSMS). En complément de cette approche ciblée quantitative, une approche d'analyse qualitative non ciblée de type « suspectée » par HRMS (UPLC-Orbitrap) est réalisée pour couvrir une plus large gamme de micropolluants et produits de transformation.

La répartition des analyses entre les labos (Tableau 1) est réalisée comme suit :

- Laboratoire de l'IGE : analyses des paramètres majeurs, métaux dissous et paramètres microbiens pour les échantillons du bassin de la Claduègne ; analyse des micropolluants émergents (analyse ciblée et suspectée) pour les échantillons des bassins de la Claduègne et du Ratier.

- Laboratoire de RiverLy : analyses des paramètres majeurs et métaux dissous pour les échantillons du bassin du Ratier ; analyse des micropolluants organiques (analyse ciblée) et caractérisation de la MOD pour les échantillons des bassins de la Claduègne et du Ratier.

- Laboratoire du LEM : analyses des paramètres microbiens pour les échantillons du bassin du Ratier.

Chaque méthode analytique est décrite dans les paragraphes suivants. Les contrôles qualité et les performances des analyses sont aussi mentionnés.

3.1 Analyse des ions majeurs et de la silice dissoute

3.1.1 Analyse dans les laboratoires de RiverLy

Les ions majeurs sont analysés par chromatographie ionique (Metrohm, IC flex 930) en suivant la norme NF EN ISO 10304-1 (2009) pour les anions (nitrate, nitrite, phosphate, chlorure et sulfate), et la norme NF EN ISO 14911 (1999) pour les cations (sodium, potassium, magnésium, calcium, ammonium). Un passeur automatique permet d'injecter les échantillons dans chacune des deux chaînes chromatographiques. Pour le dosage des anions, deux pré-colonnes RP2 et RP3 (élimination des acides organiques), une pré-colonne C Trap1 (100 mm/4 mm) qui piège les métaux, et une colonne analytique Metrosep ASupp7 (250 mm/ 4 mm) sont utilisées pour séparer les ions. L'éluant utilisé est un mélange de carbonate de sodium (0.5 M) et d'hydrogencarbonate de sodium (0.5 M) avec un débit 0.8 mL/min. Les cations majeurs sont séparés en utilisant une précolonne Metrosep C4S (4 mm) et une colonne C6 Metrosep (250 mm/4 mm). Un mélange entre acide citrique (2.45 mM) et acide dipicolinique (1.4 mM) est utilisé comme éluant avec un débit de 0.8 mL/min.

Les échantillons sont analysés après filtration (< 0.45 µm, PVDF) dans les 48 h après échantillonnage des eaux. Les mesures hors gamme sont systématiquement reconduites après dilution automatique par l'appareil. Les contrôles qualités mis en place (blancs d'injection, autocontrôles, analyse de réplicats, participation régulière avec des essais interlaboratoires) ont permis de valider l'ensemble des concentrations des anions et des cations mesurés lors de cette étude. Les fonctions d'étalonnage, l'exactitude de la méthode, les limites de quantification (LQ) ont été validées et déterminées en se basant sur la norme NF T90-210 (2018). La justesse des résultats est évaluée avec la participation régulière (2 essais minimum par an sur des eaux naturelles) à des essais interlaboratoires (approche

par le Z-score). Les incertitudes analytiques ont été déterminées en se basant sur la norme NF ISO 11352 (2013) avec la méthode des essais interlaboratoires. Les incertitudes analytiques sont aussi contrôlées lors de chaque participation à des essais interlaboratoires (calcul de Zéta-score). Les performances analytiques (limites de quantification et incertitudes élargies, k=2) sont données pour chaque anion et cation analysés dans le Tableau 2.

Tableau 2 : Performances analytiques pour la mesure des anions et cations dans les eaux de surface par le laboratoire de RiverLy.

Anions	Limite de quantification (mg/L)	Incertitude élargie (k=2)	Cations	Limite de quantification (mg/L)	Incertitude élargie (k=2)
chlorure	1	7%	sodium	1	12%
sulfate	1	9%	potassium	1	15%
nitrate	1	13%	magnésium	1	13%
nitrite	0.05	14%	calcium	4	10%
phosphate	0.1	14%	ammonium	0.02	14%

Les concentrations en silice dissoute sont déterminées par colorimétrie. La norme NF T 90-007 (2001) a été suivie pour doser les silicates solubles (orthosilicates, acide silicique...) dans les eaux (la silice colloïdale est exclue du dosage). Le principe repose sur la complexation de la silice par le molybdate d'ammonium en milieu acide pour donner un complexe jaune verdâtre d'acide silico-molybdique qui est réduit par l'acide ascorbique en anhydride silico-molybdique de couleur bleue. L'addition d'acide oxalique élimine l'interférence des phosphates. La densité optique du complexe formé est mesurée à 815 nm à l'aide d'un spectrophotomètre (Shimadzu, UV 1900). Des blancs d'analyse (préparés à partir d'eau ultra-pure) et des solutions d'autocontrôles (0.4 et 2 mgSi.L⁻¹) sont systématiquement analysés avec les échantillons. La fonction d'étalonnage, l'exactitude de la méthode, et la limite de quantification présumée à 0.4 mgSi.L⁻¹ ont été validées en se basant sur la norme NF T90-210 (2018). La justesse des résultats est évaluée avec la participation régulière (2 essais par an sur des eaux naturelles) à des essais interlaboratoires (approche par le Z-score). L'incertitude analytique a été estimée à 12% (élargie à k=2) en se basant sur la norme NF ISO 11352 (2013). L'incertitude analytique est aussi contrôlée lors de chaque participation à des essais interlaboratoires (calcul de Zéta-score).

3.1.2 Analyse dans les laboratoires de l'IGE

Les analyses des ions majeurs sont effectuées par chromatographie ionique (DIONEX ICS3000) au sein de la plate-forme PANDA de l'IGE. La chaîne anions est couplée à un générateur d'électrolyse en éluant KOH. Un volume de 300 µL d'échantillon est injecté sur le couple de colonne AG11HC (colonne de garde) et AS11HC (colonne de séparation). Le suppresseur AERS élimine la charge ionique de l'éluant KOH avant passage dans le détecteur colorimétrique. Le travail en gradient d'éluant permet la séparation de 7 anions majeurs (nitrate, nitrite, phosphate, chlorure, sulfate, fluor et brome).

Concernant la chaîne cations, l'éluant est l'acide méthanesulfonique concentré à 27 mM. Le même volume d'échantillonnage (300 µL) est injecté sur la colonne de garde C16 puis transféré sur la colonne de séparation CS16. Il y a suppression du signal cation (système CERS) avant détection conductimétrique des 9 cations suivants : lithium, sodium, ammonium, potassium, rubidium, magnésium, manganèse, calcium, strontium.

La calibration se fait par composition d'une solution mère (une d'anions et une de cations) à partir d'un mélange de solutions étalon mono-élémentaire. Le traitement et l'analyse des chromatogrammes des anions et des cations est réalisé avec le logiciel Dionex Chromeleon. Des blancs sont systématiquement insérés dans chaque série d'échantillons (au début et à la fin, et intercalés tous les 20 échantillons). La linéarité est vérifiée en analysant la série des étalons en début et en fin d'une série d'analyse.

La plateforme PANDA est historiquement dédiée à l'analyse d'eaux glaciaires et de couverts neigeux - donc d'eaux très peu chargées. Les appareils de chromatographie ionique utilisés sont optimisés à cette fin et ne permettent pas l'injection directe d'eaux chargées en ions ce qui impose une dilution avant injection. En pratique, toute eau analysée est diluée à une conductivité électrique de 15 µS/cm avant injection. Or, les eaux de la Claduègne sont très chargées avec des conductivités électriques qui peuvent atteindre 1500 µS/cm. De tels échantillons sont donc dilués 50 à 100 fois avant injection dans les appareils de chromatographie ionique de la plateforme. Aussi, le fonctionnement de la plateforme PANDA a nécessité la préparation de gros lots d'échantillons, et donc de regrouper les échantillons de plusieurs campagnes de prélèvement pour réaliser les analyses. De ce fait, les échantillons ont été congelés avant leur dilution et analyse pour éviter leur dégradation dans le temps. Des comparaisons avec d'autres méthodes d'analyses (avec la mesure des éléments majeurs par ICP-MS et avec le laboratoire de RiverLy) ont révélé d'importantes différences de concentration pour les anions et les cations. De ce fait, plusieurs tests ont été réalisés pour contrôler le protocole de conditionnement, de traitement et d'analyse des échantillons par l'IGE. Les concentrations mesurées par chromatographie ionique et par ICP-MS dans des échantillons conditionnés selon différents protocoles (congelé/non congelé, acidifié/non acidifié, dilution à différentes étapes filtration à différentes étapes) ont été comparées. Les résultats ont permis d'adapter le protocole de prélèvement et de conditionnement de l'IGE. Désormais, les échantillons chargés de la Claduègne sont dilués avant congélation ce qui minimise les éventuelles précipitations lors de la décongélation (principalement précipitation de carbonate de calcium).

Pour le projet CHYPSTER, cela signifie que les analyses par chromatographie ionique réalisées avant mai 2023 sur les échantillons du BV de la Claduègne sont inexploitable. Ceci dit, nous disposons de l'ensemble des données de cations à l'exception de l'ammonium par le biais de l'ICP-MS ; cet

instrument fournit également la concentration élémentaire en soufre qu'on peut raisonnablement faire correspondre à la concentration en ions sulfate au vu des concentrations élevées (plusieurs dizaines de mg/L) par rapport au soufre organique présent sous forme dissoute (Raue et al., 1991). De plus, lors de l'analyse du COD, l'azote total dissous (NTD) est aussi analysé. Les concentrations en NTD des échantillons prélevés dans les cours d'eau peuvent être raisonnablement être assimilées à la concentration en ion nitrate étant donné les faibles concentrations en nitrites, ammonium et azote organique dissous que l'on mesure généralement dans ce genre de cours d'eau. Pour les échantillons de STEU, la présence d'ammonium résiduel non traité pourrait amener un léger biais dans l'équivalence entre la concentration en NTD et celle en nitrate. Ainsi, les seuls ions majeurs qui ne sont pas mesurés pour le BV de la Claduègne par rapport au BV du Ratier sont les ions chlorures, ammonium, nitrite et phosphate pour les échantillons prélevés avant mai 2023.

Contrairement au protocole d'analyse de RiverLy, les concentrations en silice dissoute des échantillons du BV de la Claduègne sont analysés par ICP-MS. Plus de détails sont donnés dans la section suivante.

3.2 Analyse des métaux dissous

L'analyse des métaux dissous par le laboratoire de RiverLy est réalisée par ICP-MS (iCAP-TQ-MS, Thermo Electron) selon la norme NF EN ISO 17294-2. L'ensemble des échantillons, étalons et autocontrôles sont acidifiés à l'acide nitrique 65 % Suprapur 0,5% v/v. La méthode d'analyse a été validée selon la norme NFTA90-210 (2018). Des autocontrôles sont analysés régulièrement en même temps que les échantillons tout au long de la série d'analyse afin de vérifier la justesse de la gamme d'étalonnage. Ces autocontrôles sont constitués d'étalons de vérification de concentration connue préparés à partir de solutions mères certifiées différentes de celles utilisées pour la gamme d'étalonnage, et de Matériaux de Référence Certifié (TMRAIN-04, eau de pluie acidifiée ; et TM27-4, eau du lac Ontario acidifiée) dont les concentrations en métaux sont connues et certifiées. Des tests de dilution sont aussi réalisés sur les échantillons afin de vérifier l'absence d'effets matrices éventuels. De plus, des étalons internes sont ajoutés dans chaque échantillon ainsi que dans la gamme d'étalonnage afin de corriger d'une éventuelle dérive de l'appareil en cours d'analyse ou d'un éventuel effet de matrice. Les limites de quantification pour chaque élément analysé ont été déterminées lors de la validation des méthodes d'analyse et sont vérifiées à chaque nouveau dosage (Tableau 3). Les incertitudes de mesure pour le dosage par ICP-MS ont été déterminées au laboratoire selon la norme XPT90-220 (2003). Elles ont été calculées en prenant en compte la reproductibilité de la mesure et sa répétabilité. Dans un souci de simplification du traitement des données, une seule valeur d'incertitude élargie de 20 % a été utilisée pour tous les éléments analysés. Enfin, la justesse des résultats et les

incertitudes analytiques sont régulièrement contrôlées avec la participation à des essais interlaboratoires (2 essais par an sur des eaux naturelles ; approches par le Z-score et par le Zéta-score).

Tableau 3 : Limites de quantification (LQ) pour l'analyse des métaux pour les échantillons d'eaux de surface des bassins versants (BV) du Ratier par le laboratoire de RiverLy, et de la Claduègne par le laboratoire de l'IGE.

LQ laboratoire (µg/L)	Li	B	Al	Ti	V	Cr	Mn	Fe	Co	Ni
RiverLy (BV Yzeron)	0.010	2.0	2.0	0.050	0.005	0.020	0.050	0.10	0.005	0.020
IGE (BV Claduègne)	0.024	0.761	0.008	0.005	0.001	0.048	0.015	0.212	0.005	0.013

LQ laboratoire (µg/L)	Cu	Zn	As	Rb	Sr	Mo	Cd	Ba	Pb	U
RiverLy (BV Yzeron)	0.050	0.50	0.010	0.010	0.050	0.010	0.005	0.010	0.010	0.005
IGE (BV Claduègne)	0.022	0.33	0.0006	0.0002	0.011	0.018	0.001	0.013	0.0098	0.0003

L'analyse des métaux dissous par l'IGE est réalisée par ICP-MS triple quadrupôle (ICP-MS iCAP-TQ-MS, Thermo Electron) sur la plateforme PANDA. La méthode analytique pour la quantification d'une cinquantaine d'éléments a été mise au point sur la base de la note technique de ThermoFisher Scientific (« Elemental method development using TQ-ICP-MS »). La source a été adaptée pour être compatible avec l'analyse du silicium : nébuliseur PFA, injecteur Sapphire et torche en céramique (Thermo) ont été utilisés pour la validation de méthode et l'analyse des échantillons. Les éléments Ir, Y, In et Tl sont utilisés comme standards internes pour corriger de la déviation de l'appareil ou d'effets matrice pour les modes KED, TQ-O2, TQ-NH3 et TQ-He, respectivement. L'appareil est optimisé dans chaque mode au préalable de toute analyse, à raison de deux fois par semaine. L'ensemble des échantillons, étalons et autocontrôles sont acidifiés à l'acide nitrique (ultra trace metal analysis grade, 2% v/v). Pour rester compatibles en termes de concentrations avec les autres échantillons analysés sur la plateforme PANDA, les échantillons d'eau de la Claduègne ont été dilués par 10 (et par 100 pour les échantillons d'eaux de la source STEU). Les étalons sont préparés à partir de solutions mono-élémentaires commerciales à 1000 µg/L (Analab). Ils sont au nombre de 7 avec des solutions diluées en cascade à partir de la solution étalon mère multi-éléments, et couvrent les valeurs rencontrées dans les échantillons (et au-delà). Le plus petit étalon est proche des limites de détection.

Des blancs et des autocontrôles sont analysés régulièrement en même temps que les échantillons tout au long de la série d'analyse (tous les 10 échantillons) afin de vérifier la justesse de la gamme d'étalonnage. Ces autocontrôles sont constitués d'étalons de vérification de concentrations connues préparés à partir de solutions mères différentes de celles utilisées pour la gamme d'étalonnage et de Standards de Référence Certifiés. Ces standards de Référence Certifiés (CMS5 et IV-STOCK50, Analab) ont des concentrations en métaux connues et certifiées, et permettent de vérifier la justesse analytique pour les éléments concernés en début et fin de chaque séquence analytique. Les

incertitudes de mesure pour le dosage par ICP-MS ont été déterminées sur la base des écarts type relatifs des autocontrôles. Elles ont été calculées en prenant en compte la reproductibilité de la mesure et sa répétabilité. La justesse et la reproductibilité sont évaluées pour chaque série analytique et permettent de fournir une valeur d'incertitude élargie de 20% utilisée pour tous les éléments analysés, dans un souci de simplification du traitement des données. Les limites de quantification pour chaque élément analysé ont été déterminées lors de la validation de la méthode d'analyse et sont vérifiées lors de chaque nouveau dosage (Tableau 3).

3.3 Caractérisation de la matière organique dissoute (MOD)

3.3.1 Mesure de la concentration en carbone organique dissous (COD) et azote total dissous (NTD)

Les analyses de carbone organique dissous (COD) et d'azote total dissous ont été réalisées à l'aide d'un analyseur de carbone organique total (TOC) Analytik Jena multi N/C® 3100, selon la norme NF EN 1484. Le principe de l'analyse repose sur une combustion catalytique à haute température. Les solutions d'étalonnage, de rinçage, de contrôles de qualité, ainsi que les échantillons, sont introduits dans des flacons en verre pré-calcinés (à 500°C pendant 2 h), où ils sont acidifiés à pH=1 avec de l'acide chlorhydrique (HCl, 37% RPE).

Des blancs d'analyse (préparée à partir d'eau ultra-pure) et des solutions d'autocontrôles (0.5 et 5 mgN.L⁻¹ pour le COD ; 1 et 10 mgN.L⁻¹ pour le NTD) sont systématiquement analysés avec les échantillons. Les fonctions d'étalonnage, l'exactitude de la méthode et les limites de quantification (pour le COD : 0.2 mgC.L⁻¹ ; pour le NTD : 0.2 mgN.L⁻¹) ont été validées et déterminées en se basant sur la norme NF T90-210 (2018). La précision des analyses est systématiquement vérifiée en utilisant des étalons certifiés d'hydrogénéphthalate de potassium (5 mgC.L⁻¹, fournisseur Fluka®) et d'acide nicotinique (1 mgN.L⁻¹, fournisseur Fluka® ; 1 mgN.L⁻¹, fournisseur Fluka®) différents de ceux utilisés pour les gammes d'étalonnage. La justesse des résultats est aussi évaluée avec la participation régulière (deux essais par an sur des eaux naturelles) à des essais interlaboratoires (approche par le Z-score). Les incertitudes analytiques sont de 20% (incertitudes élargies, k=2) pour COD et NTD. Elles sont systématiquement contrôlées lors de chaque participation à des essais interlaboratoires (calcul de Zéta-score).

3.3.2 Analyse par spectrophotométrie UV-visible

L'analyse par spectrophotométrie UV-Visible a été réalisée à l'aide d'un spectrophotomètre Shimadzu (UV 1900) avec une cellule en quartz de 1 cm de trajet (Hellma Analytics®). Les spectres d'absorbance sont acquis de 200 à 800 nm avec une résolution de 1 nm et une vitesse de balayage de 0.2 s.nm⁻¹. Une

correction de la ligne de base est effectuée en retranchant à tous les spectres des échantillons celui d'un échantillon d'eau ultra-pure.

