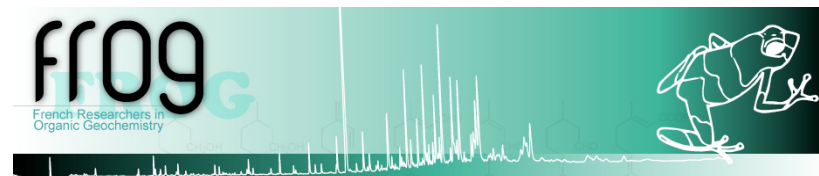


# Stanols fécaux

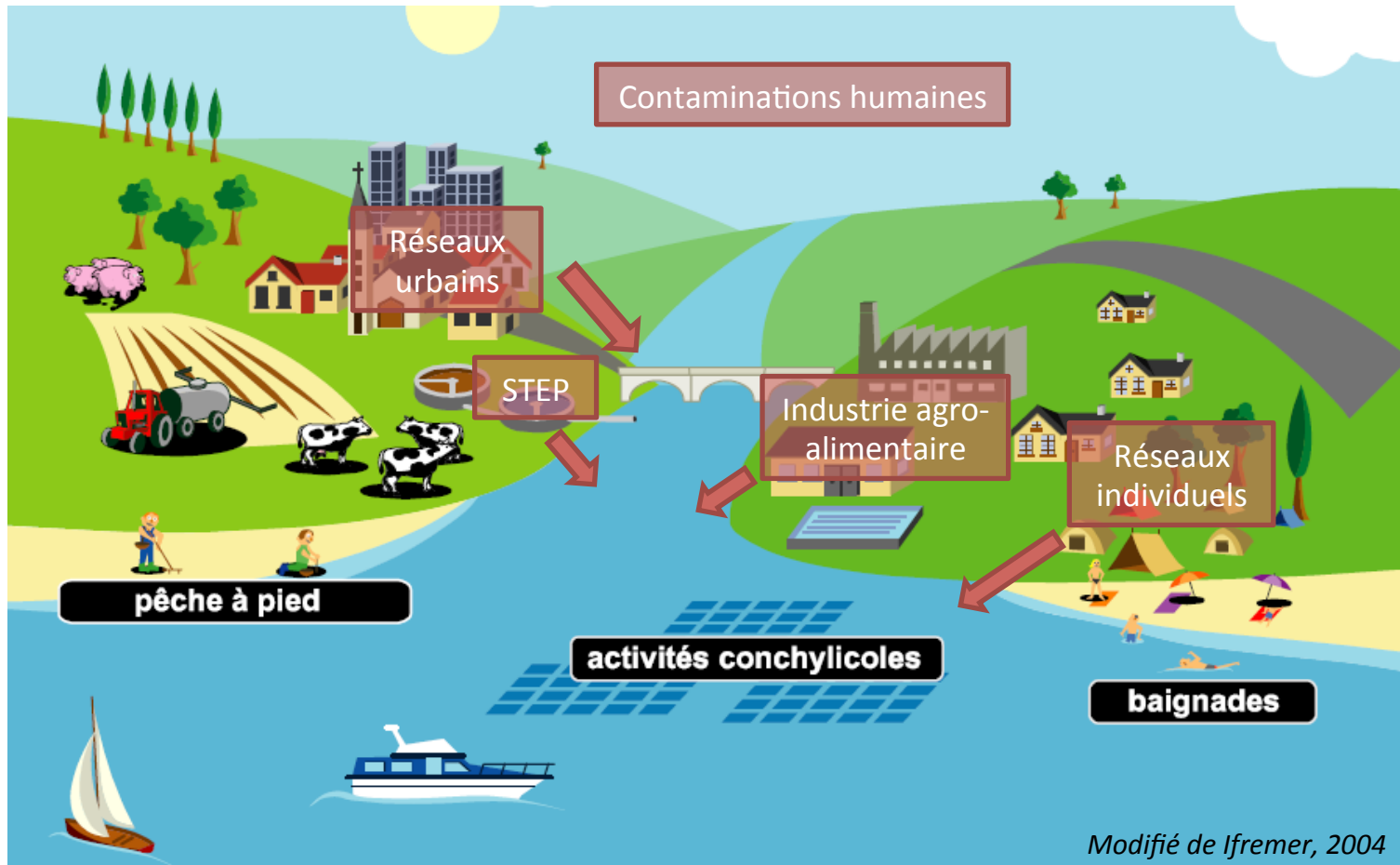
## Biomarqueurs de contamination fécale dans les zones conchylicoles?

*Projet RISKMANCHE-Programme Interreg France (Channel) - England*

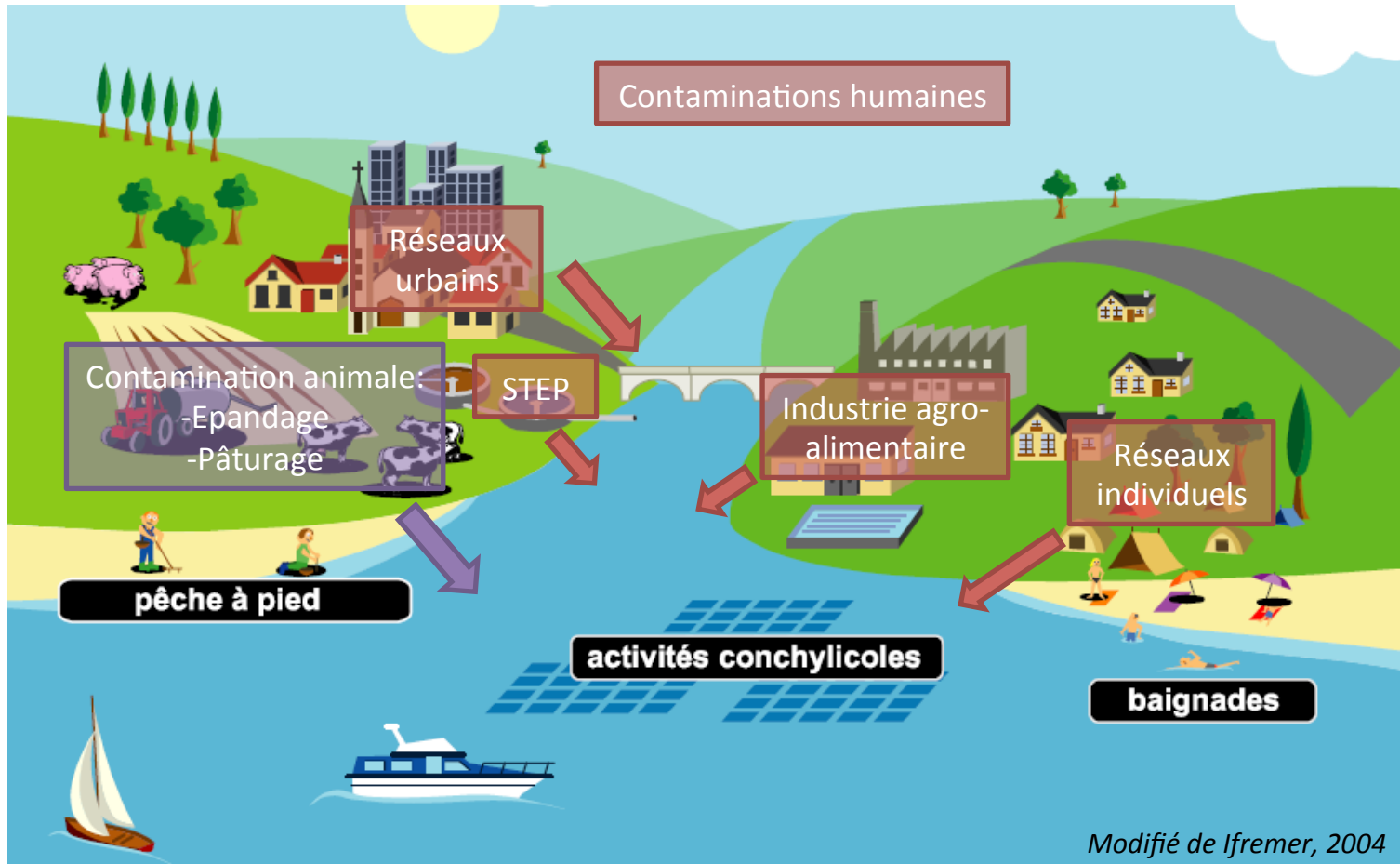
L. Harrault, E. Jardé, L. Jeanneau, P. Petitjean



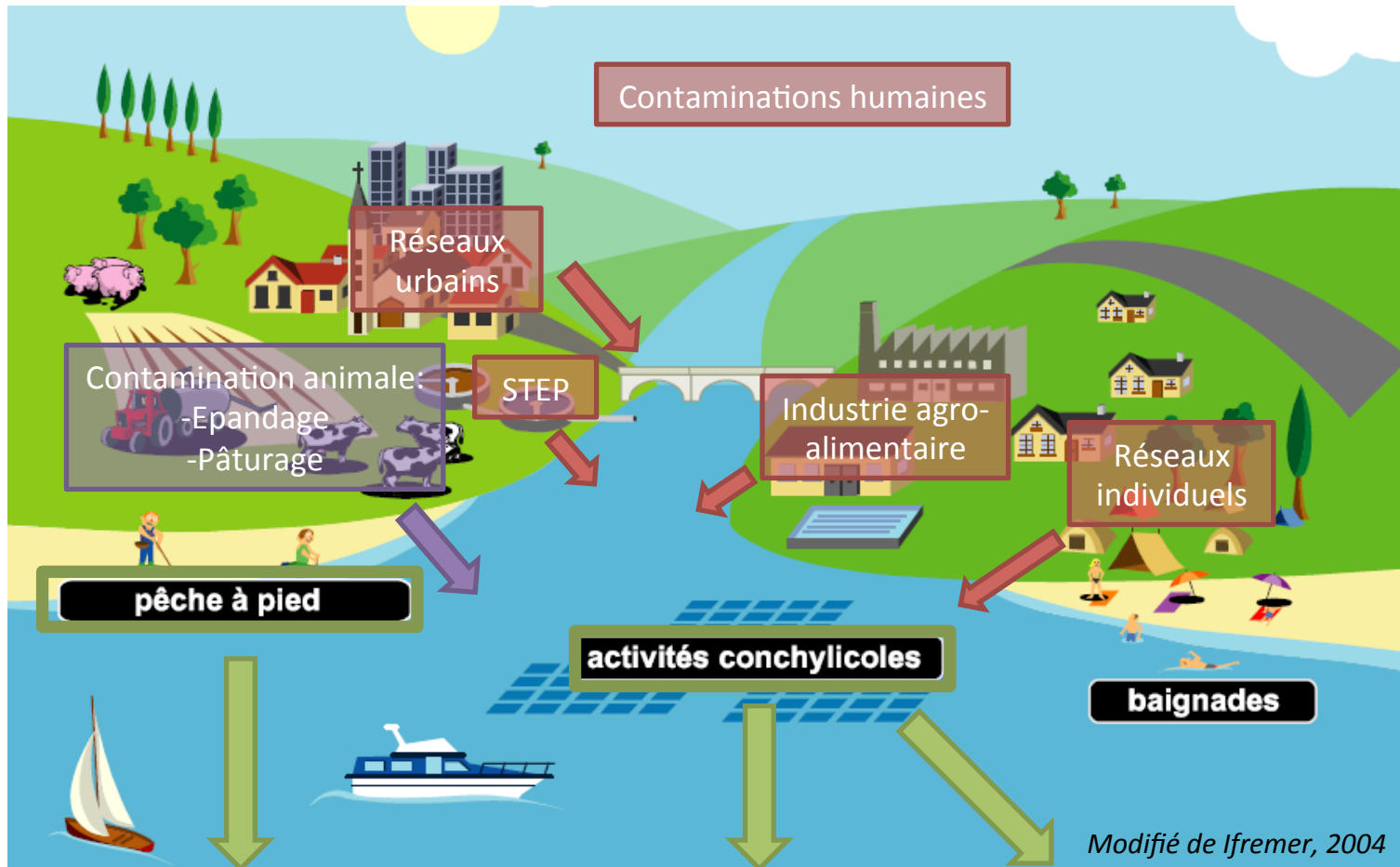
# Sources des contaminations fécales dans une zone littorale



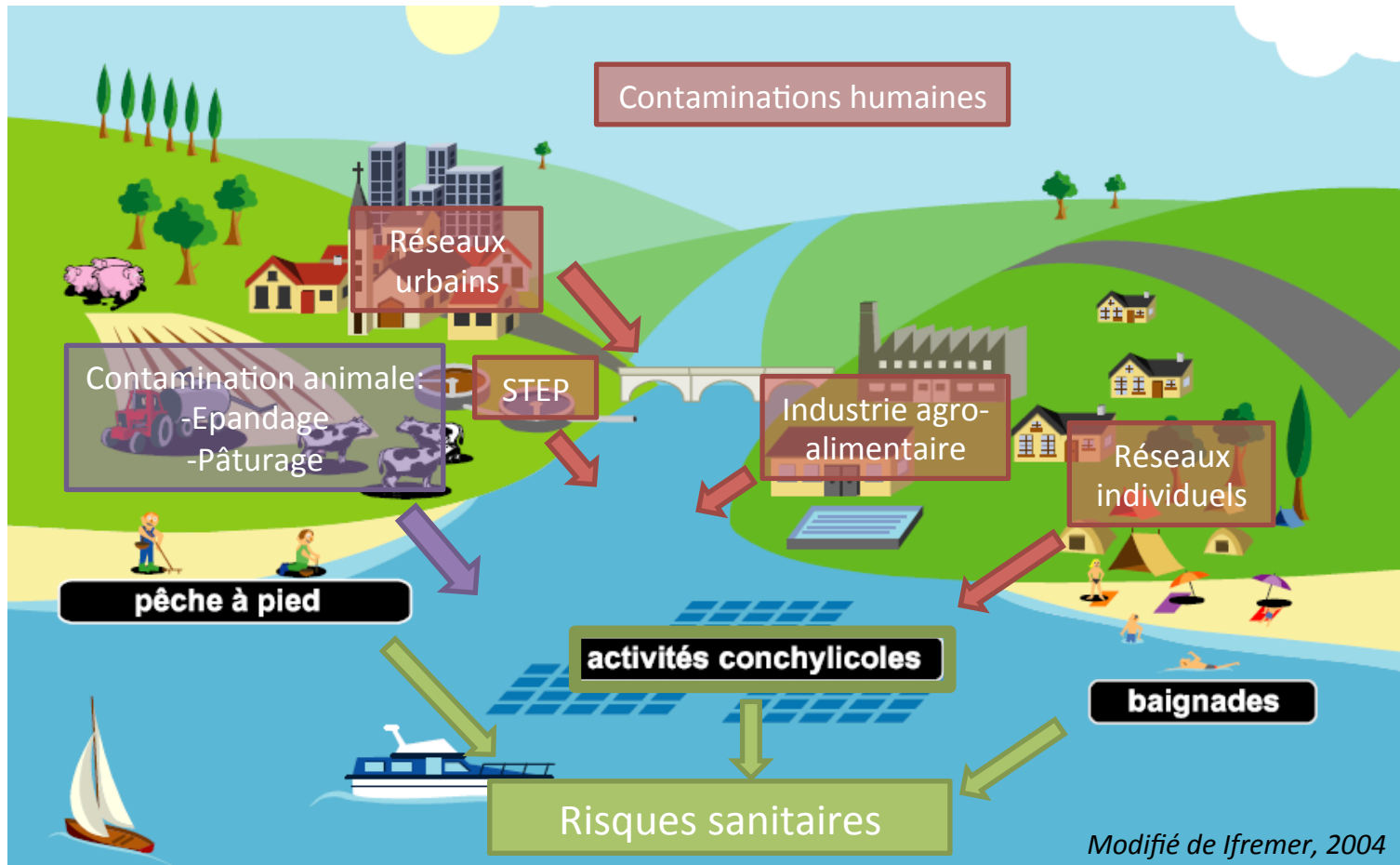
# Sources des contaminations fécales dans une zone littorale



# Sources des contaminations fécales dans une zone littorale



# Sources des contaminations fécales dans une zone littorale



Sources de  
pathogènes fécaux  
(Bactéries, Virus ...)