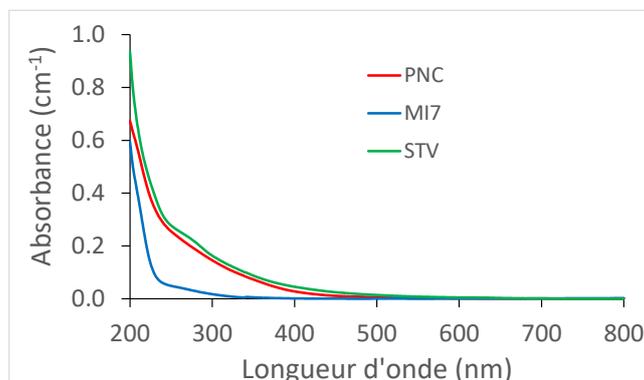


Figure 5 : Spectre d'absorbance (200-800 nm) de trois eaux prélevées sur le bassin du Ratier (PNC : source représentative d'une prairie avec bovins et fumier) et de la Claduègne (MI7 : source représentative d'une lande abandonnée ; STV : source représentative d'une station de traitement d'eaux usées).

Une série de huit indicateurs descriptifs de la nature de la MOD classiquement utilisés dans la bibliographie (Masson, 2015 ; Li et Hur, 2017) a été calculée à partir des spectres d'absorbance générés (Figure 5 ; Tableau 4). Le calcul et l'interprétation des indicateurs sont décrits dans le livrable WP3-1.

Tableau 4 : Indicateurs UV-visible calculés à partir des spectres d'absorbance (200-800 nm) permettant de décrire la nature de la matière organique dissoute présente dans les échantillons. Abs_x représente l'absorbance mesurée à la longueur d'onde x nm (d'après Boukra et al., 2023).

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

3.3.3 Mesure de distribution de taille des molécules organiques par chromatographie d'exclusion stérique (HPSEC)

La chromatographie d'exclusion stérique à haute performance (HPSEC, modèle LC-2030C 3D Plus, Shimadzu) couplée à des détecteurs à réseau de photodiodes (UV-DAD, modèle PDA Deuterium D2 Lamp) et de fluorescence (modèle RF-20Axs) a été utilisée pour déterminer la distribution de la taille moléculaire de la MOD. Le volume d'injection est de 10 µL, avec un débit de 0.8 mL.min⁻¹ de phase mobile de tampon phosphate (NaCl, 0.1 M ; KH₂PO₄, 0.002 M ; K₂HPO₄, 0.002 M). Deux colonnes (Shodex OHpak SB-803 HQ et Shodex OHpak SB-802 HQ) couplées en série sont utilisées pour la

séparation chromatographique. La première colonne couvre un domaine d'exclusion compris entre 1 kDa et 100 kDa et la seconde entre 0.2 kDa et 1 kDa. Des étalons analytiques de polystyrène sulfonate sont utilisés comme références de poids moléculaires moyens (0.246, 1.6, 4.3, 6.8, 10, 17, 32 et 77 kDa). D'autres étalons sont également utilisés pour couvrir une plus large gamme de types de molécules, tels que les nitrates (0.063 kDa), l'albumine de sérum bovin BSA (66 kDa), et les étalons d'acide polyacrylique (1 ; 2.6 et 3.6 kDa). Une courbe d'étalonnage du poids moléculaire (de 0.2 à 77 kDa) en fonction du volume d'élution est construite à l'aide de ces étalons analytiques.

En sortie de colonne, les molécules organiques sont détectées grâce à :

- Un détecteur UV qui permet l'acquisition toutes les 300 ms de spectres sur une gamme d'absorbance comprise entre 200 et 450 nm. Dans le cadre du projet Chypster, seules les longueurs d'onde 227 et 254 nm ont été exploitées, correspondant respectivement aux composés organiques plutôt hydrophiles et aux composés organiques aromatiques.

- Un détecteur de fluorescence qui permet l'acquisition toutes les 400 ms de l'intensité de fluorescence pour 3 couples de longueurs d'onde d'excitation-émission (Ex/Em). Les couples Ex/Em sélectionnés pour les analyses étaient 345/443 nm, 280/330 nm et 278/354 nm et correspondaient respectivement aux composants de la MOD de types humique, protéique et acide aminé.

Une correction de la ligne de base a été effectuée, en retranchant à tous les chromatogrammes des échantillons, les intensités mesurées dans des échantillons d'eau ultra-pure (blanc d'injection) injectés tous les 5 échantillons. Un exemple de chromatogrammes obtenus pour un échantillon de mélange sur le BV du Ratier (station du Mercier, le 14/03/2023) est illustré dans la Figure 6. Le calcul et l'interprétation des indicateurs issus des chromatogrammes HPSEC est décrit dans le livrable WP3-1.

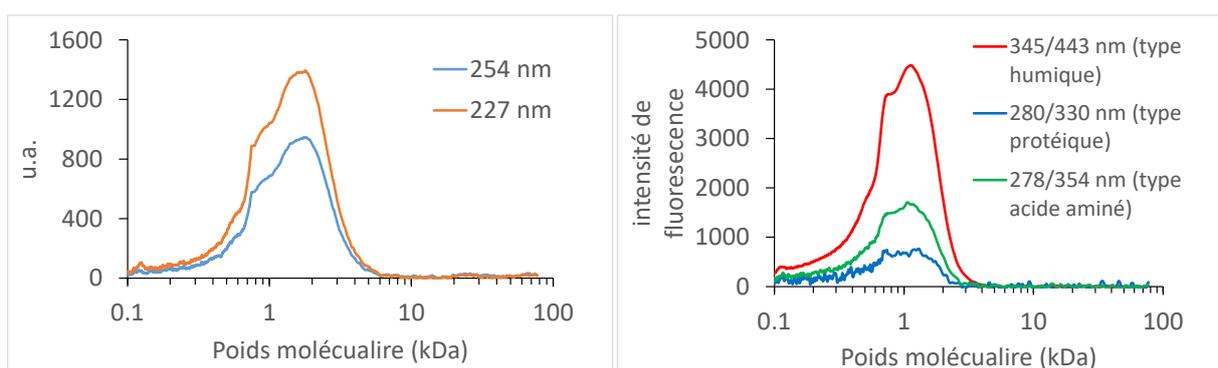


Figure 6 : Chromatogrammes HPSEC d'un échantillon de mélange prélevé le 14/03/2023 au niveau de la station du Mercier (bassin du Ratier / Yzeron) pour les détecteurs UV 227 et 254 nm, ainsi que pour les 3 détecteurs de fluorescence représentatifs des composants de la MOD de types humique, protéique et acide aminé.

3.3.4 Analyse moléculaire non ciblée de la MOD par chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse haute résolution (LC-HRMS)

3.3.4.1 Analyse par LC-HRMS

L'analyse moléculaire non ciblée de la MOD a été réalisée à l'aide d'une chaîne de chromatographie liquide ultra-haute performance ACQUITY UPLC H-Class de Waters (Milford, MA, USA) couplée à un spectromètre de masse haute résolution QToF (Xevo G2-S Q-TOF ; Waters). Les échantillons sont injectés sur une colonne de silice greffée C18, avec un mécanisme de chromatographie en phase inverse (HSS T3 C18, 10 mm x 2,1 mm, 1,8 µm, Waters). La phase mobile est composée de (A) eau ultra-pure + 0,1 % d'acide formique et (B) acétonitrile + 0,1 % d'acide formique. Les analyses sont effectuées à un débit de 0.5 mL/min à 30°C en utilisant le gradient suivant : phase mobile initiale de 2% de B pendant 2 min, suivie d'une augmentation jusqu'à 99% de B pendant 13 min et d'un maintien pendant 2 min, puis un retour à la condition initiale de 2 % de B en 2 min avec un maintien de 2 min, ce qui donne une durée totale d'acquisition de 20 min. L'ionisation est en mode positif ESI+ avec les réglages suivants : une tension capillaire de 2.3 kV, une température de la source à 150 °C, un débit de gaz de désolvatation de 700 L/h, des débits d'infusion de l'échantillon et de lockSpray de 20 µL/min. La gamme de masse d'acquisition, notée m/z (masse / charge) s'étend de 100 à 1500 Da avec une fréquence de balayage de référence de 10 secondes.

Tous les échantillons analysés lors d'une séquence analytique sont injectés (20 µL) en triplicat dans un ordre aléatoire. Différents types de contrôles qualité sont ajoutés pour suivre et corriger la dérive instrumentale le long de la séquence et pouvoir comparer les échantillons d'une séquence à l'autre. Ces contrôles qualités sont les suivants :

- QC pool (QCP) : correspond à un échantillon composite d'un volume égal de tous les échantillons (100 µL de chaque échantillon) injecté tout au long d'une séquence. Le QCP est utilisé pour corriger les dérives d'intensité au cours d'une analyse.

- Blancs d'injection : eau ultra-pure (résistivité à 18,2 MΩ.cm) injectée tout au long du batch. Les blancs d'injection ont été utilisés dans le post-traitement des données afin d'éliminer les pics dont l'intensité est proche du bruit de fond.

- Injection de traceurs deutérés : un mélange de diuron-d6 et de tebuconazole-d6 est ajouté (10 µg/L) dans chaque échantillon, blanc d'injection et QCP pour évaluer la dérive du temps de rétention (RT) pendant l'acquisition.

- QC mix : un mélange de 13 standards analytiques (aténolol, azoxystrobine, bezafibrate, céliprolol, cétrizine, époxiconazole, érythromycine, metformine, montelukast, netilmicine, ritonavir, roxythromycine, simazine, tébuconazole, telmisartan, tiapride, venlafaxine) injectés en triplicat

randomisé dans chaque séquence d'analyse, afin d'évaluer la dérive intra-séquence et inter-séquence du RT et de la masse.

3.3.4.2 Traitement des données générées

Les données brutes sont préalablement converties au format mzXML avec le logiciel MSConvert de Proteowizard. Les paramètres de conversion sont les suivants : peakPicking cwt snr = 0.1, peakSpace = 0.1 et msLevel = 1. Cette étape permet de transformer les données profiles en format centroïde. Les données générées sont ensuite traitées à l'aide de la plateforme Workflow4Metabolomics (W4M ; package xcms ; Giacomoni et al., 2015 ;

Tableau 5). Une fois les données converties et chargées sur la plateforme W4M, un workflow automatisé (Boukra, 2023) est appliqué pour produire la liste des *features* (couple m/z et temps de rétention). Pour chaque *feature*, les intensités mesurées pour chaque injection sont corrigées de la dérive instrumentale le long de la séquence analytique (dérive intra-séquence).

Tableau 5 : Description des étapes de traitement des données sous Workflow4Metabolomics pour arriver à une liste de features dont les intensités mesurées pour chaque injection sont corrigées de la dérive intra-séquence (d'après Boukra, 2023).

Description des étapes	Fonction utilisée (package)	Paramètres utilisés
Lecture des données et génération d'un objet MSnExp	readMSData (Msnbase)	-
Détection et extraction des ions pour chaque échantillon	xcmsSet (xcms)	method = CentWave Max tolerated ppm m/z deviation in consecutive scans in ppm = 8.0 Min,Max peak width in seconds = 5,20 Signal to Noise ratio cutoff = 3 Minimum difference in m/z for peaks with overlapping retention times = -0.001
Fusion des données générées dans un même fichier	findChromPeaks (xcms)	-
Regroupement des pics chromatographiques dans et entre les échantillons	groupChromPeaks (xcms)	Method = PeakGroups Minimum required fraction of samples in which peaks for the peak group were identified = 0.01 Maximal number of additional peaks for all samples to be assigned to a peak group for retention time correction = 1 Smooth method = loess
Ajustement des temps de rétention des groupes d'ions	adjustRtime (xcms)	Method = PeakGroups Minimum required fraction of samples in which peaks for the peak group were identified = 0.01 Maximal number of additional peaks for all samples to be assigned to a peak group for retention time correction = 1 Smooth method = loess
Nouveau regroupement des pics chromatographiques	groupChromPeaks (xcms)	identique à la première étape de regroupement mais avec Bandwidth = 5.0
Ajout d'un signal pour les features non détecté d'un échantillon	fillChromPeaks (xcms)	-
Correction de la dérive intra-séquence en intensité	Batch_correction	Type of regression = loess Span = 0.7
Recherche et annotation des isotopes et adduits	CAMERA.annotate	General ppm error = 5 General absolut error in m/z = 0.005 Max. ion charge = 4 Max. number of expected isotopes = 6 The percentage number of samples, which must satisfy the C12/C13 rule for isotope annotation = 0.5 ruleset : default or personal

Une fois la liste de *features* éditée, les intensités des adduits et des isotopes (détectés par l'outil CAMERA) correspondant au même composé sont sommées pour ne faire apparaitre que le composé neutre principal caractérisé par une masse, un temps de rétention et une intensité mesurée (Boukra, 2023). Les *features* sans adduit ni isotope sont considérés comme la forme protonée du composé (forme $[M+H]^+$) ; la masse du composé neutre est aussi calculée et retenue.

Une dernière étape de retraitement consiste à éliminer les composés dont les intensités sont peu robustes, i.e. intensité proche des blancs d'injection ou dont les intensités des QCP (théoriquement stable après correction de la dérive analytique) ou les triplicats d'injection sont trop variables. Ainsi, les composés qui ne respectent pas les conditions suivantes sont éliminés :

- Intensités des échantillons tous inférieurs au seuil défini par la moyenne plus 3 fois l'écart-type des intensités des blancs d'injection. Cette étape permet d'éliminer les composés de même intensité que les blancs d'injection, i.e. composés très peu intenses, ou composés dont les blancs sont contaminés.

- Ecart types relatifs dans les QCP supérieur à 30%. Cette étape permet d'éliminer les composés dont les intensités ont été mal corrigées de la dérive analytique ou les composés dont les intensités varient aléatoirement.

- Ecart types relatifs de l'ensemble des écart type relatifs calculés dans les triplicats d'injection des échantillons supérieurs à 30%. Cette étape permet d'éliminer les composés dont les intensités dans les triplicats d'analyse ne sont pas stables (par exemple due à des effets mémoire, une instabilité dans la source ou à un mauvais regroupement de pics chromatographiques).

Au final, les intensités mesurées pour chaque composé dans le triplicat d'échantillon sont moyennées. Le résultat final est un tableau où les intensités moyennées de chaque échantillon (une colonne par échantillon) sont données pour chaque composé détecté et retenu après les différentes étapes de traitement (une ligne par composé). Chaque composé est caractérisé par une masse et un temps de rétention donnant une indication sur le caractère polaire (TR les plus faibles) ou apolaire (TR les plus élevés) du composé.

3.4 Mesure des rapports isotopiques de l'eau

3.4.1 Echantillons du Ratier / Yzeron : analyse isotopique par spectroscopie d'absorption

Les analyses des rapports isotopiques de l'eau ($\delta^{18}\text{O}$ et $\delta^2\text{H}$) ont été effectuées à l'Institut des Sciences Analytiques (ISA) de Villeurbanne par spectroscopie de sortie de cavité intégrée hors axe (*Off-Axis Integrated Cavity Output Spectrometer*, OA-ICOS) avec un appareil IWA-45EP (Los Gatos Research, Mountain View, California) (Fourel et al., 2020). Les prélèvements injectés sont compris entre 1.0 et 1.2 μg et sont injectés dans le système via l'injecteur liquide. En début de série, une substance de référence est passée plusieurs fois afin de vérifier le bon conditionnement de l'appareil. Les valeurs $\delta^{18}\text{O}(w)$ et $\delta^2\text{H}(w)$ sont rapportées à l'échantillon d'eau standard "4C" de Los Gatos Research ($\delta^{18}\text{O}(w) = -7.94 \text{ ‰}$; $\delta^2\text{H}(w) = -51.6 \text{ ‰}$) et "3C" ($\delta^{18}\text{O}(w) = -13.39 \text{ ‰}$; $\delta^2\text{H}(w) = -97.3 \text{ ‰}$) qui sont préalablement calibrés avec une eau standard internationale - VSMOW2 de l'AIEA ($\delta^{18}\text{O}(w) = 0 \text{ ‰}$; $\delta^2\text{H}(w) = 0 \text{ ‰}$).

Chaque échantillon est passé entre 4 et 6 fois. Les deux premières injections pour les échantillons et les références ne sont pas considérées pour éviter les erreurs liées aux effets mémoires. La moyenne des écarts entre les rapports mesurés et la théorie peut être calculée et appliquée comme correction aux échantillons. Les écarts tolérés doivent être inférieurs ou égaux à 10‰ pour le $\delta D(w)$ et 5 ‰ pour le $\delta^{18}O(w)$.

3.4.2 Echantillons de la Claduègne : analyse des ratios isotopiques par spectroscopie à balayage en longueur d'onde

Les analyses des rapports isotopiques de l'eau ($\delta^{18}O$ et δ^2H) ont été effectuées à l'IGE sur le plateau PANDA par spectroscopie balayage en longueur d'onde WS-CRDS (*wavelength-scanned cavity ring-down spectroscopy*) avec un analyseur PICARRO L2120. Avant analyse (maximum 72 h), les échantillons sont transférés dans des vials de 2 mL en verre avec un septum PTFE et stockés à 4°C avant transfert dans l'échantillonneur automatique. Des standards ont été analysés au début et à la fin de chaque séquence, ainsi qu'après chacun des échantillons. Deux solutions standards « interne » ont été analysées : MQ-01 et EGRIP-01. MQ-01 a été obtenu avec de l'eau du robinet de Grenoble, et EGRIP-01 est de la glace fondue du forage EGRIP-01 sur la carotte glacière du Groenland. Les standards ont été stockés dans des containers de 10 L en HDPE et analysés au Laboratoire des Sciences du Climat et de l'Environnement (LSCE) à l'Université Paris Saclay par un spectromètre de masse Finnigan MAT252. Chaque échantillon a été injecté 6 fois en mode haute résolution (9.5 min par injection, et seules les dernières 4 min sont gardées pour la mesure). Pour éviter les effets mémoire, seuls les rapports isotopiques des 3 dernières injections sont utilisés et moyennés.

3.5 Analyse des micropolluants organiques

3.5.1 Analyse des micropolluants organiques dans les laboratoires de RiverLy

Les analyses ciblées des micropolluants organiques dans tous les échantillons d'eau collectés sont réalisées dans les laboratoires de RiverLy sur les échantillons préalablement filtrés et congelés. Les échantillons sont décongelés à température ambiante. Deux méthodes d'extraction sur phase solide (SPE) sont mises en œuvre pour le dosage de 82 contaminants de type pharmaceutiques (n=43) et pesticides (n=39) (Tableau 6).

Tableau 6 : Détails des étapes pour l'extraction des contaminants organiques de type pharmaceutiques et pesticides dans les échantillons d'eaux de surface. ⁽¹⁾ dans certains cas les 250 mL ne sont pas atteints.

Étapes de l'extraction SPE	Pharmaceutiques	Pesticides
Volume d'échantillon extrait	250 mL ⁽¹⁾	250 mL ⁽¹⁾
Pré-traitement	Acidification à pH 5 à l'aide d'acide formique	-
Cartouche SPE	OASIS HLB 6cc 500mg (Waters)	OASIS HLB 3cc 60mg (Waters)
Solvant d'éluion	Méthanol	Acétonitrile
Evaporation	A sec sous azote à 30°C	A sec sous azote à 30°C
Volume de reprise avant analyse	0,5mL (eau/acétonitrile, 95/5, v/v)	0,25 mL (eau/acétonitrile, 95/5, v/v)
Etalon interne d'injection	Diuron D6 à 1µg/L	Diuron D6 à 1µg/L

Les micropolluants organiques sont analysés par chromatographie liquide ultra haute performante (UHPLC Acquity® H-CLASS, Waters®) couplée à un spectromètre de masse en tandem (Xevo TQ-XS, Waters®). La séparation des composés est réalisée sur une colonne de type C18, HSS T3 (100 x 2.1 mm / 1.8 µm, Waters®). La colonne est chauffée à 30°C avec un débit stable de 0.5 mL/min. Les éluants utilisés sont de l'eau MilliQ LC-Pack acidifiée à 0.1% en acide formique et de l'acétonitrile acidifié à 0.1% en acide formique. Le volume d'injection est fixé à 10 µL. Le gradient d'éluion passe de 2% d'acétonitrile à 99% en 18 min. Un plateau à 99% d'acétonitrile est maintenu pendant 1 min, puis le gradient redescend à 2% d'acétonitrile jusqu'à 23 min pour permettre un rééquilibrage de la colonne avant l'injection suivante.

La détection des composés d'intérêt se fait à l'aide d'un spectromètre de masse en tandem. Les paramètres de chaque analyte sont optimisés au préalable (source d'ionisation, ionisation positive ou négative, cône voltage, énergie de collision) pour obtenir dans l'idéal deux transitions (ion parent/ion fils). La quantification de chaque composé se fait grâce à la transition la plus intense ; la deuxième transition servant à confirmer la présence du composé (rapport d'intensité entre les 2 transitions). Deux méthodes de détection sont utilisées : les composés pharmaceutiques sont analysés à l'aide d'une source ESI de type Z-spray (Waters), et les pesticides sont analysés à l'aide d'une source ESI de type Unispray (Waters).

L'identification et la confirmation de chaque analyte sont réalisées en se basant sur le temps de rétention et en comparant les rapports d'intensité des transitions MRM entre les échantillons et ceux des étalons présents dans la même série d'analyse. La quantification est réalisée à l'aide d'un étalonnage externe pouvant aller de 0.05 à 50 µg/L en fonction des composés. Des contrôles qualité sont ajoutés tout le long de la série d'analyse et injectés tous les 10 échantillons pour vérifier les variations instrumentales. Des blancs analytiques sont aussi ajoutés tout le long de la série d'analyse. A chaque série d'extraction, un blanc de procédure et un échantillon dopé (dopage avec les composés recherchés) sont réalisés à l'aide d'eau d'Evian. La valeur du blanc de procédure est systématiquement

soustraite des échantillons correspondants. Ceci est généralement le cas pour la caféine et l'acide fénofibrique. De plus, lorsqu'un blanc terrain est disponible pour la série d'échantillons analysés, les éventuelles valeurs de contamination sont soustraites aux échantillons. L'échantillon dopé permet de vérifier le bon déroulement du traitement de l'échantillon, et le pourcentage de recouvrement calculé permet la correction des résultats des échantillons. Des traceurs deutérés ajoutés à chaque échantillon avant extraction permettent également de corriger les résultats rendus. L'étalon interne d'injection ajouté à la même concentration dans chaque échantillon (avant injection), blanc, gamme d'étalonnage et contrôle qualité, permet de vérifier la stabilité du système tout le long de la série analytique.

Des tests de dilution (par 10) sont aussi réalisés sur les échantillons afin de vérifier l'absence d'effets matrices éventuels. Les LQ ont été tout d'abord estimées en fonction du premier point de gamme confirmé et du rendement d'extraction dans de l'eau dopée. Puis, elles ont été vérifiées avec un triplicat d'extraction d'eau dopée à cette LQ. Les LQ sont comprises entre 0.05 et 0.5 ng/L pour les antibiotiques, entre 0.05 et 35 ng/L pour les pharmaceutiques et cosmétiques, et entre 0.1 et 30 ng/L pour les pesticides (Tableau 7).

Pour le cas particulier de l'analyse des micropolluants organiques dans les échantillonneurs intégratifs passifs de type POCIS, le protocole suivant a été mis en œuvre (Mathon et al., 2022). Les POCIS ont tout d'abord été démontés sous hotte à flux laminaire. Les phases HLB sont récupérées en rinçant les membranes avec 10 mL d'eau dans des cartouches en verre placées sur un manifold. Les phases HLB sont ensuite éluées avec 10 mL de méthanol, puis 10 mL d'un mélange 50/50 (v/v) de méthanol et dichlorométhane, et enfin 10 mL de dichlorométhane. Les éluats sont évaporés à sec sous azote puis repris avec 500 µL d'un mélange 95/5 (v/v) eau/acétonitrile.

Tableau 7 : Liste des micropolluants organiques analysés dans les laboratoires de RiverLy avec les méthodes « type « pharmaceutique » (en noir) et « type pesticide » (en bleu) avec les limites de quantification (LQ en ng/L) et la famille des composés. PT : produit de transformation.

Micropolluants organiques	LQ (ng/L)	Famille	Micropolluants organiques	LQ (ng/L)	Famille
Acébutolol	0.07	Bétabloquant	Sulfaméthoxazole	0.17	Antibiotique
Acétylsulfaméthoxazole	0.26	PT	Théophylline	0.26	Bronchodilatateur
Acide fénofibrique	0.12	Hypolemiant	Triméthoprime	0.06	Antibiotique
Acide Niflumique	0.12	Anti-inflammatoire	Venlafaxine	2.49	Antidépresseur
Alprazolam	0.14	Benzodiazepine	Aclonifène	12.3	Herbicide
Amisulpride	0.08	Neuroleptique	Acétochlore	0.67	Herbicide
Amitriptyline	1.16	Antidépresseur	Atrazine	0.02	Herbicide
Aténolol	0.14	Bétabloquant	Azoxystrobine	0.03	Fongicide
Bezafibrate	0.11	Hypolemiant	Boscalide	0.07	Fongicide
Caféine	0.57	Stimulant	Carbendazime	0.13	Fongicide
Carbamazépine	0.12	Anti-épileptique	Chlorfenvinphos	0.05	Insecticide
Carbamazépine-10,11-époxyde	0.06	PT	Chlortoluron	0.01	Herbicide
Céliprolol	0.07	Bétabloquant	Dichloroaniline	0.07	PT
Clarithromycine	0.25	Antibiotique	N-(3,4-dichlorophényl)-N-méthyl-urée	0.13	PT
Clindamycine	0.28	Antibiotique	Diflufénican	0.33	Herbicide
Cyclophosphamide	0.12	Anticancéreux	Difénoconazole	0.15	Fongicide
Diazepam	0.09	Benzodiazepine	Diuron	0.11	Herbicide
Diclofénac	0.26	Anti-inflammatoire	Dimétomorphe	0.15	Fongicide
Diméthoate	0.84	Pesticides	Fludioxonil	0.4	Fongicide
Erythromycine	0.47	Antibiotique	Fénoxycarbe	0.31	Insecticide
Fénofibrate	1.35	Hypolemiant	Fluaziname	7.73	Fongicide
Flécaïnide	0.39	Anti arythmique	Flumioxazine	1.22	Herbicide
Fluoxétine	3.33	Antidépresseur	Flurtamone	0.03	Herbicide
Furosémide	1.01	Diuretique	Imidaclopride	0.05	Insecticide
Gemfibrozil	0.57	Hypolemiant	Isoproturon	0.04	Herbicide
Irbesartan	0.08	Antihypertenseur	Isoproturon Desméthyl	0.01	PT
Kétoprofène	0.11	Anti-inflammatoire	Isoxabène	0.03	Herbicide
Lamotrigine	0.18	Anti-épileptique	Linuron	0.1	Herbicide
Metformine	37.3	Antidiabétique	Mécoprop	4.88	Herbicide
Métoprolol	0.1	Bétabloquant	Métolachlore	0.13	Herbicide
Métronidazole	0.08	Antibiotique	Métamitron	0.05	Herbicide
Naproxène	1.34	Anti-inflammatoire	Métamitron-désamino	0.03	PT
Nordiazépam	0.13	Benzodiazepine	Métazachlore	0.06	Herbicide
Norfloxacine	0.83	Antibiotique	Napropamide	0.02	Herbicide
Ofloxacine	0.8	Antibiotique	Norflurazon	0.03	Herbicide
Oxazepam	0.11	Benzodiazepine	Norflurazon Desméthyl	0.03	PT
Paracétamol	0.59	Antalgique	Oryzalin	15.9	Herbicide
Pirimicarbe	0.06	Pesticides	Procymidone	31.3	Fongicide
Propranolol	0.06	Bétabloquant	Propyzamide	0.2	Herbicide
Salbutamol	0.15	Bronchodilatateur	Simazine	0.08	Herbicide
Sotalol	0.07	Bétabloquant	Spiroxamine	0.09	Fongicide

3.5.2 Analyse des micropolluants organiques dans les laboratoires de l'IGE

Les analyses ciblées des micropolluants organiques (Tableau 8) dans tous les échantillons d'eau collectés sont réalisées dans les laboratoires de l'IGE sur les échantillons préalablement filtrés et congelés. Les échantillons sont décongelés à température ambiante et à l'abri de la lumière.

Tous les échantillons, y compris les blancs de procédure, les blancs de terrain et les échantillons duplicats, sont dopés avec 12.5 µL d'un mélange de 30 étalons internes à 1 mg.L⁻¹. Les échantillons sont ensuite concentrés sur des cartouches OASIS HLB préalablement conditionnées (6 cc, 200 mg, 30 µm, Waters). Les cartouches sont séchées sous vide et éluées avec 6 mL de méthanol puis 6 mL d'acétonitrile. Les extraits sont recueillis dans des tubes en verre et concentrés doucement, sous un

léger flux d'azote et à 32°C, jusqu'à environ 125 µL. Les extraits sont alors reconstitués en ajoutant 350 µL d'eau pure puis mélangés en utilisant un vortex pendant 30 secondes. Les échantillons sont ensuite transférés dans des vials HPLC, un étalon interne analytique est ajouté et les échantillons sont alors prêts pour l'analyse.

Les contaminants d'intérêt sont analysés par chromatographie liquide ultra performante (UHPLC, Exion) couplée à un spectromètre de masse en tandem (QTrap 5500 Sciex). La séparation des composés ciblés est réalisée sur une colonne Kinetic® Biphenyl (100 x 2,1 mm i.d., 2,6 µm, Phenomenex®). La colonne est chauffée à 40°C avec un débit stable de 0.6 mL/min. Deux méthodes analytiques sont utilisées pour cibler 120 molécules (dont des produits pharmaceutiques, des pesticides, des produits de soins personnels, des retardateurs de flamme organophosphoré, des substance per- et polyfluoroalkyles, des plastifiants ; Tableau 8)).

Pour la méthode 1, les phases mobiles utilisées sont de l'eau ultra-pure acidifiée à 0.1% en acide formique (phase A) et du méthanol acidifié à 0.1% en acide formique (phase B). Le gradient a été appliqué comme suit : 0-1 min : 10% B ; 1-13 min : augmentation à 100% B et maintien pendant 2.5 min ; à 15.51 min diminution à 10% B et maintien pendant 3 min (équilibre) avant l'injection suivante. La durée totale de l'essai est de 18.5 minutes. Le volume d'injection a été fixé à 5 µL. Les paramètres de la source d'ions ont été optimisés pour obtenir les conditions finales suivantes : tension de pulvérisation d'ions (IS) : +5000 V et -5000 V ; température (TEM) 550°C ; gaz de rideau (CUR) 35 L.min⁻¹ ; gaz de source d'ions (GS1 et GS2) à 70 psi.

Pour la méthode 2, les phases mobiles utilisées sont 90% eau ultra-pure / 10% méthanol avec 5 mM d'acétate d'ammonium (phase A) et 10% eau ultra-pure / 90% méthanol avec 5 mM d'acétate d'ammonium (phase B). Le gradient a été appliqué comme suit : 0-5 min : 10% B ; 0.5-11 min : augmentation à 100% B et maintien pendant 2.5 min ; à 13.5 min diminution à 10% B et maintien pendant 3 min (équilibre) avant l'injection suivante. La durée totale de l'essai est de 16.5 minutes. Le volume d'injection a été fixé à 5 µL. Les paramètres de la source d'ions ont été optimisés pour obtenir les conditions finales suivantes : tension de pulvérisation d'ions (IS) : +5000 V et -5000 V ; température (TEM) 550°C ; gaz de rideau (CUR) 35 L.min⁻¹ ; gaz de source d'ions (GS1 et GS2) à 70 psi. Des blancs analytiques, des blancs de procédure et des blancs de terrain sont systématiquement inclus dans chaque série d'échantillons afin d'évaluer les contaminations potentielles des composés ciblés au cours de l'échantillonnage, de la préparation et de l'analyse des échantillons. Lorsque les blancs de terrain présentent des valeurs supérieures à la MLOQ, ces valeurs sont systématiquement soustraites aux échantillons correspondants.

Tableau 8 : Liste des micropolluants organiques analysés dans les laboratoires de l'IGE avec les limite de quantification (LQ).

Micropolluants organiques	LQ (ng/L)	Famille	Micropolluants organiques	LQ (ng/L)	Famille	Micropolluants organiques	LQ (ng/L)	Famille
2-hydroxy-3-phenylpyrazine	0.25	Métabolite de l'amoxicilline	Isoprothiolane	0.1	Fongicide	Naproxen	5.0	Anti-inflammatoire
Clarithromycin	0.1	Antibiotique	Metalaxyl	0.1	Fongicide	Panthenol	0.5	Produits de soins personnels
Clindamycin	0.05	Antibiotique	Metolachlor	0.1	Herbicide	Triclosan	1.0	Antimicrobien
Clindamycin 2-phosphate	0.1	Antibiotique	Pretilachlor	0.05	Herbicide	Chloramphenicol	0.1	Antibiotique
Erythromycin	0.25	Antibiotique	Promecarb	0.05	Insecticide	Florfenicol	0.1	Antibiotique
Metronidazole	0.15	Antibiotique	Propiconazole	0.25	Fongicide	Methyl-paraben	1.0	Antimicrobien
Metronidazole-OH	0.5	Antibiotique	Siduron	0.1	Herbicide	Ethyl-Paraben	0.25	Antimicrobien
Sulfamethoxazole	0.1	Antibiotique	Terbutryn	0.1	Herbicide	Propyl-Paraben	0.25	Antimicrobien
Acetyl sulfamethoxazole	0.25	Antibiotique	Thiabendazole	0.05	Fongicide	Butyl-Paraben	0.25	Antimicrobien
Trimethoprim	0.05	Antibiotique	Tricyclazole	0.05	Fongicide	Sulisobenzone	5.0	Produits de soins personnels
Acetaminophen	0.25	Analgésique et antipyrétique	Ametryn	0.05	Herbicide	2.4 D	0.25	Herbicide
Atenolol	0.25	β-bloquant	Simazine	0.1	Herbicide	Fipronil	0.05	Insecticide
Bisoprolol	0.05	β-bloquant	Prometryn	0.05	Herbicide	Thiocarbazono-methyl	1.0	Métabolite d'herbicides
Caffeine	0.25	Produits de soins personnels / Stimulant	Prometon	0.05	Herbicide	3-Phenoxybenzoic acid (3PBA)	10	Métabolite de la perméthrine
Carbamazepine	0.05	Produits de soins personnels / Stimulant	Propazine	0.1	Herbicide	Bisphenol A	5.0	Plastifiant
Cetirizine (hydrochloride)	0.05	Antihelminthique	2-Me-S-BTH	5.0	Benzothiazole (chimie industrielle)	Bisphenol F	5.0	Plastifiant
DEET (N,N-diethyl-m-toluamide)	0.1	Insecticide	2-NH2-BTH	0.25	Benzothiazole (chimie industrielle)	Bisphenol S	0.05	Plastifiant
Fenbendazole	1.52	Antihelminthique	4-Me-BTR	0.25	Benzothiazole (chimie industrielle)	Bisphenol B	1.0	Plastifiant
Fluoxetine	0.05	Antidépresseur	5,6-diMe-BTR	0.1	Benzothiazole (chimie industrielle)	DEHPA	0.05	Plastifiant
Guanylurea	0.25	Produit pharmaceutique	5-Cl-BTR	5.0	Benzothiazole (chimie industrielle)	Dibutyl Phosphate	0.1	Retardateurs de flamme organophosphoré
Iopromide	5.0	Agent de contraste radiographique	5-Me-BTR	0.25	Benzothiazole (chimie industrielle)	BTH-OH	10	Benzothiazole (chimie industrielle)
Irbesartan	0.1	β-bloquant	H-BTR	5.0	Benzothiazole (chimie industrielle)	BTSA	0.25	Additif pour pneus
Levamisole	0.05	Antihelminthique	6-ppd quinone	0.1	Additif pour pneus	PFPa	0.25	Substance per- et polyfluoroalkyles
Lidocaine	0.05	Antiarythmique	DPG	0.25	Additif pour pneus	PFBS	0.04	Substance per- et polyfluoroalkyles
Mebendazole	0.22	Antihelminthique	HMMM	0.1	Additif pour pneus	PFHxA	0.25	Substance per- et polyfluoroalkyles
Metformin	0.25	Médicament antidiabétique	Triisopropanolamine	0.5	Plastifiant	PFHpA	0.25	Substance per- et polyfluoroalkyles
Nicotinamide	0.5	Vitamine B3	ATBC	0.5	Plastifiant	PFPeS	0.05	Substance per- et polyfluoroalkyles
Nicotine	2.94	Produits de soins personnels / Stimulant	DMP	1.63	Plastifiant	L-PFHxS	0.04	Substance per- et polyfluoroalkyles
Oxfendazole	0.59	Aantinématodique	TBEP	1.71	Retardateurs de flamme organophosphoré	br-PFHxS	0.04	Substance per- et polyfluoroalkyles
Paraxanthine	5.0	Métabolite de la caféine	TBP	1.55	Retardateurs de flamme organophosphoré	PFHpS	0.05	Substance per- et polyfluoroalkyles
Telmisartan	0.1	β-bloquant	TCEP	1.31	Retardateurs de flamme organophosphoré	PFOA	0.1	Substance per- et polyfluoroalkyles
Valsartan	0.1	β-bloquant	TCP	0.05	Retardateurs de flamme organophosphoré	PFNA	0.1	Substance per- et polyfluoroalkyles
Acetochlor	5.0	Herbicide	TCPP	10	Retardateurs de flamme organophosphoré	L-PFOS	0.07	Substance per- et polyfluoroalkyles
Atrazine	0.1	Herbicide	TDCPP	5.0	Retardateurs de flamme organophosphoré	br-PFOS	0.2	Substance per- et polyfluoroalkyles
Azoxystrobin	0.05	Fongicide	TEHPA	0.25	Retardateurs de flamme organophosphoré	PFNS	0.05	Substance per- et polyfluoroalkyles
Butachlor	1.0	Herbicide	TPP	0.5	Retardateurs de flamme organophosphoré	PFDS	0.05	Substance per- et polyfluoroalkyles
Carbendazim	0.81	Fongicide	Salicylic acid	5.0	Agent anti-infectieux	PFDA	0.1	Substance per- et polyfluoroalkyles
Dichlorvos	0.25	Insecticide	Acesulfame	0.25	Produits de soins personnels	PFUnA	0.1	Substance per- et polyfluoroalkyles
Diclofenac	0.25	Anti-inflammatoire	Daidzein	0.25	Phytoestrogène	42FTS	0.05	Substance per- et polyfluoroalkyles
Difenoconazole	0.05	Fongicide	Furosemide	5.0	Diurétique	62FTS	0.05	Substance per- et polyfluoroalkyles
Diuron	0.25	Herbicide	Fluconazole	0.1	Antimicrobien	82FTS	0.05	Substance per- et polyfluoroalkyles
Fenitrothion	1.0	Insecticide	Gemfibrozil	0.5	Régulateur lipidique	FOSA	0.1	Substance per- et polyfluoroalkyles
Fenobucarb	0.25	Insecticide	Ibuprofen	5.0	Anti-inflammatoire	N-MeFOSAA	0.1	Substance per- et polyfluoroalkyles
Hexaconazole	0.1	Fongicide	Ketoprofen	5.0	Anti-inflammatoire	N-EtFOSAA	0.05	Substance per- et polyfluoroalkyles
Imidacloprid	0.1	Insecticide	Losartan	0.1	β-bloquant			

La détection des composés d'intérêt se fait à l'aide d'un spectromètre de masse en tandem. Les paramètres de détection de chaque analyte sont optimisés au préalable (paramètre de source d'ionisation, polarité d'ionisation, cône voltage, énergie de collision, etc.) pour définir deux transitions (ion parent/ion fils). L'identification de chaque analyte est réalisée en se basant sur le temps de rétention (tolérance $\pm 2\%$) et le rapport d'intensité entre les 2 transitions ($\pm 20\%$), entre les échantillons et ceux des étalons présents dans la même série d'analyse. La quantification est ensuite réalisée sur la transition qui présente le ratio signal/bruit (S/N) le plus important. La quantification est effectuée à l'aide d'une gamme d'étalonnage pouvant aller de 0.05 à 100 $\mu\text{g/L}$ en fonction des composés. Les courbes d'étalonnage pour chaque analyte couvrent pour chaque composé au moins 6 concentrations et comprennent les concentrations suivantes : 0, 0.05, 0.1, 0.25, 0.5, 1, 2.5, 5, 10, 25, 50 et 100 $\mu\text{g/L}$. La courbe de calibration est injectée au moins deux fois dans chaque série d'analyse d'échantillons et des contrôles qualité sont également ajoutés à la série d'analyse et injectés tous les 15 échantillons pour vérifier les variations instrumentales.