Fermeture des zones de  
baignade et de  
conchyliculture

# Legislation

European directives:  
Coastal waters, Shellfish

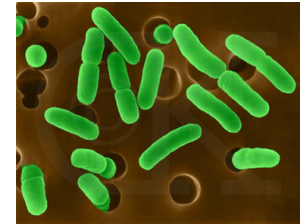
**Classification** and **identification** of fecal contaminations

# Legislation

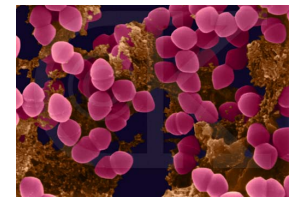
European directives:  
Coastal waters, Shellfish

**Classification** and **identification** of fecal contaminations

Classification:  
Fecal Indicator Bacteria (FIB)  
**No identification**



*Escherichia coli*



Enterococci

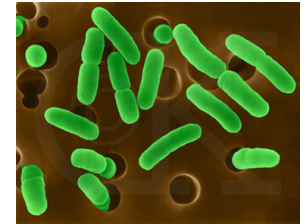
# Legislation

European directives:  
Coastal waters, Shellfish

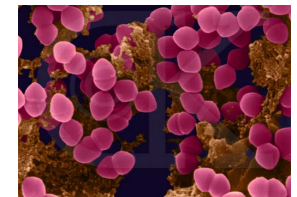
**Classification** and **identification** of fecal contaminations

Classification:  
Fecal Indicator Bacteria (FIB)  
**No identification**

Identification:  
Microbial Source Tracking (MST)  
Combination of **chemical** and **microbiological markers**



*Escherichia coli*



Enterococci



Fecal stanols

Bacteroidales

Ifremer

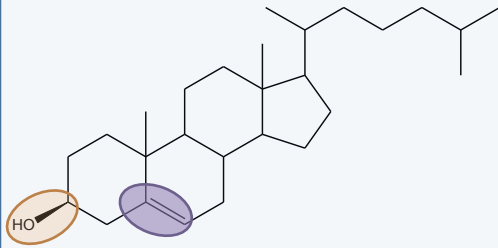


# Chemical markers: Fecal stanols

**Direct chemical markers:** natural occurrence in feces

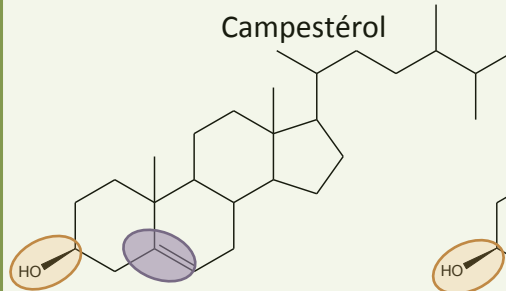
## Zoostérol

### Cholestérol

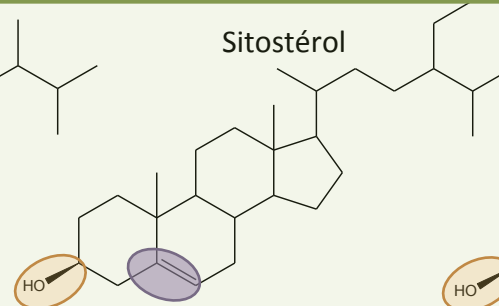


## Phytostérols

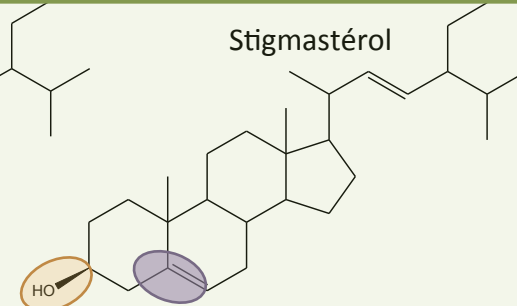
### Campestérol



### Sitostérol

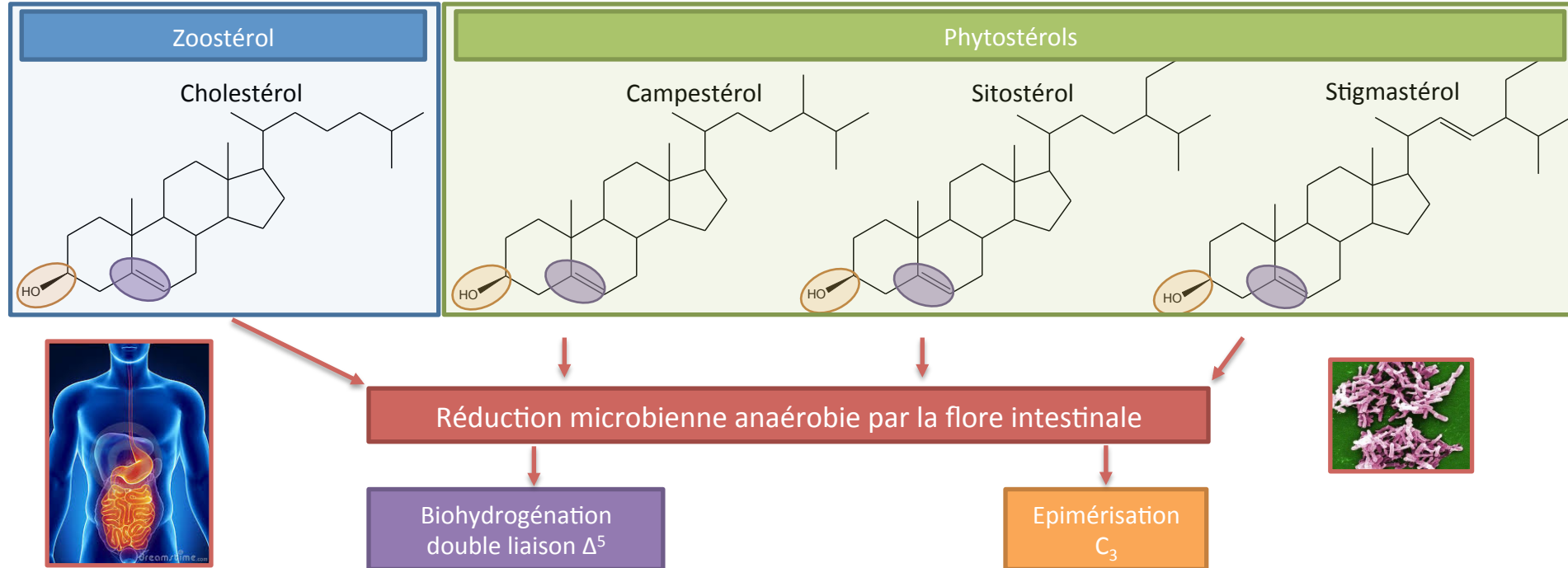


### Stigmastérol



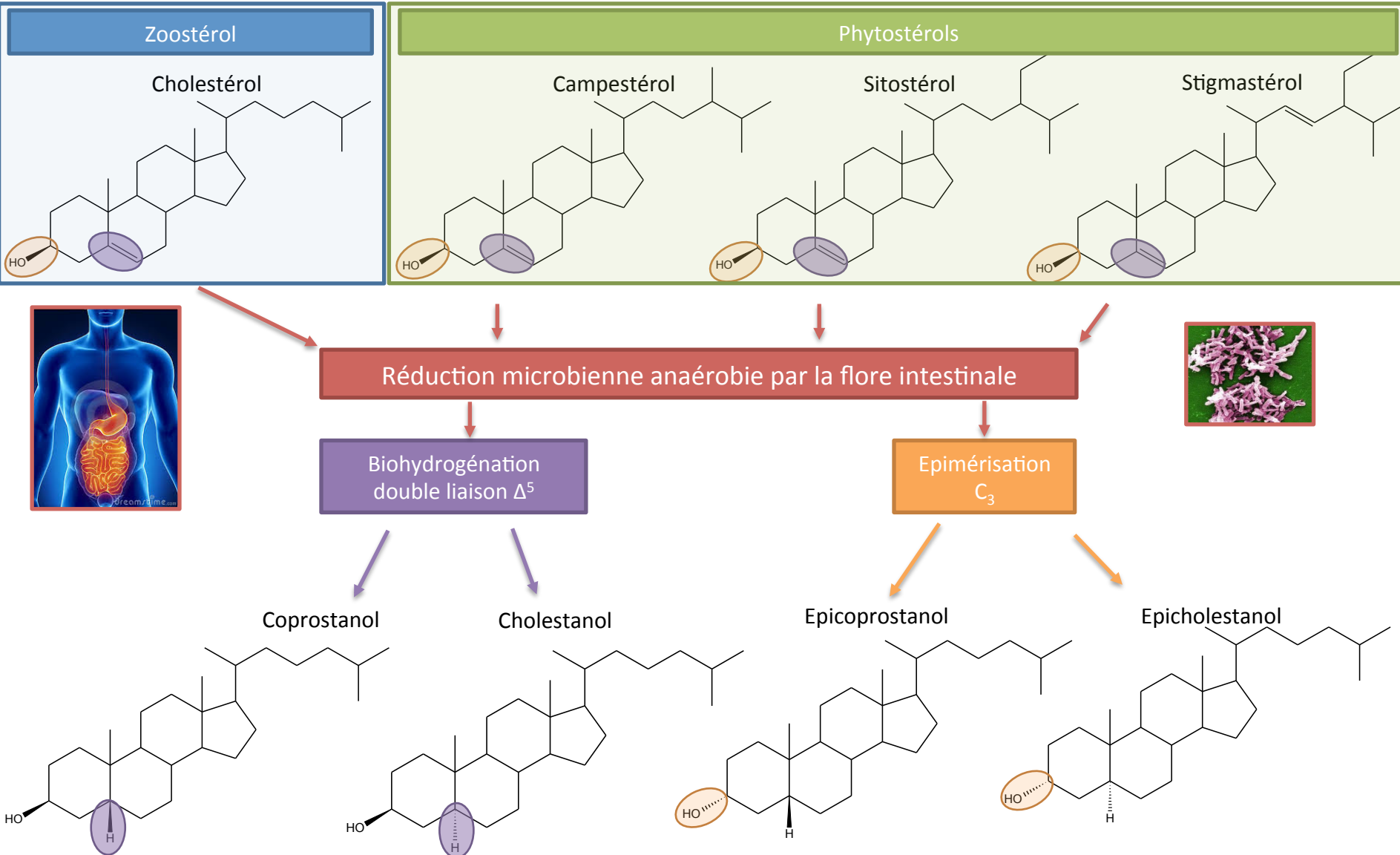
# Chemical markers: Fecal stanols

## Direct chemical markers: natural occurrence in feces



# Chemical markers: Fecal stanols

## Direct chemical markers: natural occurrence in feces



# Chemical markers: Fecal stanols

## Stanol fingerprint

- Diet
- Endogenous biosynthesis
- Intestinal microflora



**1 fingerprint**



Species specific

# Chemical markers: Fecal stanols

## Stanol fingerprint

- Diet
- Endogenous biosynthesis
- Intestinal microflora



**1 fingerprint**



Species specific

## Identification of sources

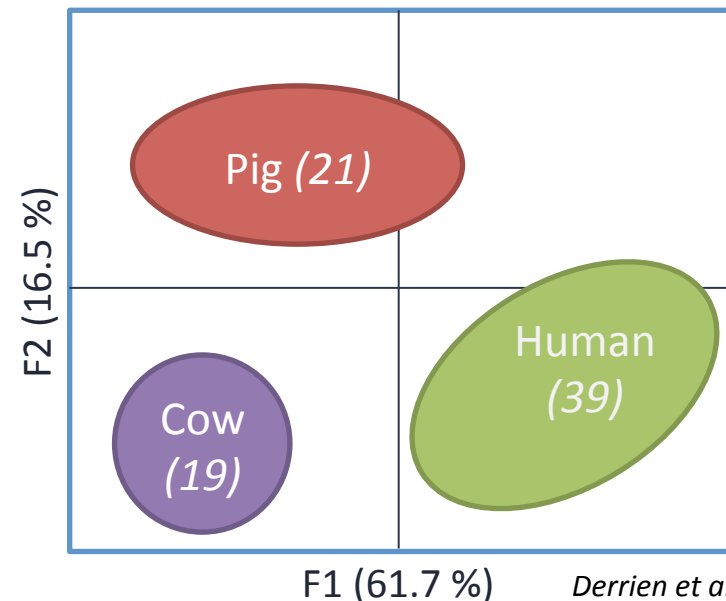
**Fingerprint database (88 feces samples)**