La méthode analytique a été validée et plusieurs paramètres ont été évalués tel que le rendement d'extraction, la linéarité, la limite de quantification, ainsi que les précisions intra-journalière et inter-journalière. La LQ de la méthode a été déterminée pour chaque analyte comme étant la concentration en analyte de l'étalon ayant la concentration la plus faible et produisant un signal 10 fois supérieur au bruit de fond des chromatogrammes et en prenant en compte les rendements d'extraction. Les LQ de la méthode sont ensuite confirmées avec un triplicat d'extraction d'eau dopée à cette LQ. Les LQ sont comprises entre 0.1 et 10 ng/L pour les antibiotiques, entre 0.1 et 5 ng/L pour les pharmaceutiques et les cosmétiques, entre 0.1 et 5 ng/L pour les pesticides, entre 0.1 et 5 ng/L pour les plastifiants et autres produits industriels et entre 0.1 et 0.40 ng/L pour les PFAS (Tableau 8).

3.5.3 Analyse suspectée dans les laboratoires de l'IGE

L'extraction est réalisée en suivant le même protocole d'extraction que pour les analyses ciblées. La séparation chromatographique a été réalisée à l'aide d'un système HPLC Dionex UltiMate 3000 (ThermoScientific, Bremen, Allemagne). La séparation des composés est réalisée sur une colonne Kinetic® Biphenyl (100 x 2,1 mm i.d., 2,6 μm , Phenomenex®). La colonne est chauffée à 40°C avec un débit stable de 0.5 ml/min. La phase mobile était composée de l'éluant A : eau ultra-pure + 0,1 % d'acide formique ; et de l'éluant B : méthanol + 0,1 % d'acide formique pour l'analyse en mode positif. La phase mobile était composée de l'éluant A : eau ultra-pure + 5 mM acétate d'ammonium ; et de l'éluant B : méthanol + 5 mM acétate d'ammonium pour l'analyse en mode d'ionisation négative. Une méthode d'élution en gradient a été employée à un débit de 0.5 mL/min. Le volume d'injection a été fixé à 10 μL . La détection a été effectuée sur un spectromètre de masse Orbitrap (QExactive).

Le balayage complet des spectres HRMS (m/z 80-1000) avec une résolution de 70 000 a été suivi de cinq balayages MS2 (count loop) des ions les plus intenses avec une résolution de 35 500 pour chaque balayage. Les paramètres de mesure sont donnés dans le

Tableau 9.

Tableau 9 : Paramètres appliqués pour l'analyse non ciblée par spectrométrie de masse haute-résolution.

Paramètres	Mode d'ionisation Positive	Mode d'ionisation Negative
Durée analyse	28 min	27 min
Full MS		
Resolution	70 000	70 000
Scan Range	80 – 1000 m/z	80 – 1000 m/z
dd-MS2	Discovery	Discovery
Resolution	35 0000	35 0000
Maximum IT	100 ms	100 ms
Isolation Window	0.5 m/z	0.5 m/z
NCE	10, 30, 60	10, 30, 60
Minimum AGC Target	2.00 ^{e3}	2.00 ^{e3}
Dynamic Exclusion	3.0 sec	3.0 sec

L'extraction des données non ciblées est réalisée avec Compound Discoverer pour les données obtenues en mode d'ionisation positif et négatif, respectivement. Un workflow est défini et appliqué pour chaque jeu de données. En bref, les pics sont détectés et les temps de rétention alignés à travers les différents fichiers obtenus. Si plusieurs adduits sont identifiés, ils sont regroupés pour ne former plus qu'un seul "composé", les pics sont ensuite sélectionnés s'ils présentent un rapport d'intensité échantillon/blanc procédure (échantillon sans analytes - eau MilliQ), soumis à la totalité du mode opératoire analytique (y compris le dopage étalon interne, l'extraction et l'identification) supérieur ou égal à 10, la composition élémentaire des composés est ensuite prédite et les MS1 sont automatiquement recherchés dans Chemspider et les MS2 dans mzCloud, respectivement.

3.6 Analyse des paramètres microbiens

3.6.1 Analyses microbiennes au LEM

3.6.1.1 Bactéries indicatrices de contaminations fécales

Les indicateurs fécaux classiques ont été recherchés en utilisant la méthode normalisée IDEXX¹. Cette méthode utilise l'approche du nombre le plus probable. Les indicateurs fécaux recherchés sont les suivants : les entérocoques, les coliformes totaux et *Escherichia coli*. Les résultats sont donnés sous la forme de nombre le plus probable / 100 mL (NPP / 100 mL). Les analyses ont été effectuées sur 10 mL, 1 mL ou 100 µL d'échantillon d'eau.

¹ <https://www.idexx.fr/fr/>

3.6.1.2 Bactéries hétérotrophes totales

Les bactéries hétérotrophes ont été recherchées par méthode culturale sur milieu TSA dilué au 1/10 par ensemencement de 100 µL d'échantillon dilué au 1/100 et au 1/1000. Chaque ensemencement est réalisé en triplicat. Les résultats sont donnés sous forme d'unités formant colonies / 100 mL (CFU / 100 mL).

3.6.1.3 Approches diagnostics ADN

Les échantillons ont été décongelés et l'ADN a été extrait à l'aide du kit Qiagen DNA easy Tissue Kit en suivant les instructions du fabricant pour les eaux. Un volume de 100 µL est élué pour les eaux et la concentration en ADN est mesurée au Nanodrop.

(i) qPCR de bactéries pathogènes ou indicatrices d'origine d'une contamination fécale

Les quantités de bactéries totales (ADNr 16S) et de *Bacteroidales* totales ont été suivies par qPCR. Les marqueurs ADN bactériens indicateurs de contaminations fécales dues à l'Homme, aux ruminants, vaches, porcs, chevaux, chien, rat, poulet/canard et à des bactéries résidentes de tuyaux d'égout ont également été suivis. De même, les pathogènes *P. aeruginosa* et *A. caviae* ont été suivis par criblage des gènes *ecfX* et *tpm* respectivement. Les intégrons de classe 1, 2 et 3 ont été suivis afin de quantifier les déterminants génétiques associés à la résistance aux antibiotiques. Les amorces et les sondes utilisées sont répertoriées dans le Tableau 10. Le mix Biorad (SsoAdvanced Univ SYBR Grn Suprmix ou SsoAdvanced Univ Probes Supermix) a été utilisé, les concentrations en amorces et en sonde sont indiquées dans le Tableau 10 ; 2 µL d'ADN (environ 4-6 ng) dilués au 1/10ème ont ensuite été ajoutés ainsi que de l'eau ultra-pure (qsp 20 µL). Le thermocycleur a été programmé comme suit : 10 minutes à 95 °C, 40 cycles de 15 secondes à 95 °C, 60 secondes aux valeurs de Tm indiqués dans le Tableau 1. La gamme étalon servant à la quantification a été réalisée à l'aide d'une dilution d'une solution de plasmides, contenant l'insert cible, digérés par l'enzyme de restriction *NotI*. Les dilutions utilisées vont de 10⁵ copies à 100 copies et ont été réalisées en triplicat. Un témoin négatif a été réalisé en triplicat (avec de l'eau ultra-pure à la place de l'ADN) ainsi qu'un témoin d'extraction. Les résultats sont exprimés en nombre de copies par 100 mL d'échantillon. Tous les résultats ont aussi été normalisés par rapport au nombre de copies d'ADNr 16S et sont exprimés en pourcentage.

(ii) Meta-barcoding d'ADN bactériens

Le séquençage des produits PCR du gène de l'ARNr 16S (*rrs*) segment V4 a été réalisé par les services de séquençage de Novogene sur un Illumina Miseq V3. Les produits PCR (300 bp) ont été générés à l'aide des amorces 515F GTGCCAGCMGCCGCGGTAA, et 806R GGACTACHVGGGTWTCTAAT².

² <https://www.novogene.com/amea-en/services/genomics/metagenome-sequencing/16s-18s-its-amplicon-metagenomic-sequencing/>

Les banques d'ADN *tpm* ont été séquencées par la technologie Illumina MiSeq V3 et par les services de séquençage Microsynth - Biofidal (Vaulx-en-Velin, France). Les produits de PCR ont été générés à l'aide du mélange suivant d'amorces PCR dégénérées : ILMN-PTCF2 (étiquette adaptatrice 5'-P5 + amorce universelle + GTGCCGYTRTGYGGCAAGA-'3), ILMN-PTCF2m (étiquette adaptatrice 5'-P5 + amorce universelle + GTGCCYTRTGYGGCAAGT-' 3), ILMN-PTCR2 (étiquette adaptatrice 5'- P7 + amorce universelle + ATCAKYGCGGCGCGGTCRTA-'3), et ILMN-PTCR2m (étiquette adaptatrice 5'- P7 + amorce universelle + ATGAGBGCTGCCCTGTCRTA-'3) ciblant les régions conservées définies par Favre- Bonté et al. (2005). L'amorce universelle était 5'-AGATGTGTATAAGAGACAG-'3. L'étiquette de l'adaptateur P5 était : 5'-TCGTCGGCAGCGTC-'3. L'étiquette de l'adaptateur P7 était : 5'- GTCTCGGTGGGCTCGG-'3. Les réactions PCR sont réalisées en utilisant le master mix 5X Hot BIOAmp® (Biofidal, France) contenant 12.5 mM de MgCl₂ et 10 % de DMSO et 50 ng de concentrations finales d'ADN d'échantillon. Les cycles de PCR sont les suivants : (i) un démarrage à chaud à 94°C pendant 5 min, (ii) 35 cycles comprenant 94°C pendant 30 s, 58°C pendant 30 s et 72°C pendant 30 s, et (iii) une extension finale de 5 min à 72°C. Le mélange contient deux enzymes soigneusement optimisées, l'ADN polymérase HOT FIREPol® et une polymérase de relecture. Ce mélange d'enzymes possède à la fois des activités d'exonucléase 5'→ 3' et de relecture 3'→ 5'. Ce mélange présente une fidélité accrue (jusqu'à cinq fois) par rapport à une Taq polymérase ordinaire. Les produits de PCR et les échantillons de contrôle à blanc sont vérifiés à l'aide d'un gel d'agarose à 2% et en suivant la procédure électrophorétique décrite ci-dessus. Les produits de PCR obtenus à partir d'échantillons de terrain présentaient des tailles d'environ 320 pb, mais les blancs ne présentaient pas de produits de PCR détectables et quantifiables. Les séquences d'ADN Index et Illumina P5 ou P7 sont ajoutées par Biofidal via une procédure PCR utilisant le même master mix Hot BIOAmp® et les températures ci-dessus, mais limitées à 15 cycles PCR. Les produits PCR indexés marqués P5/P7 sont purifiés à l'aide de la procédure SPRIselect (Beckman Coulter, Roissy, France). Les produits de PCR et les échantillons de contrôle à blanc ont été vérifiés à l'aide du kit QIAxcel DNA (Qiagen, France), et des tailles de bande d'environ 400 pb ont été observées, mais pas dans les échantillons à blanc. Les séquençages d'ADN Illumina Miseq des produits de PCR *tpm* sont appariés et configurés pour obtenir environ 40000 lectures par échantillon. Les échantillons vierges ont généré un faible nombre de lectures *tpm*. Les séquences des gènes d'ARNr 16S et de *tpm* de ce travail seront déposées dans les archives européennes de séquences nucléotidiques³.

³ www.ebi.ac.uk/ena

Tableau 10 : Amorces PCR utilisées dans le projet par le LEM.

Cibles	Amorces	Nom livret OTHU	gène cible	Séquences	Taille amplicons (bp)	Concentration finale (nM)	Seuil (CFX 96)	T°C hybridation (°C)	temps hybridation/élongation (s)	Type de Mix	Tm (°C) (Melcurve)	Gamme étalon	Quantitative Q qualitative q	LOD	Références
Total Bactéries 16S rRNA	338F	rss (16S rRNA)	gène ARNr 16S	ACTCTACGGGAGGAGCAG	181	300	141.45	63	30	SsoAdvanced Univ SYBR Grn Suprmix BIORAD	82	10 ⁷ à 10 ⁸ copies	Q	> 35 Cq	Park and Crowley, 2006
	518R			ATTACCGGGCTGCTGG											
Bacteroides humain	HF183F	HF183	gène ARNr 16S	ATCATGAGTTCACATGTCGG	81	500	78.92	59	30	SsoAdvanced Univ SYBR Grn Suprmix BIORAD	77	10 ⁵ à 1 copie	Q	< ou = 1 copie (moy triplicat)	Bernhard et Field, 2000 Seurinck et al., 2004
	HF183R			TACCCCGCTACTATCTAATG											
Bacteroidales totales	AllBac296F	AllBac	gène ARNr 16S	GAGAGGAAGTCCCCAC	106	200	259.33	60	40	SsoAdvanced Univ Probes Supermix BIORAD	NON	10 ⁶ à 10 copies	Q	< ou = 1 copie (moy triplicat)	Layton et al., 2006
	AllBac467R			CGCTACTTGGCTGTTACG											
	AllBac375Bhqr			FAM-CCATTGACCAATATCTCTACTGCTGCT-BHQ1											
Bacteroides porc	Pig-2-Bac41F	Pig-2-Bac	gène ARNr 16S	GCATGAATTTAGCTTGCTAAATTTGAT	116	300	25.22	57	60	SsoAdvanced Univ Probes Supermix BIORAD	NON	10 ⁵ à 1 copie	Q	< ou = 1 copie (moy triplicat)	Mieszkin et al., 2009
	Pig-2-Bac1638m			ACCTCATAACGGTATTAATCGCG											
	Pig-2Bac113			FAM-TCCAGGGGATAGCC-BHQ1											
Bacteroides ruminant	BacB2-590F	Rum-2-Bac	gène ARNr 16S	ACAGCCCGGATTTGACTGGTAA	99	200	54.86	60	30	SsoAdvanced Univ Probes Supermix BIORAD	NON	10 ⁵ à 1 copie	Q	< ou = 1 copie (moy triplicat)	Mieszkin et al., 2010
	Bac708Rm			CAATCGGAGTCTCTGCTGAT											
	BacB2-626P			FAM-ATGAGGTGGATGGAATTCGCTGTGT-BHQ1											
Bacteroides Bétail	CowM3F	Cow-M3-Bac	B. thetaiotaomicron genome locus BT0457	CCTCTAATGGAAAATGATGCTATCT	110	500	72.38	60	60	SsoAdvanced Univ Probes Supermix BIORAD	NON	NON	q	> 40 Cq	Shanks et al., 2008
	CowM3R			CCATACTTGGCTGTAAATACCTT											
	CowM3Probe			FAM-TTATGCTTGGATCGAGCC-TAMRA											
Prevotella cheval	HoF597f	Bacteroidales sp. des équins (HoF-597-Bac)	gène ARNr 16S	CCAGCCGTAAAATAGTCGG	129	200	204.35	60	60	SsoAdvanced Univ Probes Supermix BIORAD	NON	NON	q	> 40 Cq	Dick et al., 2005
	HoF597r			CAATCGGAGTCTTCTGCTG											
	HoF597p			FAM-AACTGCTGGTGTAGGGGTGAAA-TAMRA											
Bacteroides Résidents dans tuyaux d'épout (région V6 de l'ADNr 16S)	Bac989f	Sewer-V6-Bac	gène ARNr 16S	GCTTGAATTCGAGGAATA	174	500	234.16	60	60	SsoAdvanced Univ Probes Supermix BIORAD	NON	NON	q	> 40 Cq	Feng and McLellan, 2019
	Bac1162r			GCAGTCTCACTAGATCCTCAG											
	Bac1010p			FAM-AGTTGAAGATTATGGCCGA-NFQ-MGB											
Bacteroidales rat musqué	MuBa01F	Mu-Bac	gène ARNr 16S	CTCTTTTCCGGGGAG	168	200	121.55	60	60	SsoAdvanced Univ Probes Supermix BIORAD	NON	NON	q	> 30 Cq	Martí et al., 2011
	MuBa01R			TTTACCGCTTCTGCTGACG											
	MuBa01P			(FAM)-AGTACCCGGAGAAAAGCA-(BHQ-1)											
Bacteroidales chien	BacUni-690r	Bacteroidales sp. des chiens (Can-Bac)	gène ARNr 16S	CAATCGGAGTCTCTGCTGATATCTA	146	200	49.49	60	60	SsoAdvanced Univ Probes Supermix BIORAD	NON	NON	q	> 40 Cq	Kildare et coll., 2007
	BacUni-656p			FAM-TGGTGTAGCGGTGAAA-TAMRA-MGB											
	BacCan-545f			GGAGCGCAGACGGGTTTT											
Prevotella canard/poulet	qCD362F	Chick-qCD-Prev	gène ARNr 16S	AATATTGGTCAATGGGAGAG	103	200	236.99	60	60	SsoAdvanced Univ Probes Supermix BIORAD	NON	NON	q	> 35 Cq	Kobayashi et coll., 2013
	qCD464R			CAGTAGTGTCCGTTATCCCTTA											
	qBac394			FAM-TCCCTCAGGCTACTGG-MGB											
ecfX P. aeruginosa	ECFXqF	Pseudomonas aeruginosa	ecfX	AGCGTTCGCTCAGCAGT	81	500	85.04	59	30	Brilliant II SYBR® Green QPCR Master Mix with ROX Agilent	83	10 ⁶ à 10 copies	Q	> 35Cq	Clifford et al. (2012)
	ECFXqR			TCCACCATGCTCAGGGAGAT											
tpm A. caviae	qACAVF	Aeromonas caviae	tpm	AGGTGTGCTGGTGACCCTC	102	300	73.89	57	30	SsoAdvanced Univ Probes Supermix BIORAD	NON	10 ⁵ à 1 copie	Q	< ou = 1 copie (moy triplicat)	R. Marti
	qACAVR			CAAAGTGGCTCAACACGG											
	AcavTPMPPr			FAM-CTACAGCCGCTTCTCG-BHQ1											
Intégrase de type 1	int1f2	int (intégrase) de type 1	int1	TGTTGGTGGCATAACA	67	400	59.11	56	30	Brilliant II SYBR® Green QPCR Master Mix with ROX Agilent	80	10 ⁵ à 1 copie	Q	< ou = 1 copie (moy triplicat)	Gaze et al., 2011
	int1r2			GCTTGTCTACGGCCGTTTTGA											
Intégrase de type 2	int2qF	int (intégrase) de type 2	int2	TTTACGCTGCTGTATGTTCC	127	300	67.8	59	30	Brilliant II SYBR® Green QPCR Master Mix with ROX Agilent	79.5	10 ⁵ à 1 copie	Q	< ou = 1 copie (moy triplicat)	R. Marti, 2017
	int2qR			GGCTGTTTCTGCTTTCCCA											
Intégrase de type 3	int3qF	int (intégrase) de type 3	int3	CGGTCGAAATCCACATCC	125	300	113.72	61	30	Brilliant II SYBR® Green QPCR Master Mix with ROX Agilent	87	10 ⁵ à 1 copie	Q	< ou = 1 copie (moy triplicat)	R. Marti, 2017
	int3qR			AGGTTGAGACCTTCTGCTCG											
S. aureus (nuc)	nucF	Staphylococcus aureus	nuc	GCGATTGATGGGTATACGGT	279	400	305.23	63	30	Brilliant II SYBR® Green QPCR Master Mix with ROX Agilent	78	10 ⁶ à 10 copies	Q	< ou = 1 copie (moy triplicat)	Martinon and Wilkinson, 2011
	nucR			AGCCAA GCCTGACGAAGTAAAGC											
C. jejuni (mapA)	mapA_F	Campylobacter jejuni	mapA	CTGGTGGTTTTGAAGCAAGATT	95	300	327.49	60	60	Brilliant II QPCR Low ROX Mstr Mx	NON	10 ⁵ à 1 copie	Q	< ou = 1 copie (moy triplicat)	Best et al. 2003, FEMS Microbiology Letters
	mapA_R			CAATACCACTGTCTAAAGTGGTTTTAT											
	mapA_Pr			FAM-TTGAATTCACACTGGCTAATGTATAAAGCCCTTT-TAMRA.											

3.6.1.4 Compléments du LEM pour la réalisation des tests qPCR de la trousse OTHU

Ce complément précise les méthodologies déployées pour la réalisation des amplifications d'ADN par la réaction en chaîne de la Taq polymérase, et les modalités de quantification en fonction des cribles ADN.

(i) Cribles qPCR quantitative – gamme étalon

Une gamme étalon servant à la quantification a été réalisée à l'aide d'une dilution d'une solution de plasmides contenant l'insert cible, digérés par une enzyme de restriction (*NotI* ou *PstI*). Les dilutions sont réalisées en triplicat. Un témoin négatif est réalisé en triplicat (avec de l'eau ultra-pure à la place de l'ADN), ainsi qu'un témoin d'extraction à blanc des ADN environnementaux. Les résultats des qPCR quantitative sont exprimés en nombre de copies par 100 mL ou /g sec d'échantillon et sont normalisés par rapport au nombre de copies d'ADNr 16S exprimés en pourcentage.

(ii) Mix qPCR BIORAD

Les quantités de bactéries totales (ADNr 16S), de *Bacteroidales* totales, les marqueurs ADN de contaminations fécales dues à l'Homme, aux ruminants, aux porcs et l'espèce pathogène *A. caviae* (*tpm*) ont été estimées par qPCR via le mix BIORAD (pas de test d'inhibition nécessaire). Les mix Biorad (SsoAdvanced Univ SYBR Grn Suprmix ou SsoAdvanced Univ Probes Supermix) sont utilisés à une concentration de 1X. Les concentrations en amorces et en sonde sont indiquées dans le Tableau 10. 2 µL d'ADN dilué au 1/10ème (sauf si la concentration en ADN extrait est faible, plus petit facteur de dilution pour avoir au moins 15 ng/µL) sont ensuite ajoutés ainsi que de l'eau ultra-pure (qsp 20 µL). Le thermocycleur est programmé comme suit : 10 minutes à 95 °C, 40 cycles de 15 secondes à 95 °C, x secondes (valeurs dans le Tableau 10) aux valeurs de température indiquées dans le Tableau 10.

(iii) Mix qPCR Agilent avec tests d'occurrence d'inhibiteurs dans les ADN environnementaux

Les quantités de bactéries pathogènes *P. aeruginosa* (*ecfX*), *C. jejuni* (*mapA*), *S. aureus* (*nuc*) et les intégrons de classe 1, 2 et 3 (déterminants génétiques associés à la résistance aux antibiotiques) ont été déterminées par qPCR quantitative avec les mix Agilent (test d'inhibition nécessaire). Des tests d'inhibition avec une cible connue (*int2*) et une quantité connue (Tableau 10) sont effectués. Les concentrations en amorces et en sonde sont indiquées dans le Tableau 10. Le mix Agilent (Brilliant II SYBR® Green QPCR Master Mix with ROX) est utilisé avec 2 µL de la cible (plasmide *int2* à 10⁷ copie/µL). 2 µL d'ADN environnementaux dilués au 1/10ème (sauf si la concentration en ADN extrait est faible, plus petit facteur de dilution pour avoir au moins 15 ng/µL) sont ensuite ajoutés ainsi que de l'eau ultra-pure pour obtenir un volume final de 20 µL. Le thermocycleur est programmé comme suit : 10 minutes à 95 °C, 40 cycles de 15 secondes à 95 °C, x secondes aux températures indiquées dans le Tableau 10. Les valeurs de C_q obtenues avec une réaction témoin (triplicat – cible *int2* uniquement) sont comparées aux valeurs de C_q obtenues en présence des ADN environnementaux. La présence

d'inhibiteur est confirmée si les valeurs des échantillons ont des Cq > de 2 en comparaison avec le témoin int2. Une dilution des ADN à tester est alors réalisée (de 2 à 10 x en fonction des écarts de valeurs de Cq obtenue). Des tests d'inhibition sont réalisés sur les ADN environnementaux dilués en raison de la présence d'inhibiteurs jusqu'à ce que l'inhibition de la qPCR soit levée.

Les concentrations en amorces et en sonde utilisées avec le mix Agilent (Brilliant II SYBR® Green QPCR Master Mix with ROX et Brilliant II QPCR Master Mix with ROX) sont indiquées dans le Tableau 10. 2 µL d'ADN (dilués selon les tests d'inhibition) sont ajoutés au mélange réactionnel (qsp 20 µL). Le thermocycleur est programmé comme suit : 10 minutes à 95 °C, 40 cycles de 15 secondes à 95 °C, x secondes (valeurs dans le Tableau 10) aux valeurs de température indiquées dans le Tableau 10.

(iv) Cribles qPCR qualitative – sans gamme étalon disponible

Les quantités de marqueurs ADN de contaminations fécales dues aux vaches, aux chevaux, chiens, rats, volailles (poulet/canard) et bactéries résidentes des réseaux d'eaux usées ont aussi été analysées par cette approche. Les amorces et les sondes utilisées sont répertoriées dans le Tableau 10. Le mix Biorad (SsoAdvanced Univ Probes Supermix) a été utilisé. Les concentrations en amorces et en sonde sont indiquées dans le Tableau 10. 2 µL d'ADN dilué au 1/10ème (sauf si la concentration en ADN extrait est faible, plus petit facteur de dilution pour avoir au moins 15 ng/µL) sont ensuite ajoutés ainsi que de l'eau ultra-pure (qsp 20 µL). Le thermocycleur est programmé comme suit : 10 minutes à 95 °C, 40 cycles de 15 secondes à 95 °C, 60 secondes aux valeurs de température indiquées dans le Tableau 10. Un témoin négatif est réalisé en triplicat (avec de l'eau ultra-pure à la place de l'ADN) ainsi qu'un témoin d'extraction à blanc. Un nombre de copies théoriques pour les marqueurs amplifiés en qPCR sans gamme peut être calculé pour exprimer les résultats en fonction du nombre de copies amplifiées du gène codant l'ARNr 16S. Pour cela la formule suivante est utilisée pour les marqueurs : Nb copies par qPCR = $10^{((Cq-40)/-3.33)}$.

(v) Interprétation des résultats

Les analyses des courbes d'amplification par qPCR doivent se faire après avoir fixé manuellement le seuil (Threshold) sur le logiciel CFX96 afin d'homogénéiser les valeurs de Cq pour la comparaison des résultats pour un marqueur donné pour des échantillons analysés sur des plaques différentes.

Les valeurs de seuil définies lors des mises au point et validation des marqueurs, pour chaque marqueur sont indiquées dans le Tableau 10. Les valeurs de Cq et/ou de quantification acceptées pour chacun des cribles sont indiquées dans le Tableau 10 (LOD = limite de détection). Pour les analyses statistiques, les LOD sont transformées en 0. Sinon, la dénomination LOQ (limite de quantification) est utilisée pour les résultats présentant de la variabilité entre réplicats selon les situations suivantes : (a) 2 triplicats/3 valeur Cq haute (36 à 38) + 1 triplicat/3 non détectable ; (b) 1 triplicat/ 3 valeur Cq ~34-36 + 2 triplicats/ 3 non détectables.

De façon générale, les résultats des qPCR quantitatives sont exprimés en nombre de copies par 100 mL ou /g sec d'échantillon et sont normalisés sur le nombre de copies d'ADNr 16S X 100 pour exprimer les quantités relatives en pourcentage.

3.6.2 Analyses microbiennes à l'IGE

L'ADN total de chaque échantillon d'eau filtrée, a été extrait à l'aide du kit d'extraction optimisé « DNeasy Blood & Tissue » (Qiagen, 69504) (Cf. annexe 2). Un volume de 50 µL est élué en deux fois 25 µL. L'ADN extrait est quantifié par un dosage fluorométrique en utilisant le kit « Qubit® dsDNA BR Assay Kits » sur le fluoromètre Qubit® 2.0 en suivant le protocole du fournisseur. Les échantillons d'ADN sont conservés à -20 °C.

L'abondance des bactéries totales est mesurée par PCR quantitative en ciblant la partie V3 du gène 16S rRNA. La dissémination des gènes de résistances aux sulfonamides (*su1* et *su2*), à la tétracycline (*tetM*) et au cuivre (*copA*) est suivi par PCR quantitative également. Toutes les qPCR ont été réalisées dans un thermocycleur CFX 96 (Biorad). Les séquences des amorces utilisées sont répertoriées dans le Tableau 11 ainsi que leur température de fusion. Le mélange réactionnel de 20 µL est composé de 3 µL d'échantillon d'ADN, 10 µL de SsoAdvanced Universal SYBR Green Supermix (Biorad, 1725274), 0.6 µL de 10 µM de chaque amorce et 5.8 µL d'H₂O. Les programmes du thermocycleur sont présentés dans le Tableau 11. Les courbes de fusions sont contrôlées pour vérifier la spécificité des réactions. La dilution d'une solution de plasmide spécialement développé à l'IGE (Lehembre F. et J.MF. Martin, communication personnelle) contenant les gènes cibles qPCR est utilisée comme gamme étalon pour la quantification. Un témoin négatif est réalisé avec de l'eau déionisée stérile à la place de l'ADN, correspondant à un blanc terrain (bouteille emmenée sur le terrain) ainsi qu'un témoin d'extraction à blanc des ADN environnementaux. Les résultats sont exprimés en nombre de copies par mL d'échantillon prélevé. Tous les résultats sont normalisés par rapport au nombre de copies du gène 16S rRNA.

Tableau 11 : Gènes ciblés, amorces utilisées et conditions expérimentales utilisées pour les quantifications par qPCR à l'IGE.

Cible	Amorces	Séquence 5'-3'	Programme thermocycleur
16s RNA région V3	Eub338	ACTCCTACGGGAGGCAGCAG	95 °C, 2 min
	Eub518	ATTACCGCGGCTGCTGG	35 cycles : 95 °C, 5 sec 60 °C, 20 sec
Sul1	653F	CCGTTGGCCTTCCTGTAAAG	95 °C, 10 min
	719R	TTGCCGATCGCGTGAAGT	35 cycles : 95 °C, 10 sec 60 °C, 60 sec
Sul2	595F	CGGCTGCGCTTCGATT	95 °C, 3 min
	654R	CGCGCGCAGAAAGGATT	40 cycles : 95 °C, 10 sec 60 °C, 30 sec
TetM	tetM_f	GGTTTCTCTTGGATACTTAAATCAATCR	95 °C, 3 min
	tetM_r	CCAACCATAYAATCCTTGTTTCRC	40 cycles : 95 °C, 10 sec 60 °C, 30 sec
CopA	CopA - CH34 - F	ATGTGGAAC SARATGCGKATGA	95 °C, 10 min
	CopA - CH34 - R	AGYTT CAGCCSGGAATACG	40 cycles : 95 °C, 15 sec 63 °C, 30 sec 72 °C, 30 sec

4. Contrôles qualité mis en place lors de l'échantillonnage et du traitement des échantillons

4.1 Blancs terrain et laboratoire

Afin de vérifier l'absence de contamination sur l'ensemble de la chaîne prélèvement/conditionnement/analyse, deux types de blancs terrain ont été réalisés en fonction des protocoles d'échantillonnage :

- Blanc terrain manuel : un flacon rempli d'eau ultra-pure est apportée sur le terrain. Durant l'échantillonnage d'un échantillon de source, ce flacon est laissé ouvert. Il est ensuite traité et analysé comme tous les autres échantillons de source.

- Blanc flacon préleveur : pour les préleveurs installés sur le Ratier et le Mercier (préleveurs installés quelques heures avant l'évènement pluvieux ciblé) un flacon de préleveur automatisé rempli d'eau ultra-pure au laboratoire est placé au milieu du carrousel de chaque ISCO. Il est laissé ouvert jusqu'au prélèvement d'un évènement. Ce flacon est récupéré, conditionné et analysé de la même façon que les flacons d'échantillonnage ISCO après un évènement pluvieux. Pour les préleveurs installés sur la Claduègne et le Gazel (préleveurs réinstallés juste après un évènement pluvieux en prévision du prochain évènement), un flacon vide est laissé au centre de l'ISCO. Le flacon est rempli avec de l'eau ultra-pure seulement lors de la récupération des échantillons. L'eau ultra-pure est donc en contact avec le flacon quelques heures en moins que l'eau de la rivière.

Un 3ème type de blanc, appelé blanc filtration laboratoire, est réalisé en filtrant au laboratoire un échantillon d'eau ultra-pure comme s'il s'agissait d'un échantillon de source ou de mélange, lors de la filtration des échantillons de terrain. Ce type de blanc permet de contrôler l'absence de contamination sur l'ensemble de la chaîne conditionnement/analyse.

L'ensemble de ces blancs complètent les contrôles qualité spécifiquement mis en place lors de chaque série d'analyse.

4.1.1 Résultats des blancs pour les ions majeurs et la silice dissoute

En ce qui concerne l'échantillonnage sur le bassin du Ratier, toutes les concentrations des ions majeurs des blancs terrain manuel et blanc filtration laboratoire sont inférieures aux limites de quantification (Tableau 12). Des concentrations inférieures aux LQ sont aussi observées pour la silice dissoute, le COD et le NTD. Ainsi, aucune contamination en ions et éléments majeurs n'est observée pour les échantillons prélevés sur le bassin du Ratier.

Concernant le bassin de la Claduègne, au contraire du BV du Ratier, les concentrations des ions majeurs sont mesurées par ICP-MS en non par chromatographie ionique. De fait, l'ion chlorure n'est pas accessible, et ce sont les concentrations en éléments S et P qui ont été mesurées pour approcher les concentrations en ions sulfate et phosphate. Les concentrations des blancs terrain manuel de la Claduègne sont plus faibles que les LQ des analyses des ions majeurs réalisées par chromatographie ionique. Par contre, les concentrations en COD mesurées dans les blancs terrain manuel et les blancs préleveurs posent problème dans la mesure où elles sont significativement plus élevées que les LQ, autour de 0.8 mgC/L et entre 1 et 5 mgC/L, respectivement. Ces échantillons pourraient donc être contaminés en carbone (voir partie 4.1.2). Mais après vérification, il s'est avéré que cette contamination en carbone provenait de l'eau ultra-pure utilisée exclusivement pour la confection des blancs terrain de l'IGE et donc sans incidence sur les échantillons. En revanche, aucune contamination en NTD n'est observée car toutes les concentrations mesurées dans les blancs sont inférieures à 0.6 mgN/L.

Tableau 12 : Concentrations en ions et éléments majeurs, silice dissoute, carbone organique dissous (COD) et azote total dissous (NTD) dans les différents blancs filtration laboratoire, terrain manuel et flacon préleveur réalisés sur les bassins du Ratier et de la Claduègne. N.D. : non déterminé.

BV	type de blanc	date	SiO ₂ mgSi/L	COD mgC/L	NTD mgN/L	Cl- mg/L	NO ₂ - mg/L	NO ₃ - mg/L	PO ₄ ³⁻ mg/L	SO ₄ ²⁻ mg/L	Na+ mg/L	K+ mg/L	Mg ²⁺ mg/L	Ca ²⁺ mg/L	NH ₄ ⁺ mg/L
Yzeron	blanc filtration Laboratoire	23/06/22	< 0.4	< 0.2	< 0.2	< 1	< 0.05	< 1	< 0.10	< 1	< 1	< 1	< 1	< 4	< 0.02
Yzeron	blanc filtration Laboratoire	08/12/22	< 0.4	< 0.2	< 0.2	< 1	< 0.05	< 1	< 0.10	< 1	< 1	< 1	< 1	< 4	< 0.02
Yzeron	blanc terrain manuel	07/12/22	< 0.4	< 0.2	< 0.2	< 1	< 0.05	< 1	< 0.10	< 1	< 1	< 1	< 1	< 4	< 0.02

BV	type de blanc	date	Si mgSi/L	COD mgC/L	NTD mgN/L	P mgP/L	S mgS/L	Na mg/L	K mg/L	Mg mg/L	Ca mg/L
Claduègne	blanc terrain manuel	17/03/22	0.10	0.8	N.D.	0.01	0.05	0.08	0.07	0.03	0.6
Claduègne	blanc terrain manuel	30/06/22	0.08	0.82	< 0.2	0.02	0.04	0.20	0.01	0.02	0.3
Claduègne	blanc terrain manuel	20/10/22	0.10	0.65	0.20	0.01	0.03	0.05	0.04	0.01	0.2
Claduègne	blanc terrain manuel	01/12/22	0.10	< 0.2	< 0.2	0.01	0.01	0.02	0.04	0.01	0.2
Claduègne	blanc flacon préleveur	01/12/22	<LQ	5.1	< 0.2	0.003	<LQ	0.10	0.06	0.01	0.1
Claduègne	blanc flacon préleveur	25/10/23		1.26	0.50						
Claduègne	blanc flacon préleveur	25/10/23		2.51	0.59						

4.1.2 Résultats des blancs pour la matière organique dissoute (MOD)

Les spectres UV-visible des blancs terrain et laboratoire sont très faibles et proches de la ligne de base (Figure 7). Seul le blanc filtration laboratoire du 08/12/2022 présente une légère augmentation d'absorbance pour les longueurs d'onde inférieures à 230 nm (sûrement due à la présence d'ions nitrate). Comparés aux spectres des échantillons de sources dont les absorbances sont les plus faibles de tous les échantillons prélevés sur chacun des deux bassins (COR-MAN-220209 pour le Ratier et MI7-MAN-220317 pour la Claduègne), les absorbances des spectres de l'ensemble des blancs peuvent être considérées comme négligeables et aucune contamination significative n'est observée.