Principal Component Analysis (PCA):  
**6 main stanols**



**Distinction between 3 specific fecal sources**



# Microbial markers: Bacteroidales

- Bactéroïdales: bactéries principalement intestinales

## Identification de marqueurs bactéroïdales:

- Real-time PCR: Clonage/séquençage gènes ARN 16S (bactéries) d'échantillons ayant des sources spécifiques = base de données
- Identification de séquences (primers/sondes) source-spécifiques




# Microbial markers: Bacteroidales

- Bactéroïdales: bactéries principalement intestinales

## Identification de marqueurs bactéroïdales:

- Real-time PCR: Clonage/séquençage gènes ARN 16S (bactéries) d'échantillons ayant des sources spécifiques = base de données
- Identification de séquences (primers/sondes) source-spécifiques

## Marqueurs bactéroïdales utilisés:

Source	Markers	Sensitivity (n)	Specificity (n)
	HF183	<b>76</b> (41)	100 (99)
	Pig-2-Bac	100 (69)	99 (81)
	Rum-2-Bac	93 (44)	<b>89</b> (57)

*Mieskin et al. 2009; Gourmelon, données personnelles*




# Microbial markers: Bacteroidales

- Bactéroïdales: bactéries principalement intestinales

## Identification de marqueurs bactéroïdales:

- Real-time PCR: Clonage/séquençage gènes ARN 16S (bactéries) d'échantillons ayant des sources spécifiques = base de données
- Identification de séquences (primers/sondes) source-spécifiques

## Marqueurs bactéroïdales utilisés:

Source	Markers	Sensitivity (n)	Specificity (n)
	HF183	<b>76</b> (41)	100 (99)
	Pig-2-Bac	100 (69)	99 (81)
	Rum-2-Bac	93 (44)	<b>89</b> (57)

*Mieskin et al. 2009; Gourmelon, données personnelles*

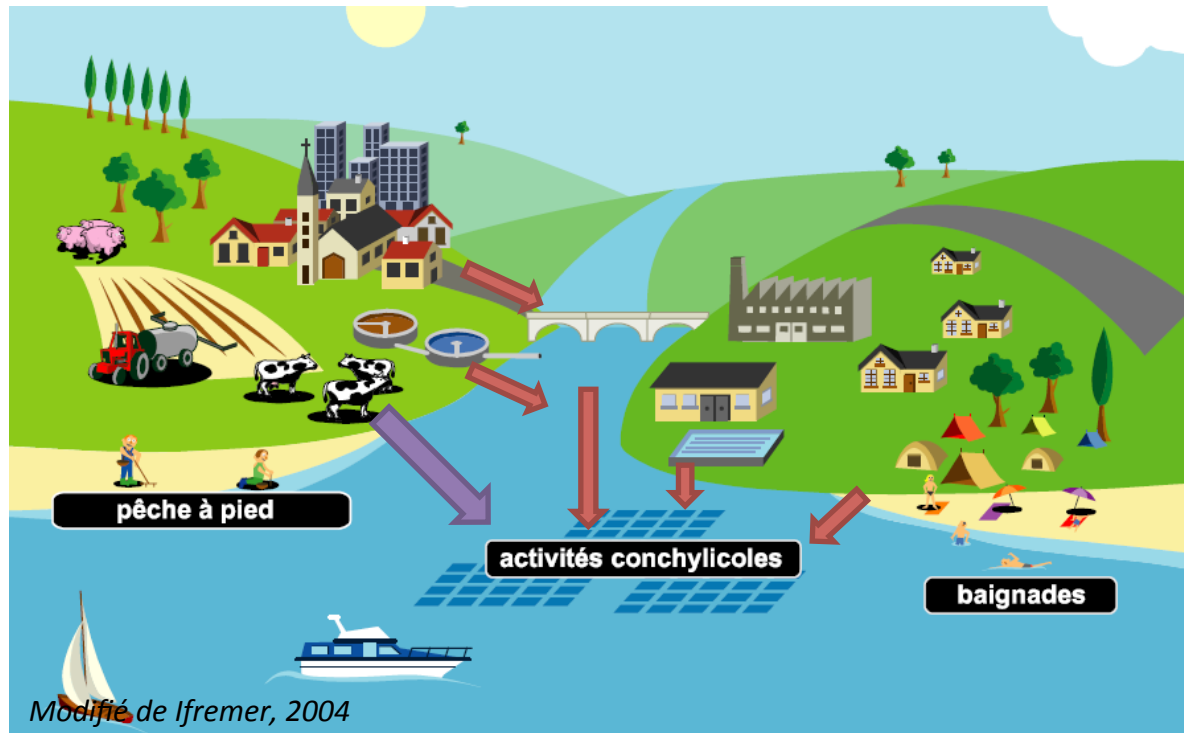
Marqueurs pas parfaitement spécifiques



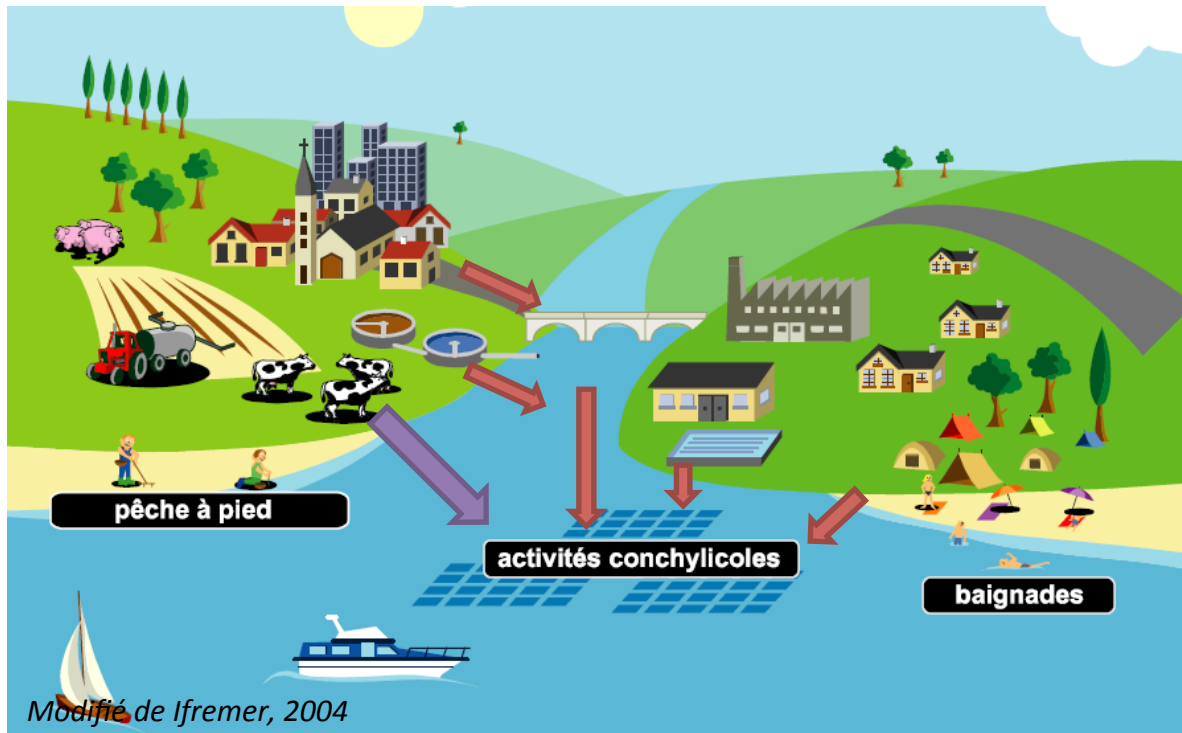
Couplage stanols fécaux



# Bioaccumulation des stanols par les coquillages ?

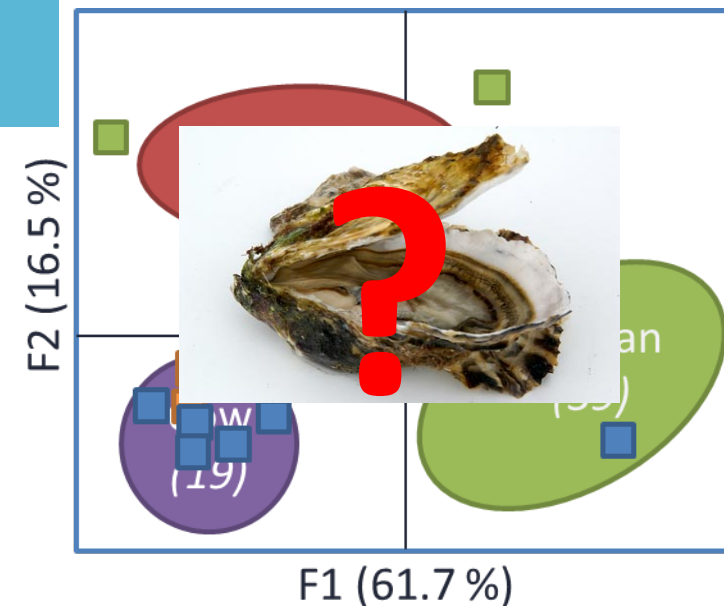


# Bioaccumulation des stanols par les coquillages ?



Identification sources de contaminations fécales dans les coquillages:

**Utilité empreintes stanols et bactéroïdales comme boîte à outil?**



# Objectifs

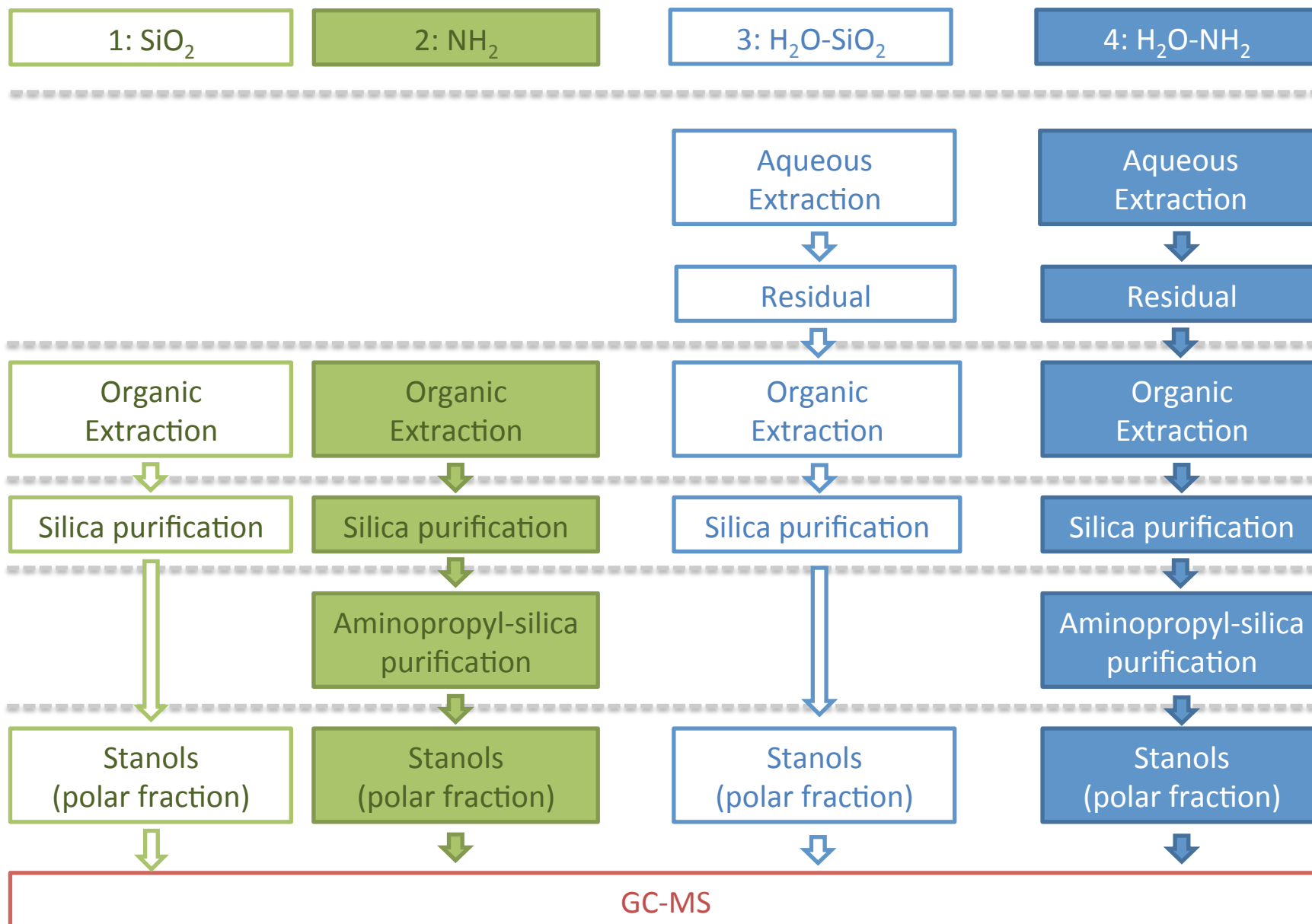
## ***Développement:***

- Laboratoire: Comparaison de différentes méthodes d'extraction et de purification des stanols fécaux de coquillages

## ***Application:***

- Ecosystème: étude de cas sur le bassin versant de la Fresnaye

## Analyse des stanols des coquillages

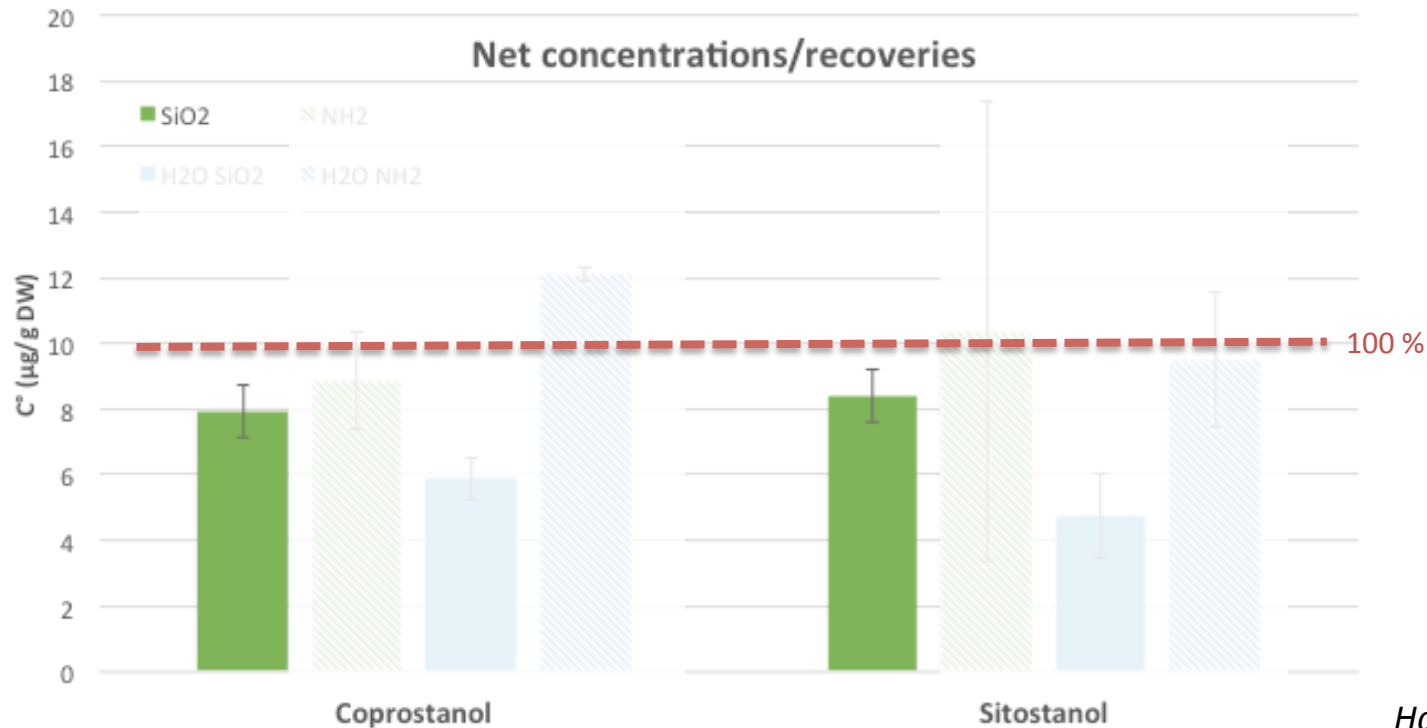


# Analyse des stanols des coquillages

## Polar fraction: net concentrations/recoveries



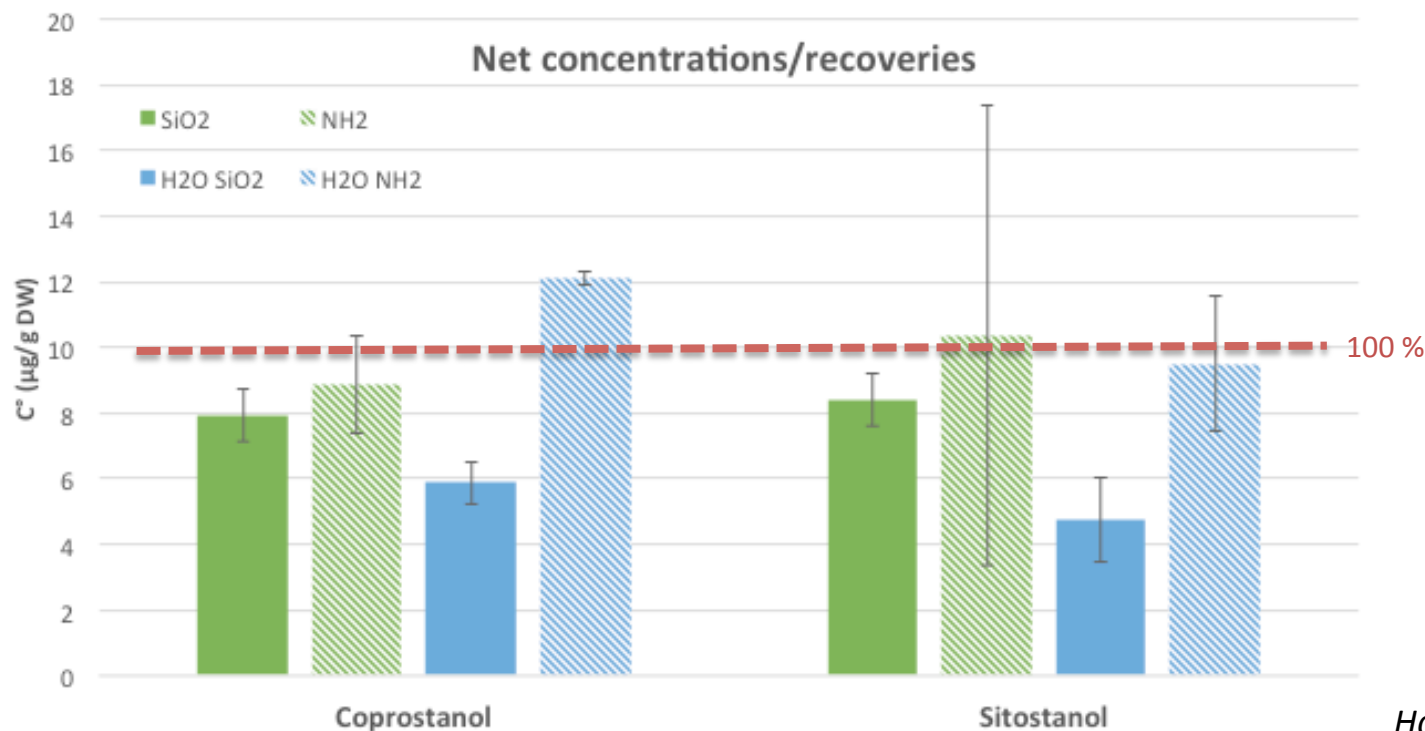
1: SiO<sub>2</sub>



- Bons recouvrements (80%)
- Recouvrements similaires pour les deux standards utilisés
- Bonnes répétabilités
- Répétabilités similaires pour les deux standards utilisés

# Analyse des stanols des coquillages

## Polar fraction: net concentrations/recoveries

1: SiO<sub>2</sub>2: NH<sub>2</sub>3: H<sub>2</sub>O-SiO<sub>2</sub>4: H<sub>2</sub>O-NH<sub>2</sub>

*Harrault et al., 2014*

Méthode SiO<sub>2</sub>

Méthode appliquée aux échantillons naturels

# Objectifs

## *Développement:*

- Laboratoire: Comparaison de différentes méthodes d'extraction et de purification des stanols fécaux

## ***Application:***

- Ecosystème: étude de cas sur le bassin versant de la Fresnaye

## Bassin versant de la Fresnaye (22):

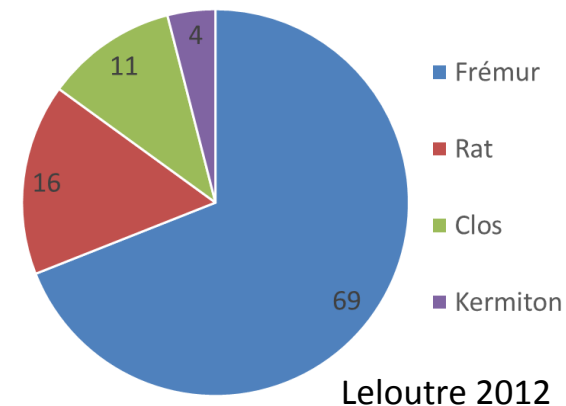
### Données générales (SRG 2011):

- Surface: 121 km<sup>2</sup>
- Population: 14 000 habitants



### Réseau hydrographique: 4 ruisseaux principaux

Contribution surface sous-bassins (%)

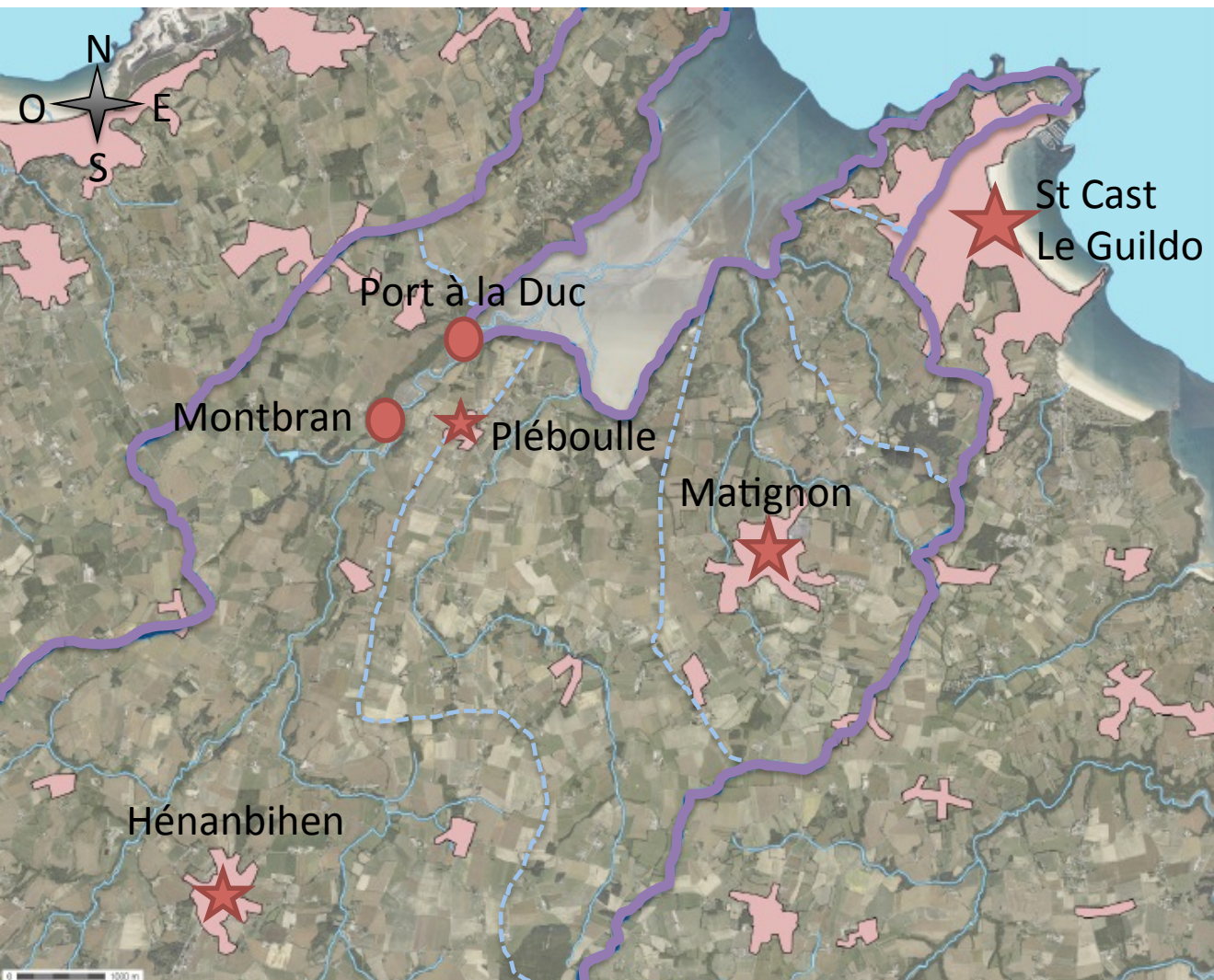


### Production annuelle conchylicole (CRC 2011):

- Huîtres: 550 t
- Moules: 2192 t
- Coques (récréation)



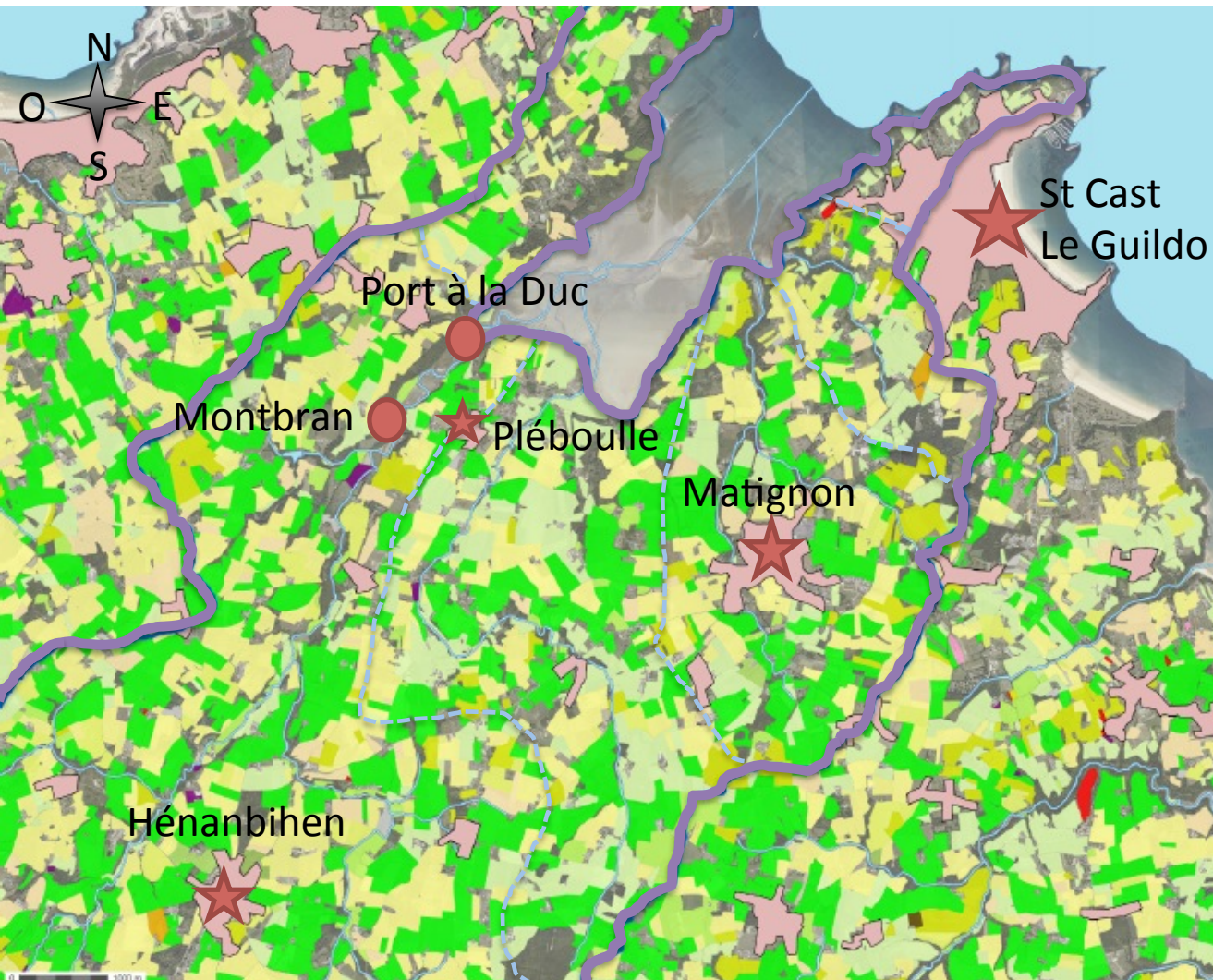
## Occupation des sols et sources de contaminations fécales:



### Humaine:

- ★ STEP (> 400 éq. hab.)
- Principaux rejets non raccordés aux réseaux de traitement
- + multiples rejets

## Occupation des sols et sources de contaminations fécales:



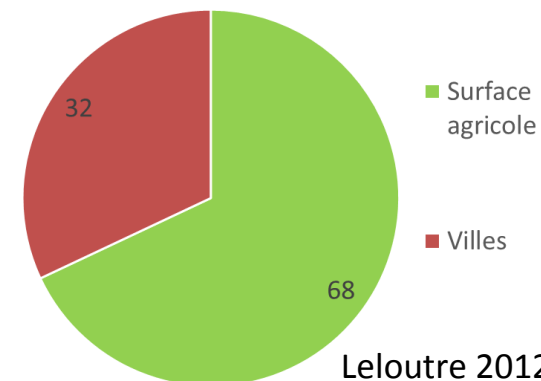
### Humaine:

- ★ STEP (> 400 éq. hab.)
- Principaux rejets non raccordés aux réseaux de traitement
- + multiples rejets

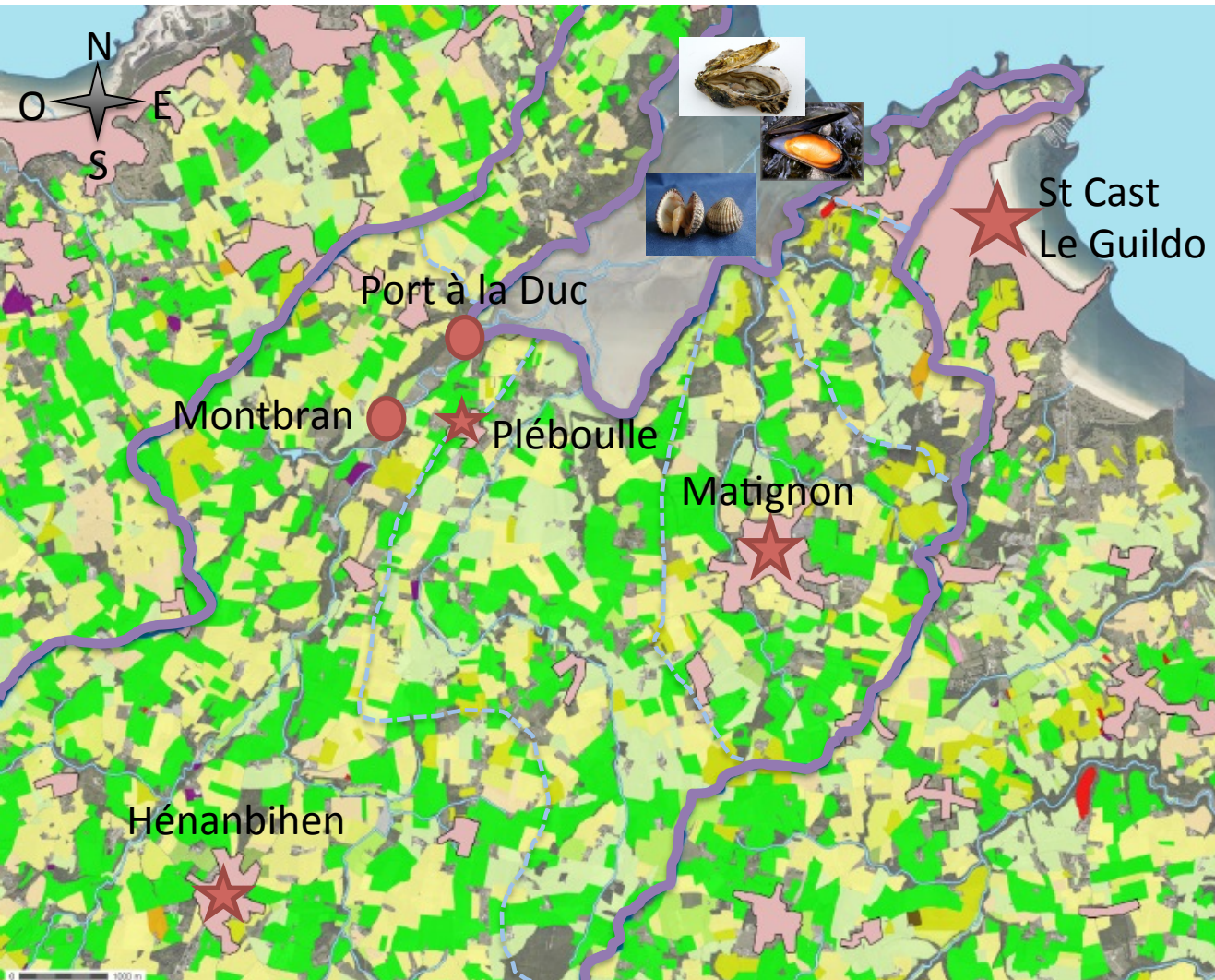
### Agricole:

- Elevages porcins et bovins
- Cultures (épandages lisiers)
- Pâturages

Occupation surface bassin versant (%)



# Transfert de contamination: bassin versant - baie - coquillages:



## Transfert de contamination: bassin versant - baie - coquillages:

Zone sensible



Multiples sources de contamination fécale



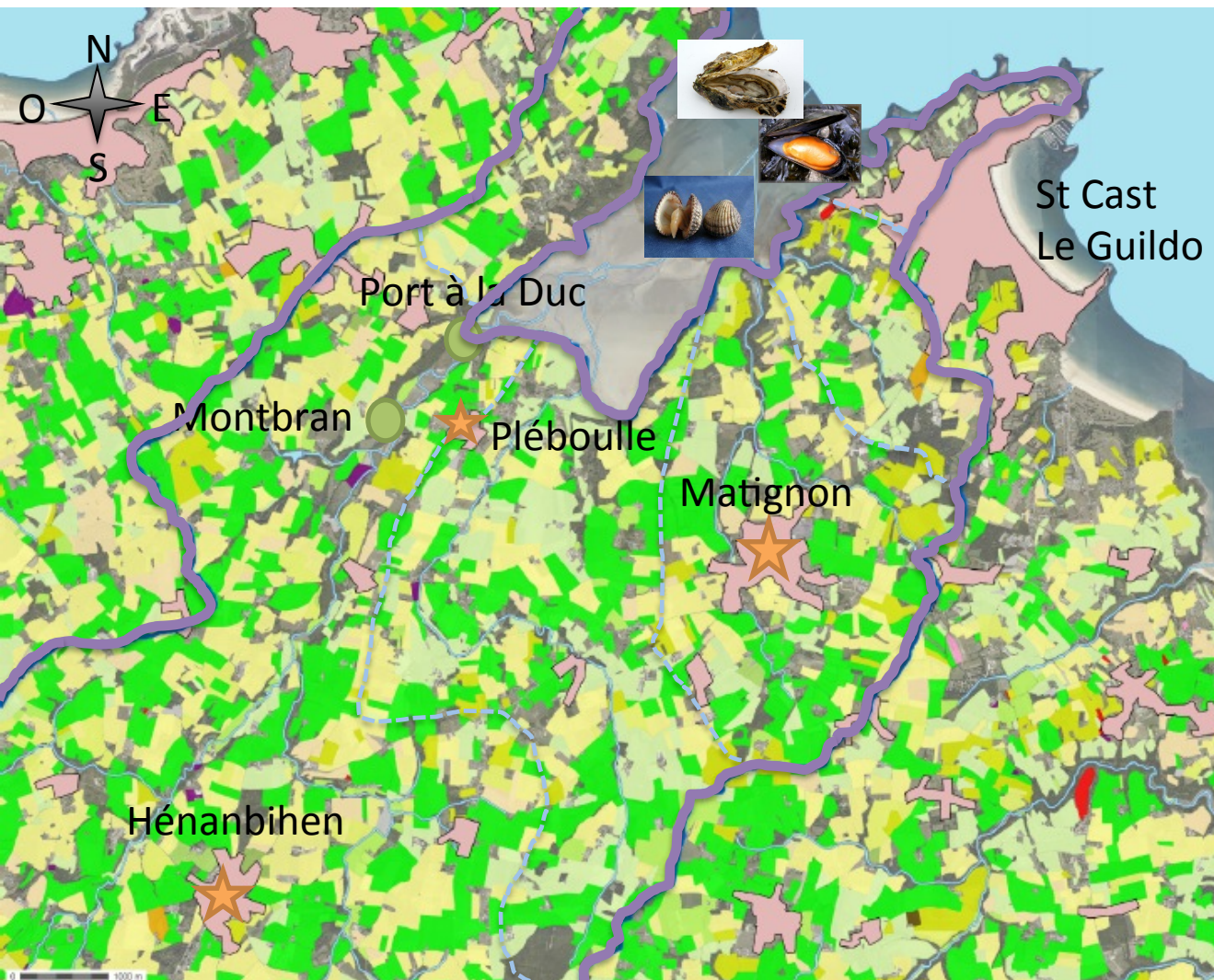
Dégradation de la qualité microbiologique des coquillages



Coquillages classés B régulièrement (*E.coli*)



Risques sanitaires et pertes économiques



# Transfert de contamination: bassin versant - baie - coquillages:

Zone sensible



Multiples sources de contamination fécale



Dégradation de la qualité microbiologique des coquillages



Coquillages classés B régulièrement (*E.coli*)