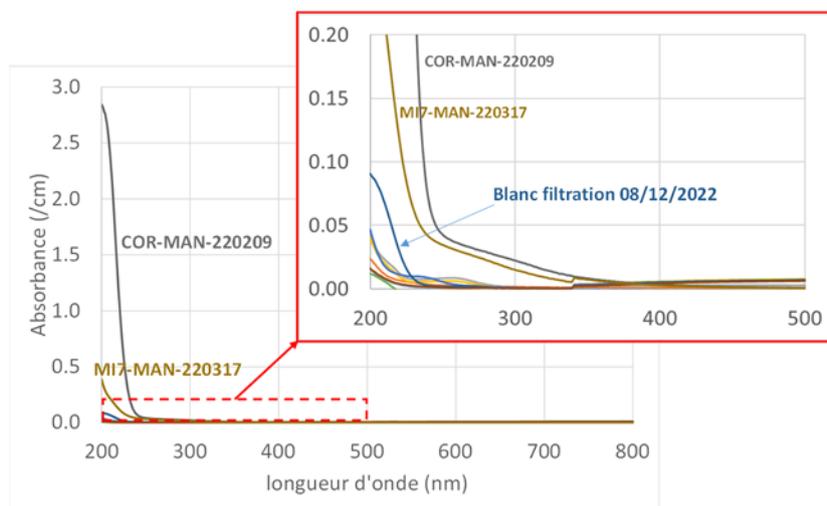


Figure 7 : Spectres UV-visible de blancs filtrations laboratoire (n=2), blancs terrain manuel (n=5) et blanc flacon préleveur (n=1). Les spectres de ces contrôles qualité sont comparés aux spectres des deux échantillons de source prélevés sur le Ratier (COR-MAN-220209) et la Claduègne (MI7-MAN-220317) ayant les absorbances à 254 nm les plus faibles de tous les échantillons prélevés sur chaque bassin.

Ces résultats permettent de supposer que la contamination en COD observée pour certains blancs terrain manuel et pour le blanc préleveur sur la Claduègne est due à une forme de carbone qui n'absorbe pas dans le spectre UV-visible ; cela ne peut donc pas être des résidus de solvant (méthanol) servant au nettoyage des flacons d'échantillonnage et conditionnement et confirme la contamination du système d'eau-ultra-pure utilisée pour la confection des blancs terrain de l'IGE.

Pour les mesures de caractérisation de la MOD par analyse HPSEC-UV, les chromatogrammes des blancs sont proches de la ligne de base, comme le montre la Figure 8 pour les mesures d'absorbances à 227 nm. Les absorbances mesurées dans les blancs peuvent être considérées comme négligeables et aucune contamination significative n'est observée, comme le montre la comparaison de ces valeurs de blancs avec les valeurs d'absorbances mesurées pour les échantillons de source dont les absorbances sont les plus faibles de tous les échantillons prélevés sur chacun des deux bassins (COR-MAN-220209 pour le Ratier et MI7-MAN-220317 pour la Claduègne).

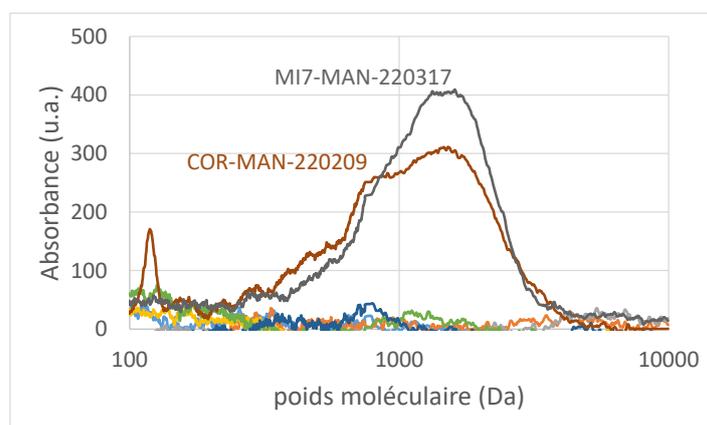


Figure 8 : Chromatogrammes obtenus pour des mesures à 227 nm dans des blancs filtrations laboratoire (n=2), blancs terrain manuel (n=5) et blanc flacon préleveur (n=1). Les spectres de ces contrôles qualité sont comparés aux spectres des deux échantillons de source prélevés sur le Ratier (COR-MAN-220209) et la Claduègne (MI7-MAN-220317) ayant les absorbances à 254 nm les plus faibles de tous les échantillons prélevés sur chaque bassin.

4.1.3 Résultats des contrôles qualité pour les métaux dissous

Pour les métaux dissous analysés dans les laboratoires de RiverLy (BV du Ratier), les blancs de filtration laboratoire n'ont jamais été quantifiés pour B, Ti, V, Mn, As, Rb, Cd et U (Tableau 13). Ils ont été quelquefois quantifiés pour Li, Co, Ni, Cu, Sr, Mo et Ba mais à des concentrations inférieures à 10% de la concentration minimale mesurée dans les échantillons de la série analytique (Tableau 13, cases jaunes). Dans ce cas, le blanc est considéré comme négligeable et les concentrations des échantillons ne sont pas corrigées. Pour Al, Fe, Zn et Pb, un blanc filtration a été quantifié à plus de 10% de la concentration la plus faible mesurée dans les échantillons (Tableau 13, cases orange). Dans ce cas, la concentration du blanc est systématiquement retranchée aux concentrations mesurées dans les échantillons. Enfin, les concentrations en Cr sont quantifiées dans 66% des blancs filtration du laboratoire et, dans 50% du temps, ces concentrations sont plus de 10% plus élevées que la plus petite

valeur mesurée dans les échantillons. Les concentrations en Cr des blancs filtration ont aussi été retranchées aux concentrations mesurées dans les échantillons.

Un blanc terrain manuel a été réalisé sur le BV du Ratier dans lequel seuls Cr et Mn ont été quantifiés (Tableau 13). La concentration en Mn est considérée comme négligeable par rapport aux concentrations mesurées dans les échantillons de la série d'analyse. Par contre, pour Cr, cette concentration représente jusqu'à 45% de la concentration retrouvée dans les échantillons. A l'heure actuelle, l'origine de la contamination en Cr (qui n'excède toutefois pas 6 fois la LQ) n'est pas identifiée. Les concentrations des blancs sont systématiquement retranchées aux concentrations mesurées dans les échantillons. L'utilisation de Cr pour la création d'empreintes géochimiques est alors questionnable. Il est recommandé de n'utiliser cet élément que s'il ne peut être substitué par un autre élément ou paramètre donnant le même type d'information.

Tableau 13 : Concentrations en métaux dissous mesurées dans les blancs filtration laboratoire et blanc terrain manuel (analysés à RiverLy). Les cases jaunes indiquent des concentrations quantifiées mais inférieures à 10% de la plus petite concentration mesurée dans les échantillons de la série d'analyse. Les cases orange indiquent des concentrations dans les blancs qui sont supérieures à 10% de la plus petite concentration mesurée dans les échantillons de la série d'analyse (dans ce cas les valeurs des blancs sont retranchées aux concentrations des échantillons).

unité : µg/L		Li	B	Al	Ti	V	Cr	Mn	Fe	Co	Ni	Cu	Zn	As	Rb	Sr	Mo	Cd	Ba	Pb	U
type	LQ	0.010	2.0	0.050	0.005	0.020	0.050	0.100	0.005	0.020	0.050	0.50	0.010	0.010	0.050	0.010	0.005	0.010	0.010	0.005	
labo	10/02/2022	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	0.045	< LQ	0.012	< LQ											
labo	15/02/2022	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	0.073	< LQ	0.127	< LQ	< LQ	0.095	< LQ	< LQ							
labo	18/05/2022	< LQ	< LQ	2.17	< LQ	< LQ	0.082	< LQ	2.43	0.007	< LQ	< LQ									
labo	23/06/2022	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ
labo	28/06/2022	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	0.026	< LQ	< LQ												
labo	01/07/2022	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	0.53	< LQ	< LQ	0.054	< LQ	< LQ
labo	16/09/2022	0.019	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	0.065	< LQ	< LQ	< LQ	0.025	0.120	< LQ	< LQ							
labo	16/09/2022	0.015	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	0.109	< LQ	0.101	< LQ	< LQ										
labo	08/12/2022	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	0.081	< LQ	0.257	< LQ	0.242	< LQ	0.085	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ				
labo	08/01/2023	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	0.125	< LQ	< LQ										
labo	14/03/2023	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	0.104	< LQ	0.119	< LQ	< LQ	< LQ	1.58	< LQ	< LQ						
labo	28/03/2023	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	0.77	< LQ	< LQ						
terrain	07/12/2022	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	0.160	< LQ	< LQ												

A la date de rédaction de ce rapport, aucun blanc terrain ou laboratoire n'a été spécifiquement réalisé pour les métaux pour les échantillonnages et analyses réalisées dans les laboratoires de IGE (BV de la Claduègne). Une campagne de blanc terrain et de blanc filtration laboratoire doit être encore effectuée afin de contrôler d'éventuelle contamination. A titre indicatif, le Tableau 14 montre les concentrations en métaux dans des flacons de blancs terrain (mais conditionnés pour les analyses des micropolluants organiques). Plus de la moitié des métaux ont des concentrations de blancs terrain inférieures à 10% de la plus petite concentration mesurée dans la série d'analyse (échantillons source du bassin de la Claduègne). Quelques métaux posent soucis (Ti, V, Rb, Sr et Ba) mais les contaminations observées sont peut-être dues au conditionnement non optimal pour la collecte des échantillons en vue de l'analyse des métaux et de la contamination (observée pour la carbone) de l'eau ultra-pure ayant servi à la confection de ces blancs terrain.

Tableau 14 : Concentration la plus faible mesurée dans un échantillon de la série d'analyse divisée par la valeur du blanc terrain (échantillons analysés à RiverLy). Ces ratios sont donnés à titre indicatif étant donné que le flaconnage utilisé pour ces contrôles était adapté pour la mesure des micropolluants organiques.

Type	Date	Li	B	Al	Ti	V	Cr	Mn	Fe	Co	Ni	Cu	Zn	As	Rb	Sr	Mo	Cd	Ba	Pb	U
Blanc terrain manuel	17/03/2022	<LQ	41	77	6	11	<LQ	164	9	12	43	88	337	38	8	1	310	238	3	216	65
Blanc terrain manuel	30/06/2022	15	21	137	8	1	<LQ	9	19	13	41	164	433	3	2	0.4	16	1015	9	505	420
Blanc terrain manuel	20/10/2022	7	57	96	7	0.3	<LQ	102	41	6	38	109	220	<LQ	4	0.1	<LQ	3209	5	395	216
Blanc terrain manuel	01/12/2022	<LQ	55	285	35	5	<LQ	173	146	3	38	51	987	14	8	0.2	64	2131	3	148	170
Blanc terrain manuel	15/05/2022	<LQ	<LQ	36	1	<LQ	<LQ	50	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	6	10	0.2	34	86	<LQ	176	16

4.2 Reproductibilité des échantillonnages et des analyses

Pour évaluer la reproductibilité des étapes de conditionnement et d'analyse, des duplicats de filtration et d'analyse (réplicats « laboratoire ») ont été réalisés en laboratoire sur des échantillons prélevés sur le bassin du Ratier. De plus, pour évaluer la reproductibilité de l'ensemble des étapes (prélèvement, conditionnement et analyse), des triplicats d'échantillons ont été prélevés sur le terrain, puis traités et analysés séparément (réplicats « terrain »). Les résultats de ces tests sont exprimés en écart-type relatif pour les triplicats (RSD en %) et en différence relative (RPD en %) pour les duplicats.

4.2.1 Reproductibilité pour les ions majeurs et la silice dissoute

Pour les paramètres majeurs, les résultats montrent des dispersions généralement inférieures à 10%, que ce soit pour les répliquats terrain ou laboratoire (Tableau 15). Quelques exceptions sont à noter pour i) un des 3 répliquats (laboratoire) pour l'ion ammonium (RPD = 13%), ce qui peut s'expliquer par les concentrations mesurées très proches des LQ, et ii) un des 3 répliquats (laboratoire) pour le COD dont la valeur de RPD (11%) reste inférieure à l'incertitude analytique pour ce paramètre (12%, incertitude élargie avec k=2). Pour la silice dissoute, un des 3 répliquats (laboratoire) montre une dispersion élevée (29%) ; cette anomalie n'est pas expliquée.

Tableau 15 : Concentrations des paramètres majeurs mesurés dans des répliquats terrain ou laboratoire réalisés sur des échantillons du bassin du Ratier (analysés à RiverLy). Les dispersions sont exprimées sous forme d'écart-types relatif (RSD en %) ou de différences relatives (RPD en %).

		SiO ₂	COD	NTD	Cl ⁻	NO ₂ ⁻	NO ₃ ⁻	PO ₄ ³⁻	SO ₄ ²⁻	Na ⁺	K ⁺	Mg ²⁺	Ca ²⁺	NH ₄ ⁺
		mgSi/L	mgC/L	mgN/L	mg/L	mg/L	mg/L	mg/L	mg/L	mg/L	mg/L	mg/L	mg/L	mg/L
LQ		0.4	0.2	0.2	1	0.05	1	0.1	1	1	1	1	4	0.02
type répliquat	échantillon													
terrain	GAR-MAN-221207 - 1/3	13.3	7.15	3.30	49.7	0.10	12.7	0.11	52.5	30.8	5.4	6.9	51.7	< 0,02
terrain	GAR-MAN-221207 - 2/3	13.6	6.90	3.30	52.2	0.10	13.3	0.11	55.1	32.4	5.6	7.2	54.5	< 0,02
terrain	GAR-MAN-221207 - 3/3	14.0	6.85	3.15	52.4	0.10	13.4	0.11	55.2	32.4	5.6	7.3	54.5	< 0,02
	RSD (%)	3%	2%	3%	3%	0%	3%	0%	3%	3%	3%	3%	3%	-
labo	MER-ISC-230313-21h00-21h15 - 1/2	7.8	5.65	1.20	33.5	0.04	4.08	0.17	18.1	18.9	2.86	3.38	22.8	0.08
labo	MER-ISC-230313-21h00-21h15 - 2/2	7.7	5.65	1.25	34.0	0.04	4.03	0.17	18.3	19.1	2.76	3.45	23.2	0.07
	RPD (%)	1%	0%	4%	1%	0%	1%	0%	1%	1%	4%	2%	2%	13%
labo	RES-MAN-230314 - 1/2	5.5	26.9	30.4	74	0.9	12.4	7.50	33.8	47.4	12.5	4.89	53.0	32.4
labo	RES-MAN-230314 - 2/2	7.4	30.0	32.1	74.5	0.92	12.5	7.66	34.0	47.9	12.6	4.92	53.6	32.4
	RPD (%)	29%	11%	5%	1%	2%	1%	2%	1%	1%	1%	1%	1%	0%

4.2.2 Reproductibilité pour la caractérisation de la MOD

Les spectres UV-visible réalisés sur le triplicat terrain et sur les deux duplicats laboratoire sont présentés dans la Figure 9. Pour chaque répliquat, les spectres sont parfaitement superposés, ce qui suggère une très bonne reproductibilité de l'échantillonnage et conditionnement des échantillons et de leur analyse par spectrophotométrie UV-visible pour la caractérisation de la MOD.

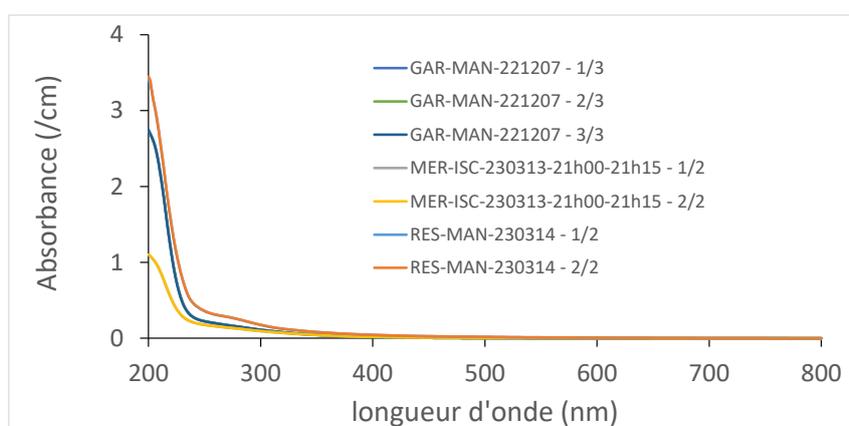


Figure 9 : Spectres UV-visible obtenus dans des répliquats terrain et laboratoire réalisés sur des échantillons d'eau de surface du bassin du Ratier.

Cette bonne reproductibilité est aussi visible sur la dispersion des indicateurs UV-visible calculés à partir des spectres. Toutes les valeurs de dispersion sont inférieures à 10% (Tableau 16).

Tableau 16 : Indicateurs UV-visible calculés à partir des spectres mesurés dans des réplicats terrain ou laboratoire réalisés sur des échantillons du bassin du Ratier. Les dispersions sont exprimées sous forme d'écart-types relatif (RSD en %) ou de différences relatives (RPD en %).

		E2E3	E2E4	E3E4	E4E6	SUVA	S1	S2	SR
unité		-	-	-	-	-	-	-	-
type réplicat	échantillon								
terrain	GAR-MAN-221207 - 1/3	6.7	27.9	7.1	90.9	3.0	0.0149	0.0211	0.71
terrain	GAR-MAN-221207 - 2/3	6.7	28.4	7.1	87.6	3.1	0.0149	0.0213	0.70
terrain	GAR-MAN-221207 - 3/3	6.7	27.7	7.0	91.9	3.1	0.0149	0.0211	0.71
	RSD (%)	0%	1%	1%	2%	2%	0%	1%	1%
labo	MER-ISC-230313-21h00-21h15 - 1/2	5.3	16.3	5.2	7.9	3.0	0.0135	0.0172	0.78
labo	MER-ISC-230313-21h00-21h15 - 2/2	5.3	16.2	5.2	7.6	3.0	0.0135	0.0171	0.79
	RPD (%)	0%	1%	0%	4%	0%	0%	1%	1%
labo	RES-MAN-230314 - 1/2	5.3	10.8	3.9	5.9	1.2	0.0159	0.0123	1.29
labo	RES-MAN-230314 - 2/2	5.2	10.7	3.9	5.5	1.1	0.0158	0.0122	1.30
	RPD (%)	2%	1%	0%	7%	9%	1%	1%	1%

Les spectres UV-visible réalisés à 227 et 254 nm après séparation par HPSEC sur le triplicat terrain et sur les deux duplicats laboratoire sont présentés dans la Figure 10. Pour chaque réplicat, les spectres sont superposés, ce qui suggère une très bonne reproductibilité de l'échantillonnage et conditionnement des échantillons et de leur analyse par HPSEC-UV pour la caractérisation de la MOD.