Risques sanitaires et pertes économiques

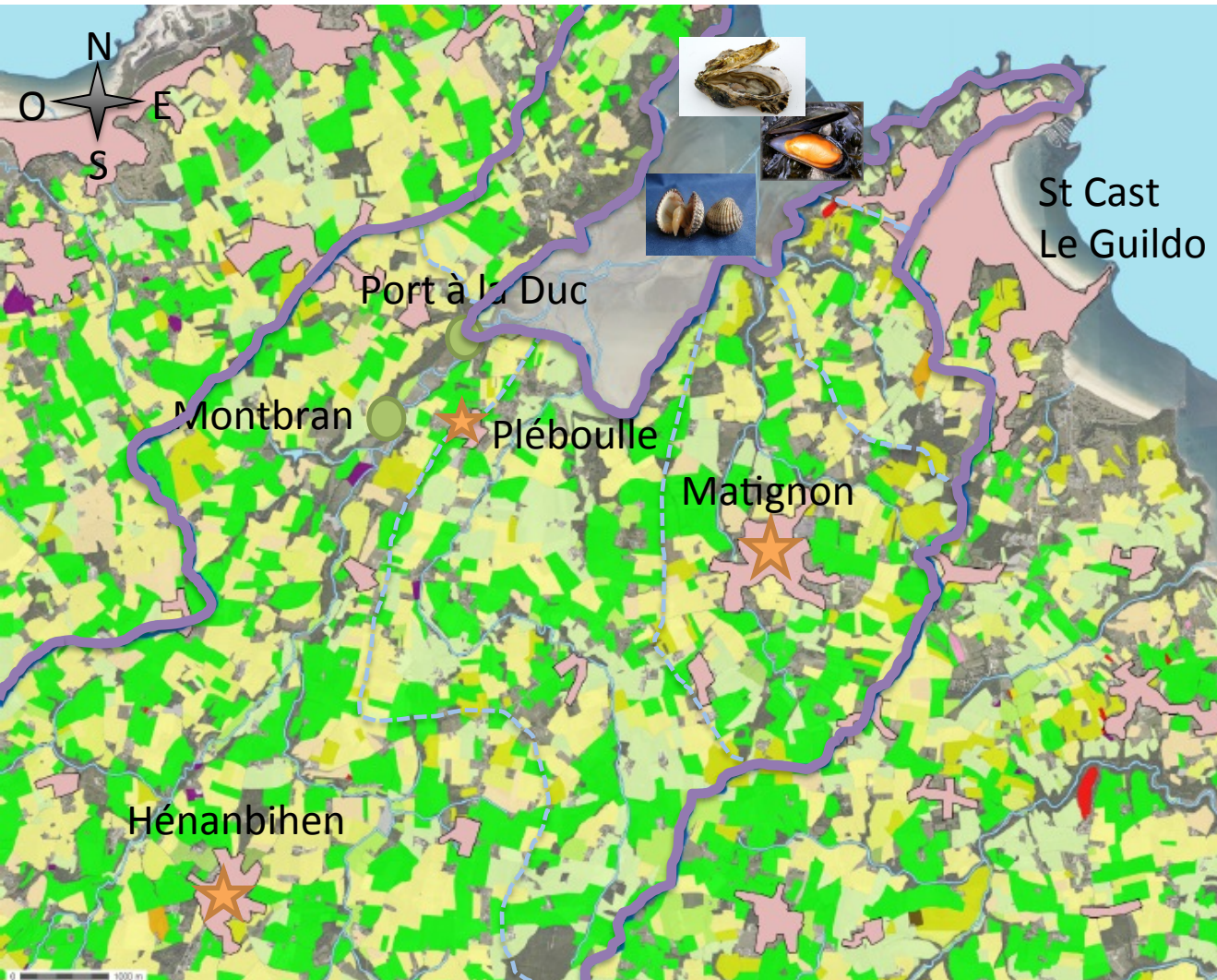
Identification des sources



Amélioration gestion BV



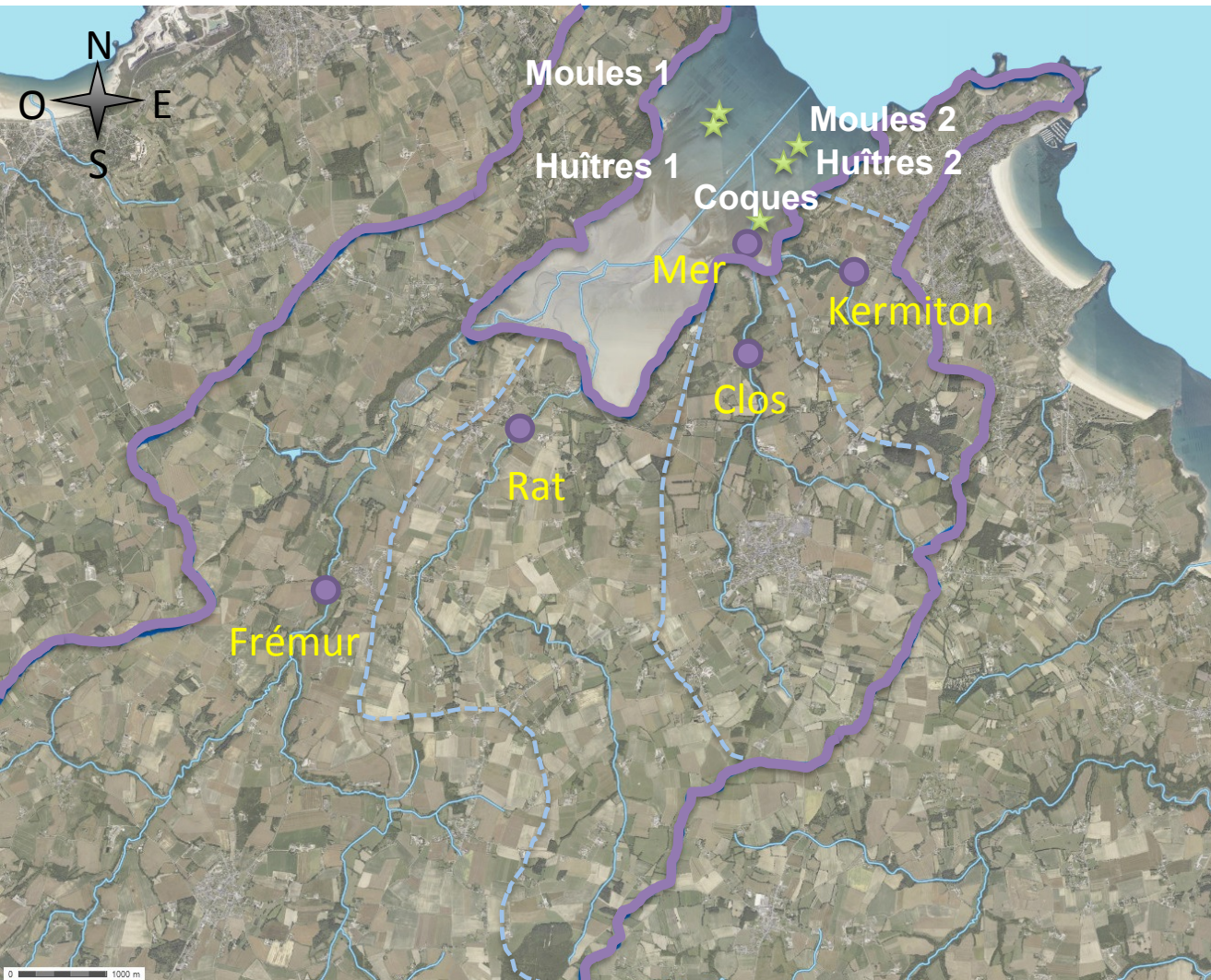
Diminution des risques



## Méthodologie:

Suivis mensuels de Février 2013 à Février 2015:

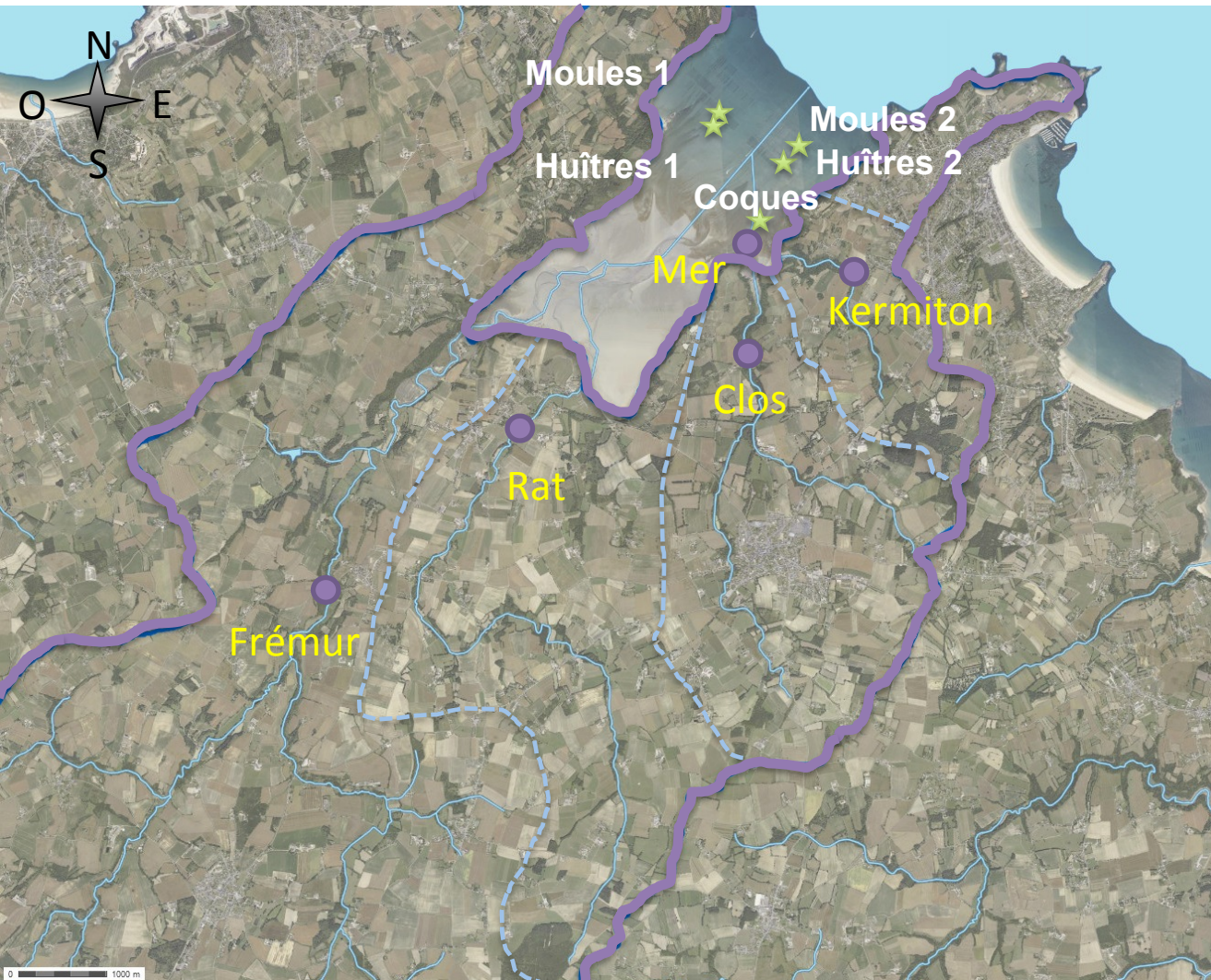
- Eaux : Frémur, Rat, Clos, Kermiton, Mer
- Coquillages: Huîtres (x 2), Moules (x 2) et Coques



## Méthodologie:

Suivis mensuels de Février 2013 à Février 2015:

- Eaux : Frémur, Rat, Clos, Kermiton, Mer
- Coquillages: Huîtres (x 2), Moules (x 2) et Coques



### Analyses/mesures:



- Physico/chimiques (T°, pH, O<sub>2</sub>, C<sub>25</sub>, DOC, SUVA...)
- **Stanols fécaux**

### **Ifremer**

- **FIB (*E. coli*)**
- Marqueurs microbiologiques dont **Bactéroïdales**
- **Données présentées: Fév. – Déc. 2013**

- Eaux: *E. coli*

< 500 Ec/100ml

< 1000 Ec/100ml

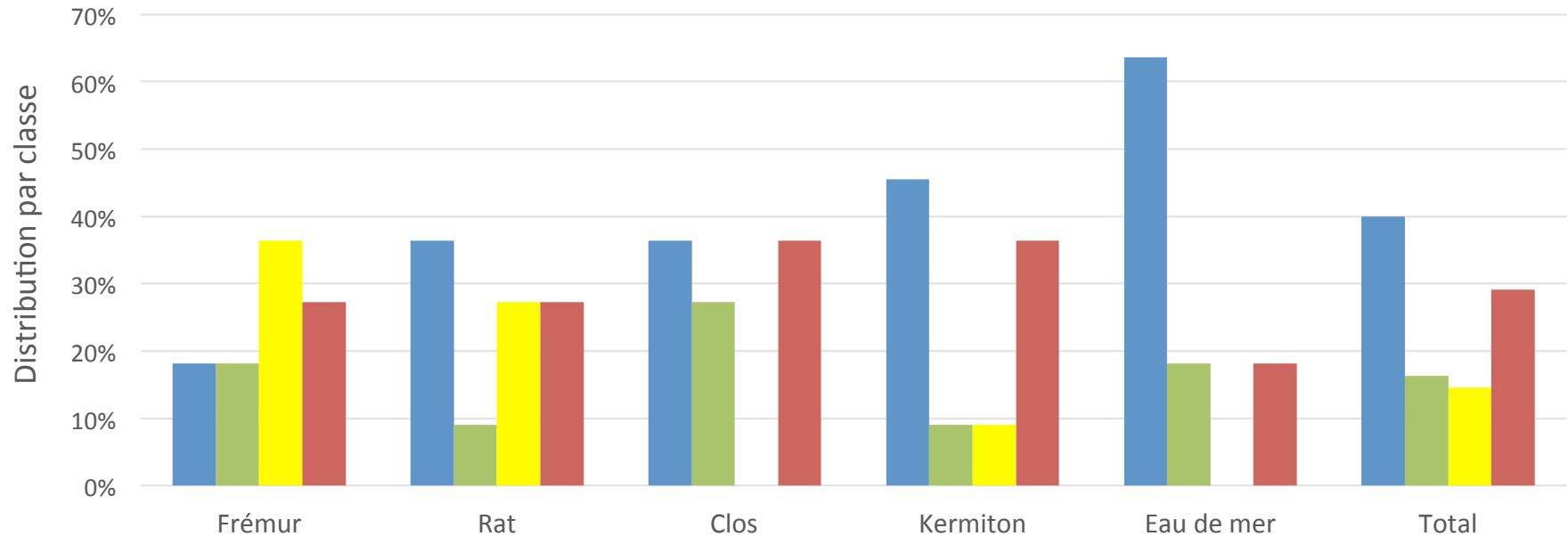
< 2 000 Ec/100ml

> 2 000 Ec/100ml



- Eaux: *E. coli*

*Microbial quality of water by class of quality*



< 500 Ec/100ml



**40% of samples: mainly Seawater (Feb., May, Dec.)**

< 1000 Ec/100ml



16% of samples: mainly Le Clos

< 2000 Ec/100ml



15% of samples: mainly Frémur/Le Clos

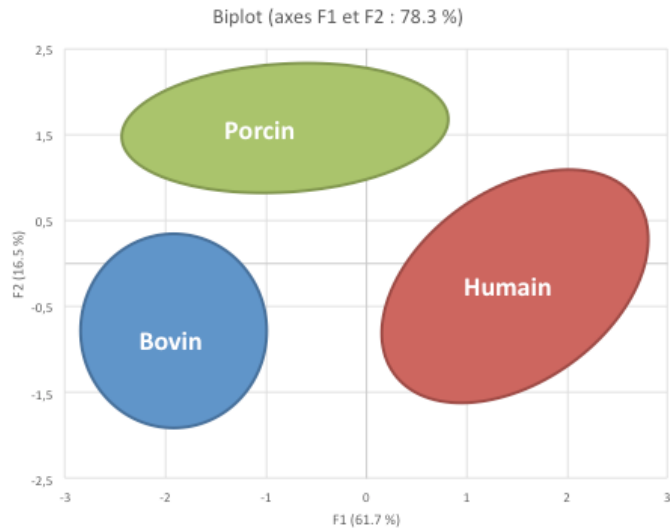
> 2000 Ec/100ml



**29% of samples: mainly Le Clos/Kermiton (Mar., Jul, Aug., Nov.)**

- Eaux: stanols et bactéroïdales

## Empreinte stanol: source majoritaire/mixte



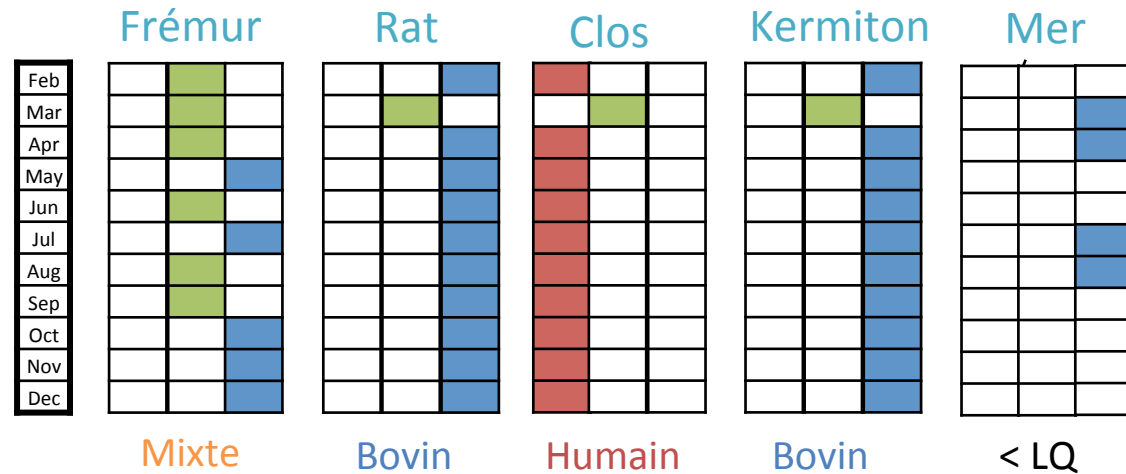
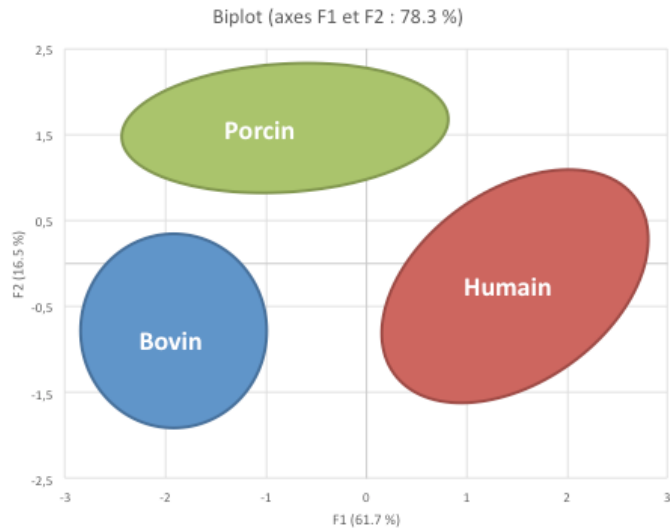
Feb
Mar
Apr
May
Jun
Jul
Aug
Sep
Oct
Nov
Dec