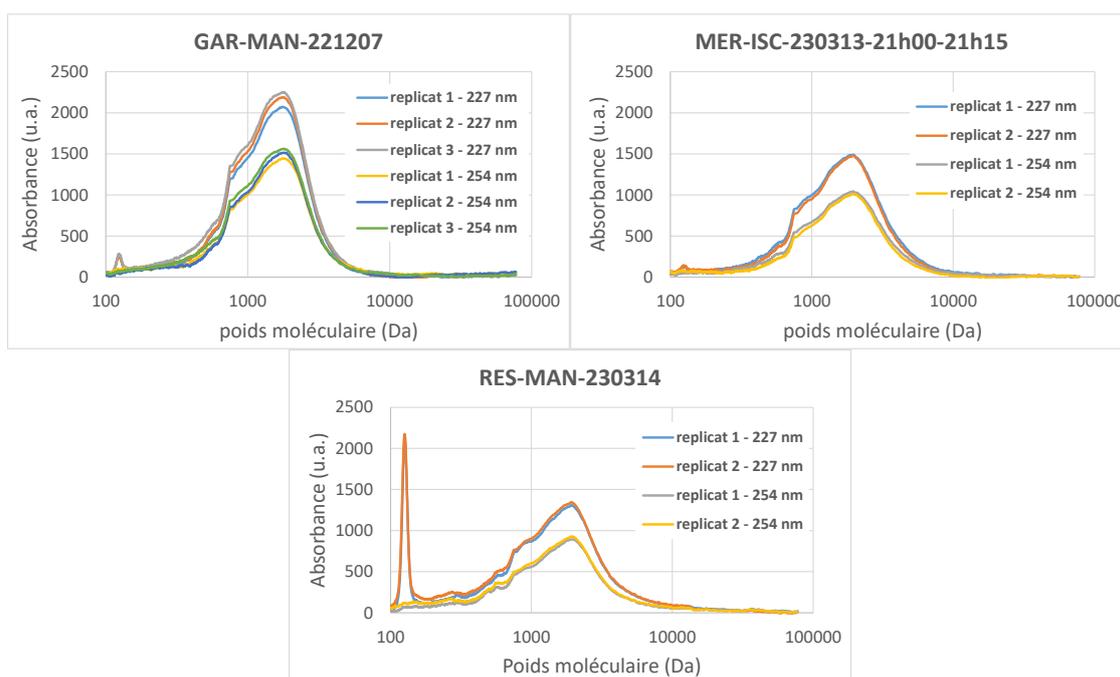


Figure 10 : Chromatogrammes obtenus pour des mesures à 227 et 254 nm dans des réplicats terrain et laboratoire réalisés sur des échantillons d'eau de surface du bassin du Ratier par HPSEC-UV.

Comme pour l'UV-visible, les indicateurs calculés à partir des chromatogrammes obtenus à 227 et 254 nm montrent une bonne reproductibilité, avec des dispersions inférieures à 20% (Tableau 17). Ces dispersions prennent en compte à la fois la variabilité due à l'analyse et celle due à la correction de la ligne de base, qui peut influencer les valeurs des indicateurs.

Tableau 17 : Indicateurs HPSEC-UV calculés à partir des spectres mesurés à 227 nm dans des répliquats terrain ou laboratoire réalisés sur des échantillons du bassin du Ratier. Les dispersions sont exprimées sous forme d'écart-types relatif (RSD en %) ou de différences relatives (RPD en %). Mn : poids moléculaire moyen en nombre ; Mw : poids moléculaire moyen en masse ; disp : dispertivité (Mw/Mn) ; C0, C1, C2 et C3 : contributions au spectre total de la MOD de taille comprise entre 7000 et 77500 Da, 1500 et 7000 Da, 550-1500 Da, 100 et 550 Da.

type répliquat	indicateur unité	Mn Da	Mw Da	disp -	C0 %	C1 %	C2 %	C3 %
terrain	GAR-MAN-221207 - 1/3	559	1526	2.73	< 2	34	42	24
terrain	GAR-MAN-221207 - 2/3	563	1646	2.92	< 2	34	42	24
terrain	GAR-MAN-221207 - 3/3	535	1461	2.73	< 2	32	41	27
	RSD (%)	3%	6%	4%	-	3%	1%	7%
labo	MER-ISC-230313-21h00-21h15 - 1/2	581	1820	3.13	2	38	36	24
labo	MER-ISC-230313-21h00-21h15 - 2/2	542	1775	3.27	2	39	36	24
	RPD (%)	7%	3%	4%	0%	3%	0%	0%
labo	RES-MAN-230314 - 1/2	317	1617	5.10	3	26	28	43
labo	RES-MAN-230314 - 2/2	300	1359	4.53	2	24	27	47
	RPD (%)	6%	17%	12%	40%	8%	4%	9%

4.2.3 Reproductibilité pour les métaux dissous

Les résultats sont aussi très satisfaisants pour les métaux dissous (Tableau 18). En effet, la dispersion obtenue entre chaque duplicat terrain ou laboratoire est généralement inférieure à 20% pour tous les éléments. Quelques valeurs sont comprises entre 20 et 32 % pour Al, Cr (un seul duplicat terrain), pour Pb (deux duplicats terrain), pour Zn (un seul duplicat laboratoire), et pour Ti (un duplicat terrain et un duplicat laboratoire). Pour U, la dispersion pour les deux duplicats terrain sont mauvaises (113 et 62%), alors qu'elle est très bonne pour le duplicat laboratoire (1% seulement).

Tableau 18 : Concentrations des métaux dissous mesurés dans des duplicats terrain ou laboratoire réalisés sur des échantillons du bassin du Ratier (analysés à RiverLy). Les dispersions sont exprimées sous forme de différences relatives (RPD en %).

		Li	B	Al	Ti	V	Cr	Mn	Fe	Co	Ni
unité		µg/L	µg/L	µg/L	µg/L	µg/L	µg/L	µg/L	µg/L	µg/L	µg/L
LQ		0.02	2	1	0.05	0.005	0.02	0.05	0.05	0.005	0.05
type réplikat	échantillon										
terrain	RAT-EHL-230314-00h00 - 1/2	2.04	18.9	96.30	4.04	1.09	0.570	7.55	97.3	0.170	0.760
terrain	RAT-EHL-230314-00h00 - 2/2	1.80	16.2	109	4.33	1.11	0.460	8.82	110.0	0.180	0.750
	rpd (%)	13%	15%	12%	7%	2%	21%	16%	12%	6%	1%
terrain	RAT-EHL-230314-00h15 - 1/2	1.72	15.4	98.3	3.52	1.11	0.60	7.47	109	0.176	0.78
terrain	RAT-EHL-230314-00h15 - 2/2	1.96	15.7	130	4.86	1.19	0.56	8.55	130	0.190	0.84
	rpd (%)	13%	1%	28%	32%	7%	6%	13%	17%	8%	8%
labo	RAT-EHL-230313-18h30 - 1/2	1.67	19.7	9.3	0.537	0.540	0.237	13.01	42.9	0.148	0.687
labo	RAT-EHL-230313-18h30 - 2/2	2.00	18.6	8.8	0.423	0.534	0.230	12.34	42.3	0.149	0.692
	rpd (%)	18%	6%	6%	24%	1%	3%	5%	2%	1%	1%

		Cu	Zn	As	Rb	Sr	Mo	Cd	Ba	Pb	U
unité		µg/L	µg/L	µg/L	µg/L	µg/L	µg/L	µg/L	µg/L	µg/L	µg/L
LQ		0.05	0.1	0.01	0.01	0.01	0.01	0.005	0.01	0.02	0.01
type réplikat	échantillon										
terrain	RAT-EHL-230314-00h00 - 1/2	1.67	1.50	2.08	1.56	94.1	0.700	0.007	27.1	0.280	0.830
terrain	RAT-EHL-230314-00h00 - 2/2	1.90	1.56	2.01	1.80	85.1	0.650	0.007	24.7	0.360	0.230
	rpd (%)	13%	4%	3%	14%	10%	7%	0%	9%	25%	113%
terrain	RAT-EHL-230314-00h15 - 1/2	1.88	1.66	1.98	1.72	83.8	0.589	0.008	24.6	0.36	0.226
terrain	RAT-EHL-230314-00h15 - 2/2	2.09	1.82	1.97	1.83	85.4	0.564	0.009	24.6	0.46	0.120
	rpd (%)	11%	10%	1%	6%	2%	4%	15%	0%	23%	62%
labo	RAT-EHL-230313-18h30 - 1/2	2.115	1.97	1.32	1.20	138	0.387	0.006	32.6	0.119	0.781
labo	RAT-EHL-230313-18h30 - 2/2	2.035	1.51	1.31	1.15	140	0.378	0.006	32.2	0.110	0.773
	rpd (%)	4%	26%	1%	4%	1%	3%	2%	1%	8%	1%

4.3 Comparaison des préleveurs

En cas de problème sur les échantillonneurs automatiques pour la collecte des échantillons de mélanges lors d'évènement pluvieux, un test a été réalisé pour savoir si les échantillons pour les analyses de paramètres majeurs et de métaux dissous, et pour la caractérisation de la MOD pouvaient non pas être collectés sur les préleveurs Endress+Hauser avec flacons en plastique mais sur les préleveurs ISCO avec flacons en verre. Ainsi, deux échantillons ont été collectés en double sur chaque type de préleveurs et conditionnés en suivant le protocole classique pour les paramètres majeurs, métaux dissous, et la matière organique. La comparaison des résultats sur ces doublons permet aussi de montrer d'éventuelles contaminations ou phénomènes d'absorption avec les différents flacons de prélèvement.

Les résultats obtenus montrent qu'il n'y a pas de différence pour les paramètres majeurs avec l'utilisation des deux types de préleveurs et de flaconnage. En effet les écarts relatifs sont tous inférieurs à 15% (Tableau 19), excepté pour les nitrates (-20%). Les écarts relatifs les plus importants restent cependant de l'ordre des incertitudes analytiques, ce qui suggère l'absence de contamination

ou de phénomène d'adsorption pour les paramètres majeurs, et la possibilité d'intervertir les préleveurs et flaconnage en cas de nécessité.

Tableau 19 : Concentrations des paramètres majeurs mesurés dans des doublons d'échantillons (mélange à l'exutoire du sous-bassin du Mercier) prélevés à l'aide des deux types de préleveurs avec leur flaconnage associé (ISC : préleveur ISCO avec bouteilles en verre ; EHL : préleveur Endress+Hauser avec flacons en plastique). Les écarts relatifs entre les deux valeurs sont exprimés en fonction de la référence du préleveur EHL.

	SiO ₂ mgSi/L	COD mgC/L	NTD mgN/L	Cl ⁻ mg/L	NO ₂ ⁻ mg/L	NO ₃ ⁻ mg/L	PO ₄ ³⁻ mg/L	SO ₄ ²⁻ mg/L	Na ⁺ mg/L	K ⁺ mg/L	Mg ²⁺ mg/L	Ca ²⁺ mg/L	NH ₄ ⁺ mg/L
LQ	0.4	0.2	0.2	1	0.05	1	0.1	1	1	1	1	4	0.02
RAT-ISC-230313-21h00-21h15	7.0	7.95	1.45	34.6	0.05	4.63	0.22	17.2	19.7	4.30	3.43	22.3	0.06
RAT-EHL-230313-21h00-21h15	7.0	7.15	1.40	34.7	0.05	5.76	0.21	17.4	19.5	4.22	3.42	22.3	0.06
écart relatif (%)	0%	11%	4%	0%	0%	-20%	5%	-1%	1%	2%	0%	0%	0%

Les spectres UV-visible de ces deux échantillons sont similaires pour les longueurs d'onde entre 220 et 800 nm (Figure 11). Une légère différence est observée pour les longueurs d'onde comprise entre 200 et 220 nm avec des absorbances plus élevées pour le préleveur EHL avec flacons en plastique. Ceci confirme bien les concentrations plus élevées en nitrate mesurées dans les flacons en plastique par rapport aux flacons en verre (Tableau 19). Ceci pourrait être lié à un phénomène d'adsorption des nitrates sur les flacons en verre ou à une légère contamination des flacons en plastique.

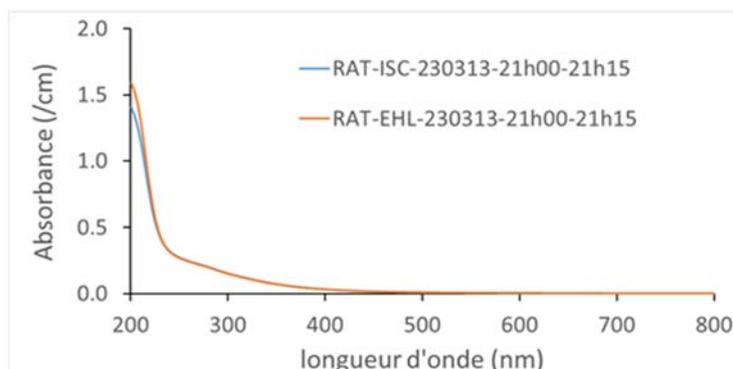


Figure 11 : Spectres UV-visible obtenus dans des doublons d'échantillons (mélanges à l'exutoire du sous-bassin du Ratier) prélevés à l'aide des deux types de préleveurs avec leur flaconnage associé (ISC : préleveur ISCO avec flacons en verre ; EHL : préleveur Endress+Hauser avec flacons en plastique).

Pour les métaux dissous, les écarts relatifs les plus importants sont pour Mn (-24%) et Zn (-32%). Pour ces deux éléments, la concentration obtenue avec le flaconnage en verre est inférieure à celle obtenue avec le flaconnage en plastique, ce qui peut être lié à un phénomène d'adsorption. Une différence de 18% est calculé pour Cd, mais les concentrations sont très proches de la LQ (variation comprise dans l'incertitude analytique). Pour tous les autres éléments, les différences sont inférieures à 15% (Tableau 20). Comme pour les paramètres majeurs, ces résultats montrent l'absence de contamination ou de phénomène d'adsorption pour la plupart des éléments analysés ; et qu'il serait donc possible d'échantillonner occasionnellement les métaux avec les préleveurs ISCO et flacon en verre en cas de nécessité.

Tableau 20 : Concentrations des métaux dissous mesurées dans des doublons d'échantillons (mélanges à l'exutoire du sous-bassin du Mercier) prélevés à l'aide des deux types de préleveurs avec leur flaconnage associé (ISC : préleveur ISCO avec bouteilles en verre ; EHL : préleveur Endress+Hauser avec flacons en plastique). Les écarts relatifs entre les deux valeurs sont exprimés en fonction de la référence du préleveur EHL.

unité	Li	B	Al	Ti	V	Cr	Mn	Fe	Co	Ni	Cu	Zn	As	Rb	Sr	Mo	Cd	Ba	Pb	U
LQ	µg/L	µg/L	µg/L	µg/L	µg/L	µg/L	µg/L	µg/L	µg/L	µg/L	µg/L	µg/L	µg/L	µg/L	µg/L	µg/L	µg/L	µg/L	µg/L	µg/L
échantillon	0.02	2	1	0.05	0.005	0.02	0.05	0.05	0.005	0.05	0.05	0.1	0.01	0.01	0.01	0.01	0.005	0.01	0.02	0.01
RAT-ISC-230313-21h00-21h15	0.844	12.1	79.1	2.60	0.919	0.40	5.71	102	0.175	0.72	2.39	2.06	1.24	1.76	82.4	0.361	0.013	19.1	0.27	0.242
RAT-EHL-230313-21h00-21h15	0.818	13.0	78.6	2.62	0.828	0.45	7.55	101	0.167	0.72	2.56	3.02	1.19	1.75	82.1	0.338	0.011	19.1	0.29	0.251
écart relatif (%)	3%	-7%	1%	-1%	11%	-11%	-24%	1%	5%	0%	-7%	-32%	5%	1%	0%	7%	18%	0%	-6%	-4%

4.4 Synthèse sur la qualité des échantillonnages et analyses

Les contrôles qualité d'échantillonnage et d'analyse mis en place pour ce projet montrent l'absence de contamination pour les paramètres majeurs, les métaux dissous et la caractérisation optique de la MOD. Seul les blancs pour le chrome sont élevés dans la moitié des séquences d'analyse réalisées. Une attention particulière devra être apportée à cet élément. Il pourra être utilisé (après soustraction des concentrations des blancs aux concentrations des échantillons) si besoin, i.e. si cet élément est utile pour la construction des empreintes biogéochimiques sans possibilité de le substituer par un autre élément ou paramètre apportant des informations similaires. Les résultats sont aussi très bon pour les répliqués terrain ou laboratoire pour l'ensemble des paramètres majeurs, métaux dissous et caractérisation optique de la MOD. Ces résultats soulignent la très bonne reproductibilité dans la chaîne d'échantillonnage, conditionnement et analyse. Il serait même possible, en cas de besoin, de prélever les échantillons pour l'analyse des paramètres majeurs et des métaux dissous avec les préleveurs ISCO et flacons en verre prévus pour les contaminants organiques. Seules les concentrations en nitrates, Zn et Mn pourraient être affectées par des phénomènes d'adsorption. Ce dernier test souligne encore une fois l'absence de contamination et de phénomène d'adsorption pour tous les autres métaux dissous et ions majeurs.

5. Conclusions

Les protocoles de collecte des échantillons de source (prélèvements manuels) et de mélange (à l'aide de préleveurs automatiques) ont été validés. Cette validation se base notamment sur le nombre important d'échantillons prélevés et les contrôles qualité mis en place (blancs terrain, répliqués d'échantillonnage). Les blancs terrains sont généralement très bons pour les paramètres majeurs, les métaux et pour les indicateurs de la MOD, avec des valeurs non quantifiées ou inférieures à 10% des plus petites concentrations mesurées dans les échantillons. Des blancs terrain plus élevés ont été observés de manière systématique pour le chrome et pour deux contaminants organiques, la caféine et l'acide fénofibrique. Même si les valeurs des blancs sont soustraites des concentrations des échantillons, il est recommandé d'éviter d'utiliser ces 3 paramètres pour l'établissement des empreintes biogéochimiques. Les répliqués réalisés pour les paramètres majeurs, les métaux et la caractérisation de la MOD montrent de faibles dispersions, typiquement < 15% (excepté pour U, pour une raison inconnue à ce jour), ce qui souligne la grande qualité des échantillonnages et des analyses.

Les protocoles ont été adaptés pour prendre en compte les spécificités des deux bassins versants étudiés, en particulier le fait que le bassin de la Claduègne soit éloigné des laboratoires (plus de 3 h de voiture). En particulier, les filtrations pour les paramètres majeurs et les métaux sont réalisées sur le terrain dans le cas du bassin le plus éloigné des laboratoires afin de limiter les évolutions potentielles des échantillons (en particulier les échanges entre phases dissoutes et particulaire) ; quand cela est possible, les filtrations peuvent être réalisées en laboratoire (ce qui est fait pour le bassin le plus proche des laboratoires) ce qui permet de maîtriser au mieux les possibles contaminations et surtout de simplifier les opérations et de gagner du temps.

Des difficultés inhérentes à l'utilisation de préleveurs automatisés sont apparues, comme le prélèvement de volumes d'eau inférieurs aux volumes programmés, ou même l'absence de prélèvement dû à un problème de programmation ou un problème physique sur le terrain (tuyau de pompage ensablé ou hors d'eau).