Frémur


Mixte

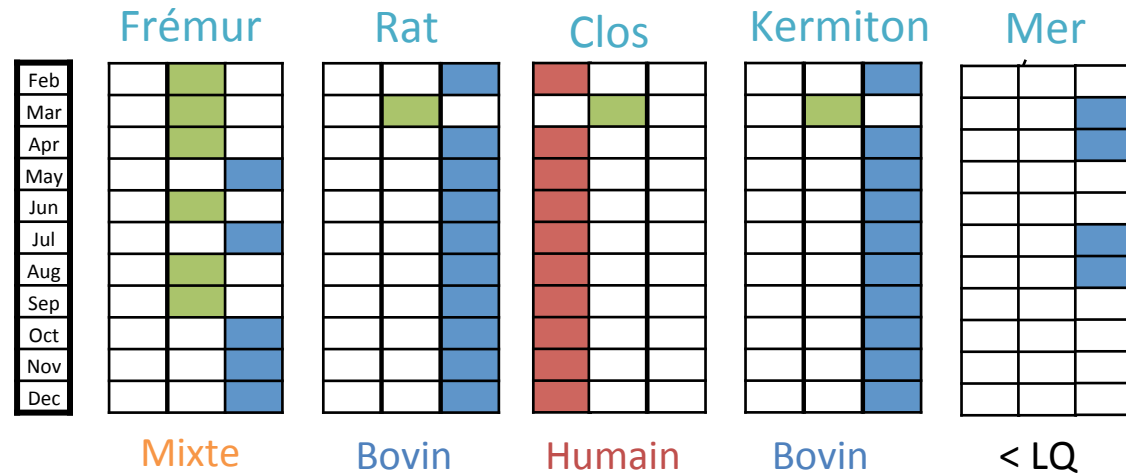
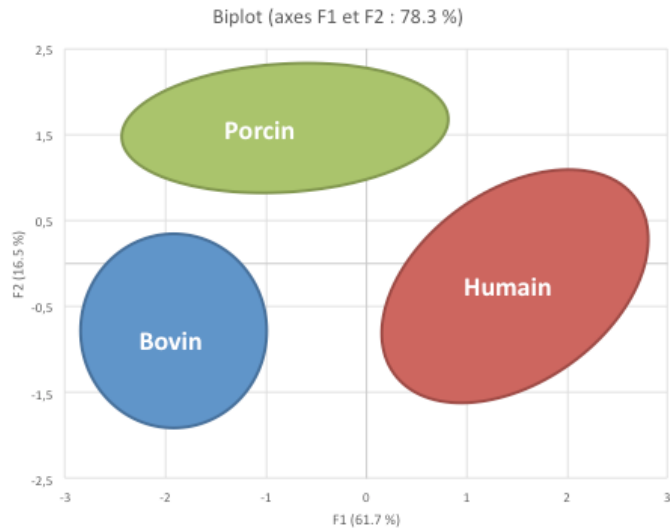
- Eaux: stanols et bactéroïdales

## Empreinte stanol: source majoritaire/mixte

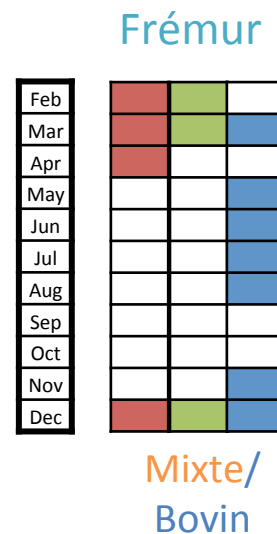


- Eaux: stanols et bactéroïdales

## Empreinte stanol: source majoritaire/mixte

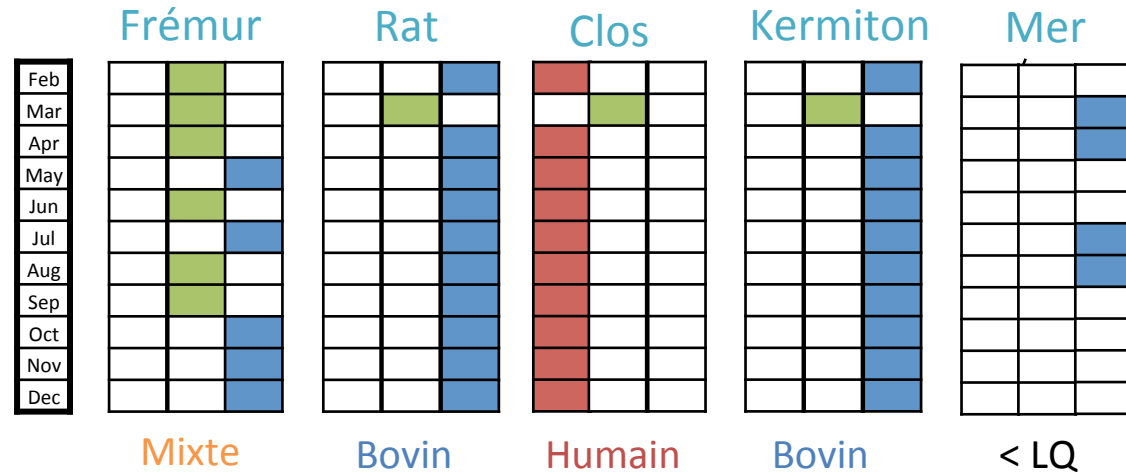
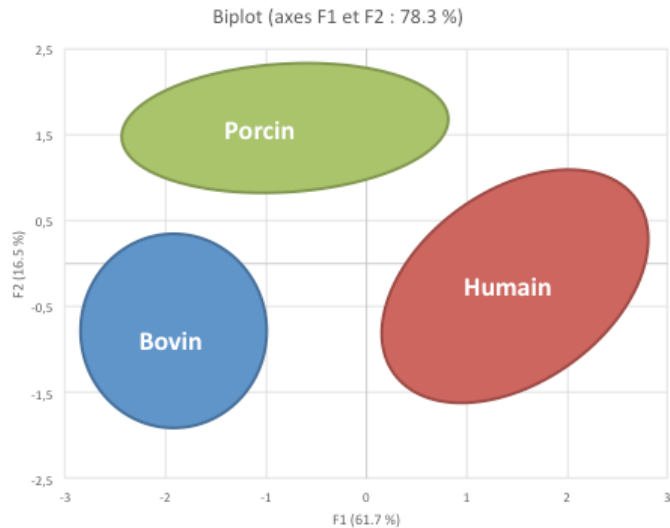


## Bactéroïdales: présence/ absence marqueur

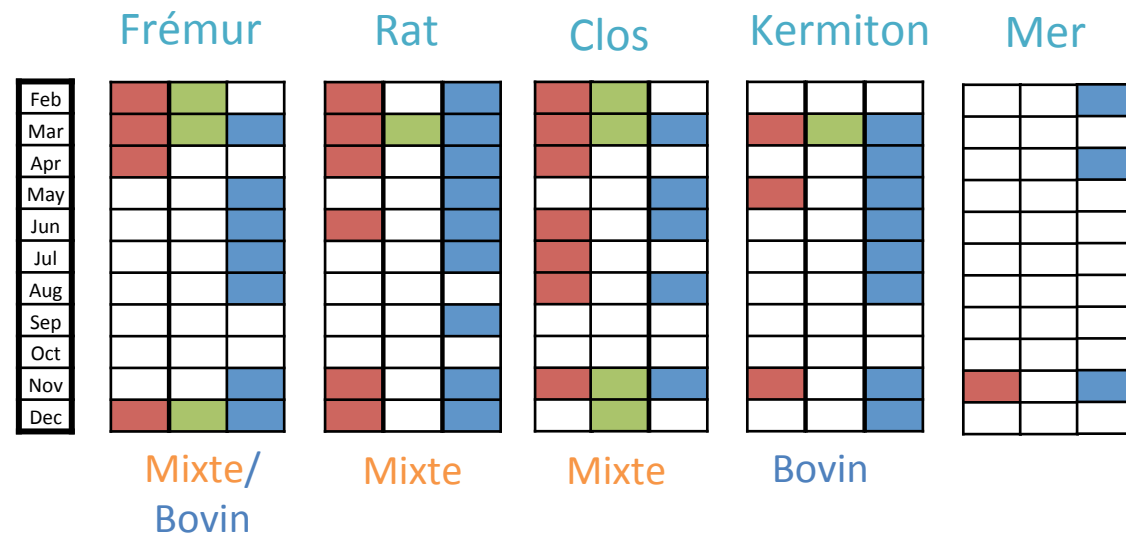


- Eaux: stanols et bactéroïdales

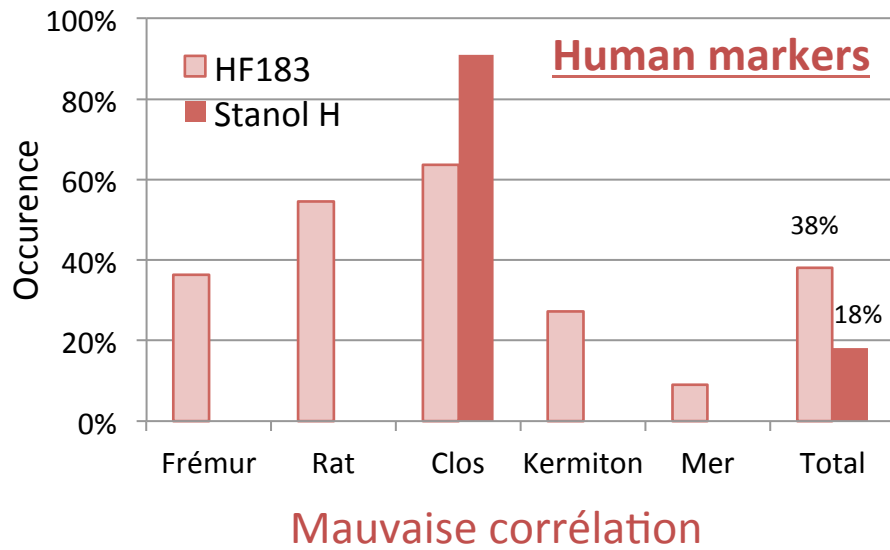
### Empreinte stanol: source majoritaire/mixte



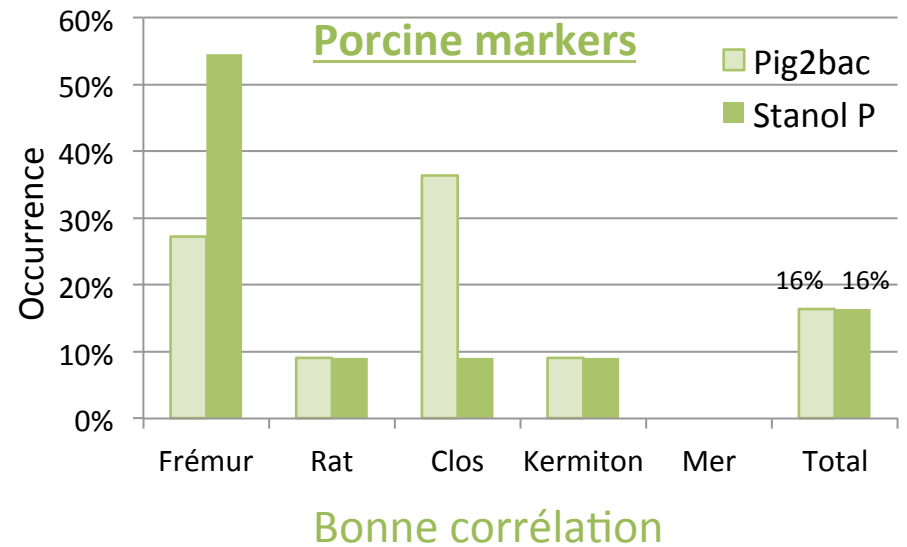
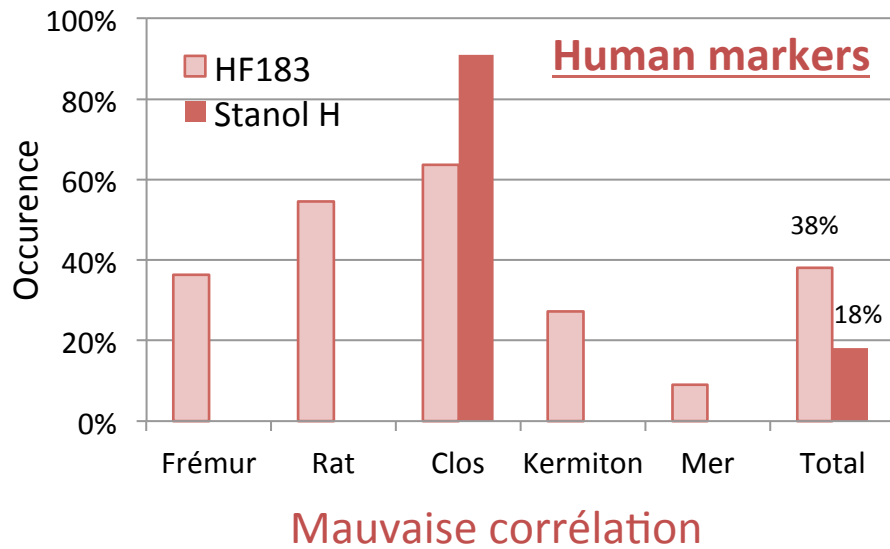
### Bactéroïdales: présence/absence marqueur