La plupart des analyses ont été réalisées dans deux laboratoires différents (RiverLy et IGE pour les analyses chimiques, LEM et IGE pour les analyses microbiologiques). Ceci permet de proposer quelques recommandations afin de garantir la robustesse de la qualité des données. Pour le conditionnement des échantillons en vue de l'analyse des paramètres majeurs, nous recommandons d'éviter de congeler les échantillons et de les analyser dans les 48 h. En cas d'impossibilité d'analyser les échantillons dans les jours suivant l'échantillonnage, les échantillons doivent être dilués avant congélation afin d'éviter la précipitation de certains ions (en particulier le calcium) lors de la décongélation. Toutefois, une dilution trop importante empêche de quantifier certains ions présents

en faibles concentrations (par exemple les ions ammonium, nitrite ou phosphate). Il est recommandé d'analyser les métaux par ICP-MS ce qui permet de quantifier la plupart des métaux, présents à l'état de trace.

Enfin, un peu moins de tests qualité (comme des réplicats) ont été réalisés pour les analyses des micropolluants organiques. Cependant, certains micropolluants ont été analysés dans deux laboratoires différents (RiverLy et IGE) et la comparaison des résultats obtenus permettra de valider les protocoles mis en place pour l'analyse ciblée des contaminants organiques, tout en étant critique sur l'analyse de certains composés qui semblent plus difficiles à analyser. Cette étape est en cours de finalisation et permettra d'éditer une liste robuste de contaminants organiques qui seront utilisées pour le projet.

Des protocoles classiques sont utilisés dans le projet CHYPSTER pour l'analyse de certains paramètres microbiens comme le dénombrement des bactéries viables et cultivables. Des protocoles innovants ont été développés pour permettre l'analyse des paramètres microbiens avec séquençage d'amplicons de gènes / ADN. Ceci est aussi le cas pour l'analyse suspectée de micropolluants organiques ou la caractérisation moléculaire de la MOD par spectrométrie de masse haute résolution. Toutes ces données originales produites seront confrontées à l'ensemble du jeu de données plus classique pour évaluer leur robustesse et leur potentiel.

Références bibliographiques

- Livrable WP1.1. - Dusseux P., Robinet N. (2022). Identification et cartographie des sources potentielles de pollutions diffuses en milieu agricole : utilisation combinée d'enquêtes et de données cartographiques - Livrable WP1 (rapport d'étape / Jalon 1). ANR CHYPSTER. 21 p.
- Livrable WP2.2 - Masson M., Duwig C. (2023). Avancement sur l'acquisition des données biogéochimiques des sources et des mélanges pour les bassins de l'Yzeron et de la Claduègne. Rapport d'étape. ANR CHYPSTER. 14 p.
- AFNOR – NF EN ISO 9963-1 (1996). Qualité de l'eau - Détermination de l'alcalinité - Partie 1 : détermination de l'alcalinité totale et composite. 11 p.
- AFNOR – NF EN 1484 (1997). Analyse de l'eau - Lignes directrices pour le dosage du carbone organique total (TOC) et carbone organique dissous (COD). 14 p.
- AFNOR – NF EN 14911 (1999). Qualité de l'eau - Dosage par chromatographie ionique, des ions Li^+ , Na^+ , NH_4^+ , K^+ , Mn_2^+ , Ca_2^+ , Mg_2^+ , Sr^{2+} et Ba^{2+} dissous - Méthode applicable pour l'eau et les eaux résiduaires. 26 p.
- AFNOR – NF T90-007 (2001). Qualité de l'eau - Dosage des silicates solubles - Méthode par spectrométrie d'absorption moléculaire. 5 p.
- AFNOR – XP T90-220 (2003). Qualité de l'eau - Protocole d'estimation de l'incertitude de mesure associée à un résultat d'analyse pour les méthodes physico-chimiques. 74 p.
- AFNOR – NF EN ISO 10304-1 (2009). Qualité de l'eau - Dosage des anions dissous par chromatographie des ions en phase liquide - Partie 1 : dosage du bromure, chlorure, fluorure, nitrate, nitrite, phosphate et sulfate. 26 p.
- AFNOR – NF ISO 11352 (2013). Qualité de l'eau - Estimation de l'incertitude de mesure basée sur des données de validation et de contrôle qualité. 35 p.
- AFNOR – NF T90-210 (2018). Qualité de l'eau - Protocole d'évaluation initiale des performances d'une méthode dans un laboratoire. 60 p.
- AFNOR – NF EN ISO 17294-2 (2023). Qualité de l'eau - Application de la spectrométrie de masse avec plasma à couplage inductif (ICP-MS) - Partie 2 : dosage des éléments sélectionnés y compris les isotopes d'uranium. 45 p.
- Aigle, A., Colin, Y., Bouchali, R., Bourgeois, E., Marti, R., Ribun, S., Marjolet, L., Pozzi, A.C.M., Misery, B., Colinon, C., Bernardin-Souibgui, C., Wiest, L., Blaha, D., Galia, W., Cournoyer, B. (2021). Spatio-temporal variations in chemical pollutants found among urban deposits match changes in thiopurine S-methyltransferase-harboring bacteria tracked by the tpm metabarcoding approach. *Science of The Total Environment* 767, 145425. doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.145425
- Bernhard, A.E., Field, K.G. (2000). A PCR Assay To Discriminate Human and Ruminant Feces on the Basis of Host Differences in Bacteroides-Prevotella Genes Encoding 16S rRNA. *Applied and Environmental Microbiology* 66(10), 4571-4574. doi.org/10.1128/AEM.66.10.4571-4574.2000
- Best, E.L., Powell, E.J., Swift C., Grant, K.A., Frost J.A. (2003). Applicability of a rapid duplex real-time PCR assay for speciation of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* directly from culture plates. *FEMS Microbiology Letters* 229(2), 237-241. [doi.org/10.1016/S0378-1097\(03\)00845-0](https://doi.org/10.1016/S0378-1097(03)00845-0)
- Boukra, A. (2023). Caractérisation intégrée de la matière organique dissoute : recherche d'empreintes physico-chimiques pour tracer les sources de pollutions anthropiques. Thèse de doctorat de l'Université Claude Bernard Lyon 1. 335 p. <https://hal.science/tel-04584694v1>

- Boukra, A., Masson, M., Brosse, C., Sourzac, M., Parlanti, E., Miège, C. (2023). Sampling terrigenous diffuse sources in watercourse: Influence of land use and hydrological conditions on dissolved organic matter characteristics. *Science of The Total Environment* 872, 162104. doi.org/10.1016/j.scitotenv.2023.162104
- Clifford, R., Milillo, M., Prestwood, J., Quintero, R., Zueawski, D.V., Kwak, Y.I., Waterman, P.E., Lesho, E.P., Mc Gann, P. (2012). Detection of Bacterial 16S rRNA and Identification of Four Clinically Important Bacteria by Real-Time PCR. *PLoS ONE* 7(11), e48558. doi.org/10.1371/journal.pone.0048558
- Colin, Y., Bouchali, R., Marjolet, L., Marti, R., et al. et al. (2020). Coalescence of bacterial groups originating from urban runoffs and artificial infiltration systems among aquifer microbiomes. *Hydrology and Earth System Sciences* 24(9), 4257-4273. doi.org/10.5194/hess-24-4257-2020.
- Colinon, C., Deredjian, A., Hien, E., Brothier, E., Bouziri, L., Cournoyer, B., Hartman, A., Henry, S., Jolivet, C., Ranjard, L., Nazaret, S., 2013. Detection and enumeration of *Pseudomonas aeruginosa* in soil and manure assessed by an ecfX qPCR assay. *J. Appl. Microbiol.* 114, 1734–1749. doi.org/10.1111/jam.12189
- Dick, L.K., Bernhard, A.E., Brodeur, T.J., Santo Domingo, J.W., Simpson, J.M., Walters, S.P., Field, K.G. (2005). Host distributions of uncultivated fecal Bacteroidales bacteria reveal genetic markers for fecal source identification. *Applied and Environmental Microbiology* 71(6), 3184-3191. doi.org/10.1128/AEM.71.6.3184-3191.2005
- Eymery, F., Choubert, J.-M., Lepot, B., Gasperi, J., Lachenal, J., Coquery, M. (2011). Guide technique opérationnel : Pratiques d'échantillonnage et de conditionnement en vue de la recherche de micropolluants prioritaires et émergents en assainissement collectif et industriel, Première version. Irstea/Cemagref, 85 p. <https://hal.inrae.fr/hal-02597244>
- Favre-Bonté, S., Ranjard, L., Colinon, C., Prigent-Combaret, C., Nazaret, S., Cournoyer, B. (2005). Freshwater selenium-methylating bacterial thiopurine methyltransferases: diversity and molecular phylogeny. *Environmental Microbiology* 7, 153-164. doi.org/10.1111/j.1462-2920.2004.00670.x
- Feng, S., McLellan, S.L. (2019). Highly Specific Sewage-Derived Bacteroides Quantitative PCR Assays Target Sewage-Polluted Waters. *Applied and Environmental Microbiology* 85(6), e02696-18. doi.org/10.1128/AEM.02696-18
- Fourel, F., Lécuyer, C., Jame, P., Guironnet, A., Boutier, A., Barbier, M., Blamey, N., Brand, U., Fralick, P. (2020). Simultaneous $\delta^2\text{H}$ and $\delta^{18}\text{O}$ analyses of water inclusions in halite with off-axis integrated cavity output spectroscopy. *Journal of Mass Spectrometry*, 55(10), e4615. doi.org/10.1002/jms.4615
- Gaze, W.H., Zhang, L., Abdousslam, N.A., Hawkey, P.M., Calvo-Bado, L., Royle, J., Brown, H., Davis, S., Kay, P., Boxall, A.B.A., Wellington, E.M.H. (2011). Impacts of anthropogenic activity on the ecology of class 1 integrons and integron-associated genes in the environment. *The ISME Journal* 5(8), 1253-1261. doi.org/10.1038/ismej.2011.15
- Giacomini, F., Le Corguillé, G., Monsoor, M., Landi, M., Pericard, P., Pétéra, M., Duperier, C., Tremblay-Franco, M., Martin, J.-F., Jacob, D., Goullitquer, S., Thévenot E.A., Caron, C. (2015). Workflow4Metabolomics: a collaborative research infrastructure for computational metabolomics. *Bioinformatics* 31(9), 1493-1495. doi.org/10.1093/bioinformatics/btu813
- Haugland, R., Varma, M., Sivaganesan, M., Kelty, C., Peed, L., Shanks, O.C. (2010). Evaluation of genetic markers from the 16S rRNA gene V2 region for use in quantitative detection of selected Bacteroidales species and human fecal waste by qPCR. *Systematic and Applied Microbiology* 33(6), 348-357. doi.org/10.1016/j.syapm.2010.06.001

- Kildare, B.J., Leutenegger, C.M., McSwain, B.S., Bambic, D.G., Rajal, V.B., Wuertz, S. (2007). 16S rRNA-based assays for quantitative detection of universal, human-, cow-, and dog-specific fecal *Bacteroidales*: A Bayesian approach. *Water Research* 41(16), 3701-3715. doi.org/10.1016/j.watres.2007.06.037
- Kobayashi, A., Sano, D., Hatori, J., Ishii, S., Okabe, S. (2013). Chicken- and duck-associated *Bacteroides*–*Prevotella* genetic markers for detecting fecal contamination in environmental water. *Applied Microbiology and Biotechnology* 97, 7427-7437. doi.org/10.1007/s00253-012-4469-2
- Layton, A., McKay, L., Williams, D., Garrett, V., Gentry R., Sayler, G. (2006). Development of *Bacteroides* 16S rRNA gene TaqMan-based real-time PCR assays for estimation of total, human, and bovine fecal pollution in water. *Applied and Environmental Microbiology* 72, 4214-4224. doi.org/10.1128/AEM.01036-05
- Li P., Hur J. (2017). Utilization of UV-Vis spectroscopy and related data analyses for dissolved organic matter (DOM) studies: A review. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology* 47, 131-154. doi.org/10.1080/10643389.2017.1309186
- Marti, R., Zhang, Y., Lapen, D.R., Topp, E. (2011). Development and validation of a microbial source tracking marker for the detection of fecal pollution by muskrats. *Journal of Microbiological Methods* 87(1), 82-88. doi.org/10.1016/j.mimet.2011.07.013
- Marti, R., Bécouze-Lareure, C., Ribun, S., Marjolet, L., Souibgui, C.B., Aubin, J.-B., Lipeme Kouyi, G., Wiest, L., Blaha, D., Cournoyer, B. (2017). Bacteriome genetic structures of urban deposits are indicative of their origin and impacted by chemical pollutants. *Scientific Reports* 7, 13219. doi.org/10.1038/s41598-017-13594-8
- Martinon, A, Wilkinson, M.G. (2011). Selection of optimal primer sets for use in a duplex SYBR Green-based, real-time polymerase chain reaction protocol for the detection of *Listeria Monocytogenes* and *Staphylococcus Aureus* in foods. *Journal of Food Safety* 31, 297-312. doi.org/10.1111/j.1745-4565.2011.00301.x
- Masson, M. (2015). Synthèse bibliographique sur la faisabilité des sondes spectrophotométriques pour la caractérisation in situ de la matière organique. Rapport AQUAREF-Irstea, 20 p. <https://hal.inrae.fr/hal-02605329>
- Mathon, B., Ferreol, M., Togola, A., ...Mazzella, N., Miège, C. (2022). Polar organic chemical integrative samplers as an effective tool for chemical monitoring of surface waters – Results from one-year monitoring in France. *Science of the Total Environment* 166(6), 57-71. doi.org/10.1016/j.scitotenv.2022.153549
- Mieszkin, S., Furet, J.-P., Corthier, G., Gourmelon, M. (2009). Estimation of Pig Fecal Contamination in a River Catchment by Real-Time PCR Using Two Pig-Specific *Bacteroidales* 16S rRNA Genetic Markers. *Applied and Environmental Microbiology* 75, 3045-3054. doi.org/10.1128/AEM.02343-08
- Mieszkin, S., Yala, J.-F., Joubrel, R., Gourmelon, M. (2010). Phylogenetic analysis of *Bacteroidales* 16S rRNA gene sequences from human and animal effluents and assessment of ruminant faecal pollution by real-time PCR. *Journal of Applied Microbiology* 108, 974–984. doi.org/10.1111/j.1365-2672.2009.04499.x
- Park, J.-W., Crowley, D.E. (2006). Dynamic changes in nahAc gene copy numbers during degradation of naphthalene in PAH-contaminated soils. *Environmental Biotechnology* 72, 1322-1329. doi.org/10.1007/s00253-006-0423-5
- Raue, B., Brauch, H.J., Frimmel, F.H. (1991). Determination of sulphate in natural waters by ICP/OES - comparative studies with ion chromatography. *Fresenius J Anal Chem* 340, 395-398. doi.org/10.1007/BF00321590

- Seurinck, S., Defoirdt, T., Verstrate, W., Siciliano, S.D. (2004). Detection and quantification of the human-specific HF183 Bacteroides16S rRNA genetic marker with real-time PCR for assessment of human faecal pollution in freshwater. *Environmental Microbiology* 7(2), 249-259. doi.org/10.1128/AEM.66.10.4571-4574.2000
- Shanks, O.C., Atokovic, E., Blackwwod, A.D., Lu, J., Noble, R.T., Santo Domingo, J., Seifring, S., Sivaganesan, M., Haugland, R.A. (2008). Quantitative PCR for Detection and Enumeration of Genetic Markers of Bovine Fecal Pollution. *Applied and Environmental Microbiology* 74(3), 745-752. doi.org/10.1128/AEM.01843-07

ANNEXE 1 : Code “Campbell IGE” - déclenchement des échantillonneurs automatiques ISCO (IGE)

Sub chypster

MeanH est la variable pour le niveau d'eau
variation_MeanH est la différence de niveau d'eau entre le pas de temps actuel et le pas de temps précédent

```
variation_MeanH = MeanH - Claduegne.MeanH(1)
```

signe_variation est le signe attribué en fonction de la valeur de variation_MeanH

```
If variation_MeanH < -delta_variation Then  
    signe_variation = -1  
Elseif variation_MeanH > delta_variation Then  
    signe_variation = 1  
Else  
    signe_variation = 0  
EndIf
```

somme_element est somme de signe_variation au pas de temps actuel, au pas de temps précédent et à l'avant-dernier pas de temps

```
somme_element = signe_variation + Claduegne.signe_variation(1) + Claduegne.signe_variation(2)
```

critere_variation_niveau est le signe attribué en fonction de la valeur de somme_element

```
If somme_element >= 2 Then  
    critere_variation_niveau = -1  
Elseif somme_element <= -2 Then  
    critere_variation_niveau = 1  
Else  
    critere_variation_niveau = 0  
EndIf
```

delta_temps_isco est l'intervalle de temps depuis le dernier prélèvement

limit_crue vaut 50 min

le prélèvement est commandé selon des conditions suivantes :

```
If delta_temps_isco >= limit_crue Then  
    If critere_variation_niveau = -1 AND Claduegne.critere_variation_niveau(1) = -1 Then  
        Prelevements_chypster  
        delta_temps_isco = 0  
    Elseif critere_variation_niveau = 1 AND Claduegne.critere_variation_niveau(1) = 1 Then  
        Prelevements_chypster  
        delta_temps_isco = 0  
    EndIf  
EndIf
```

condition spécifique pour le prélèvement à l'étiage

```
If delta_temps_isco >= limit_hebdo Then  
    If Heure = 12 AND Minute = 0 Then  
        Prelevements_chypster  
        delta_temps_isco = 0  
    EndIf
```

EndIf

delta_temps_isco = delta_temps_isco + 1

EndSub

ANNEXE 2 : Extraction d'ADN : Dneasy Blood & Tissue, Qiagen

(Source : Laurence Marjolet - Vetagro Sup)

- 1- Vortexer pendant 30 secondes (s'assurer que le filtre est bien au contact du tampon GITC - Ne pas hésiter à déplier le filtre)
- 2- Ajouter 300 µL de tampon AL
- 3- Vortexer pendant 30 secondes
- 4- Ajouter 500 µL d'éthanol absolu
- 5- Vortexer pendant 30 secondes
- 6- Transférer 700 µL de lysat sur une colonne de centrifugation (Dneasy mini spin column)
- 7- Centrifuger 1 min à 13 000 rpm. Jeter le filtrat
- 8- Répéter les étapes 6 et 7 jusqu'à ce que tout le lysat soit passé sur la colonne
- 9- Placer la colonne sur un nouveau tube de collection
- 10- Ajouter 500 µL de tampon AW1
- 11- Laisser agir 5 min
- 12- Centrifuger 1 min à 13 000 rpm. Jeter le filtrat
- 13- Placer la colonne sur un nouveau tube de collection
- 14- Ajouter 700 µL de tampon AW2
- 15- Centrifuger 1 min à 13 000 rpm. Jeter le filtrat
- 16- Centrifuger 2 min à 13 000 rpm pour éliminer toute trace d'éthanol
- 17- Placer les colonnes dans un tube de 1.5 mL
- 18- Ouvrir les capuchons des colonnes et laisser 5 min à l'air pour permettre l'évaporation de l'éthanol résiduel
- 17- Ajouter 25 µL de tampon AE directement sur la silice et attendre 1 min
- 18- Centrifuger 1 min à 13 000 rpm pour éluer l'ADN
- 19- Répéter l'étape 17 et 18 (augmente le rendement)
- 20- Fermer les tubes et les conserver à -20°C