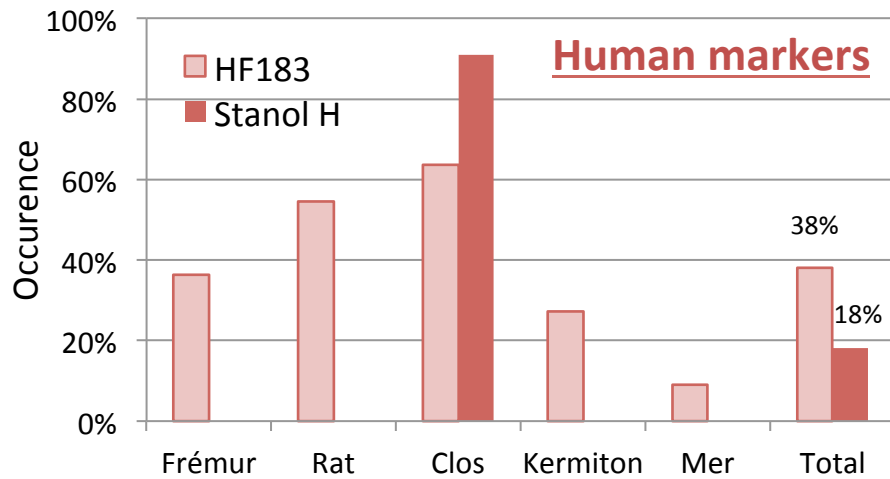
- Eaux: *comparaison marqueurs*



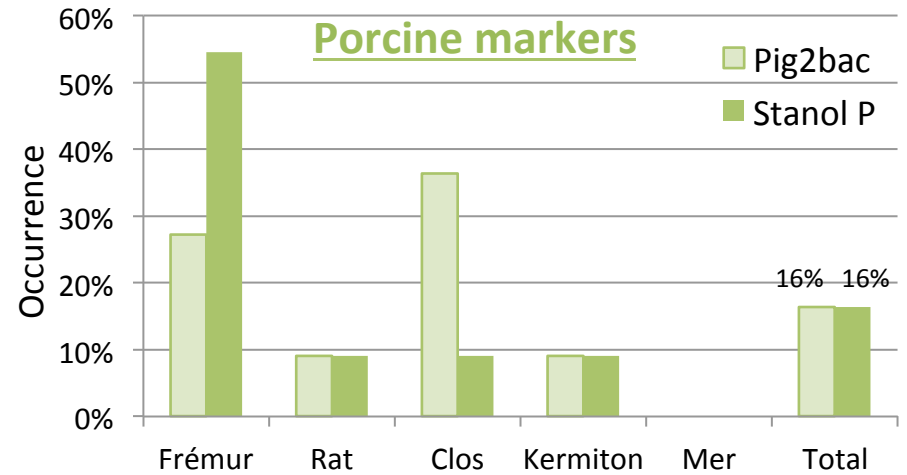
- Eaux: comparaison marqueurs



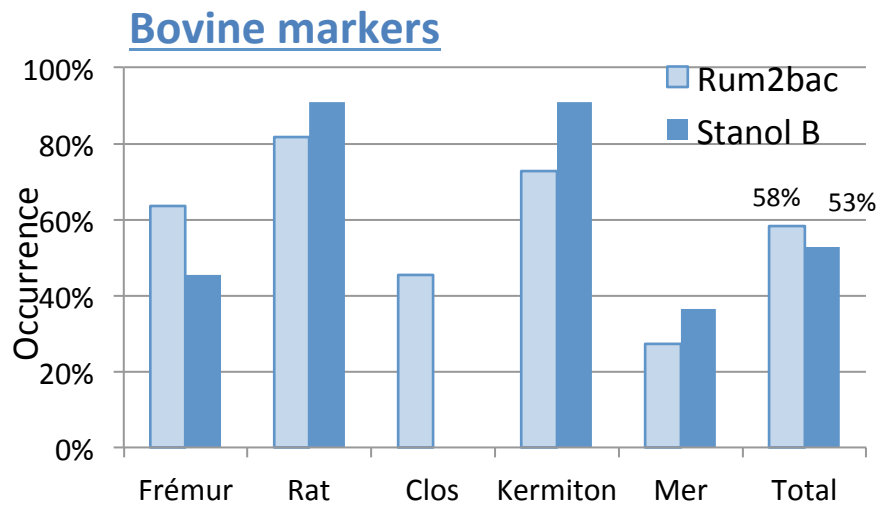
- Eaux: comparaison marqueurs



Mauvaise corrélation



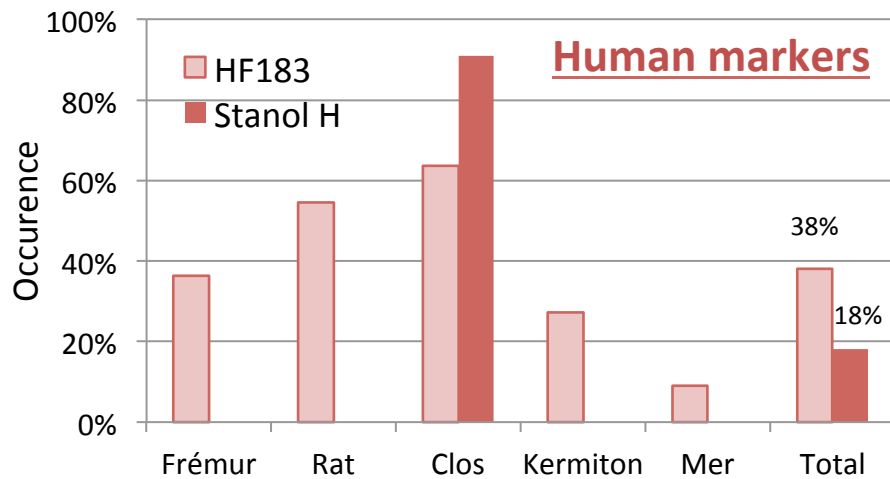
Bonne corrélation



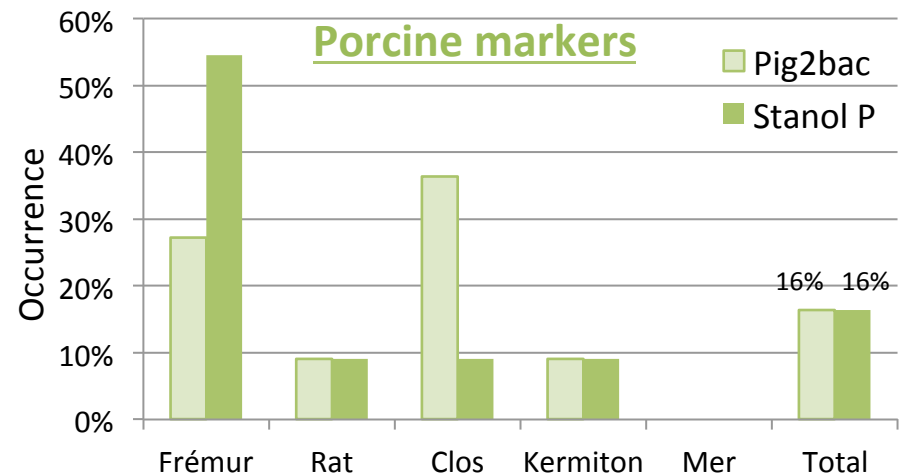
Bonne corrélation



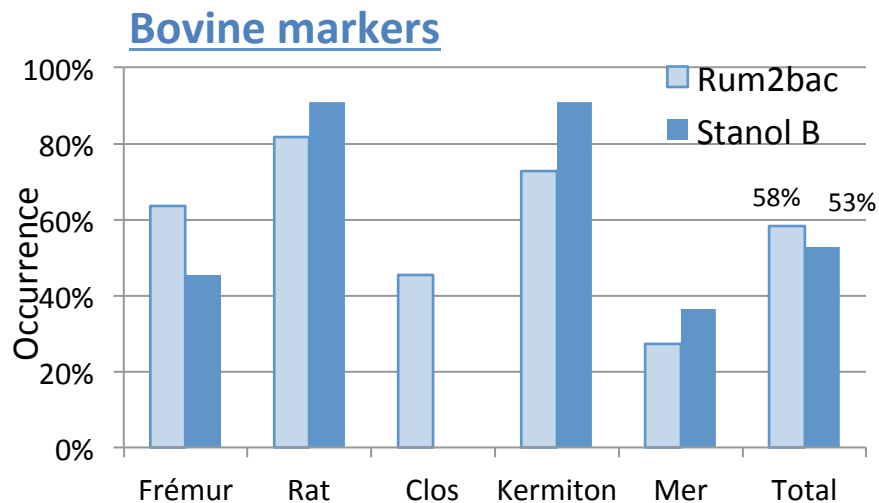
- Eaux: comparaison marqueurs



Mauvaise corrélation



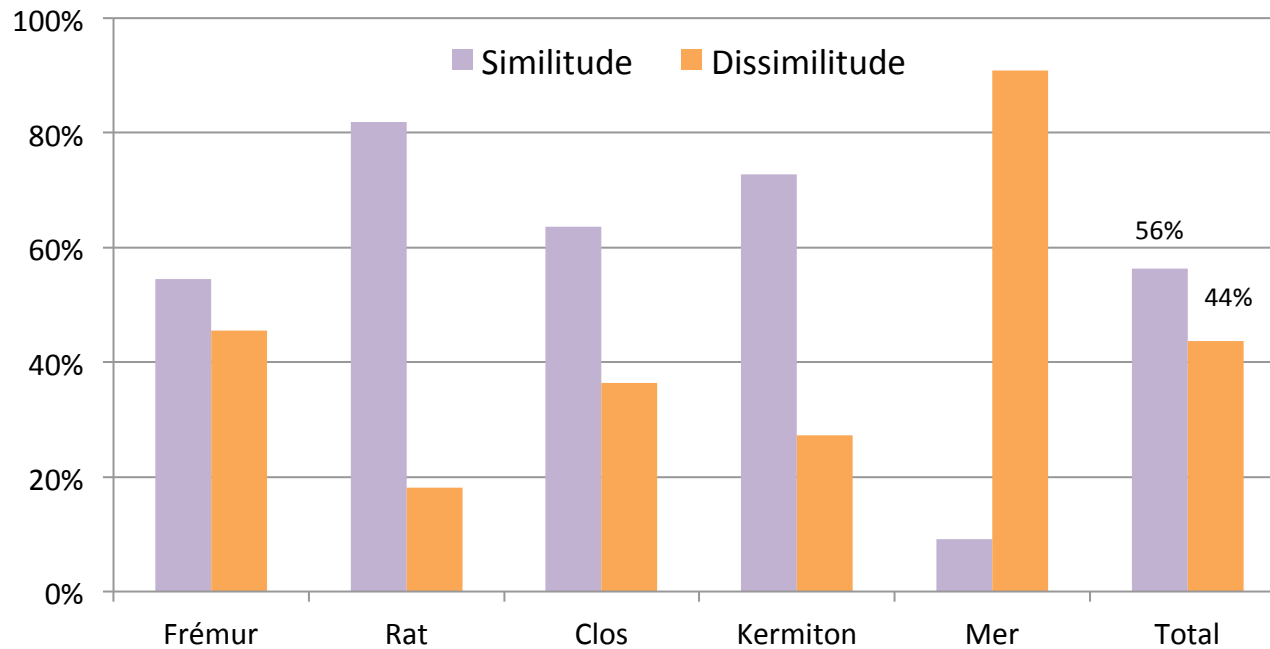
Bonne corrélation



Bonne corrélation

- Source identification: quite good correlation between bacteroidales and fecal stanols
- Marker occurrence: Bovine > Human > Porcine

- Eaux: concordance stanols/bactéroïdales



Concordance des sources identifiées:

- Bonne corrélation : 1 source de contamination majeur (stanols): Rat, Clos, Kermiton
- Mauvaise corrélation: sources de contaminations mixtes (stanols): Frémur

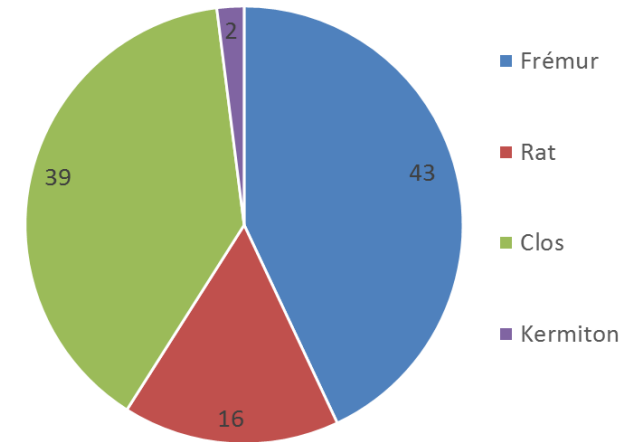
Stanols et bactéroïdales utiles en combinaison pour identifier les sources majeurs de contaminations dans les eaux

- Eaux: *résumé*

Cours d'eau contaminés par différentes sources



Contribution bactériologique: E. coli (%)



Leloutre 2012



Classement annuel des sources de contaminations potentielles de la baie:

**Bovin** > **Humain** >> **Porcin**

Tendance similaire dans les coquillages?

- Coquillages: *E. coli*

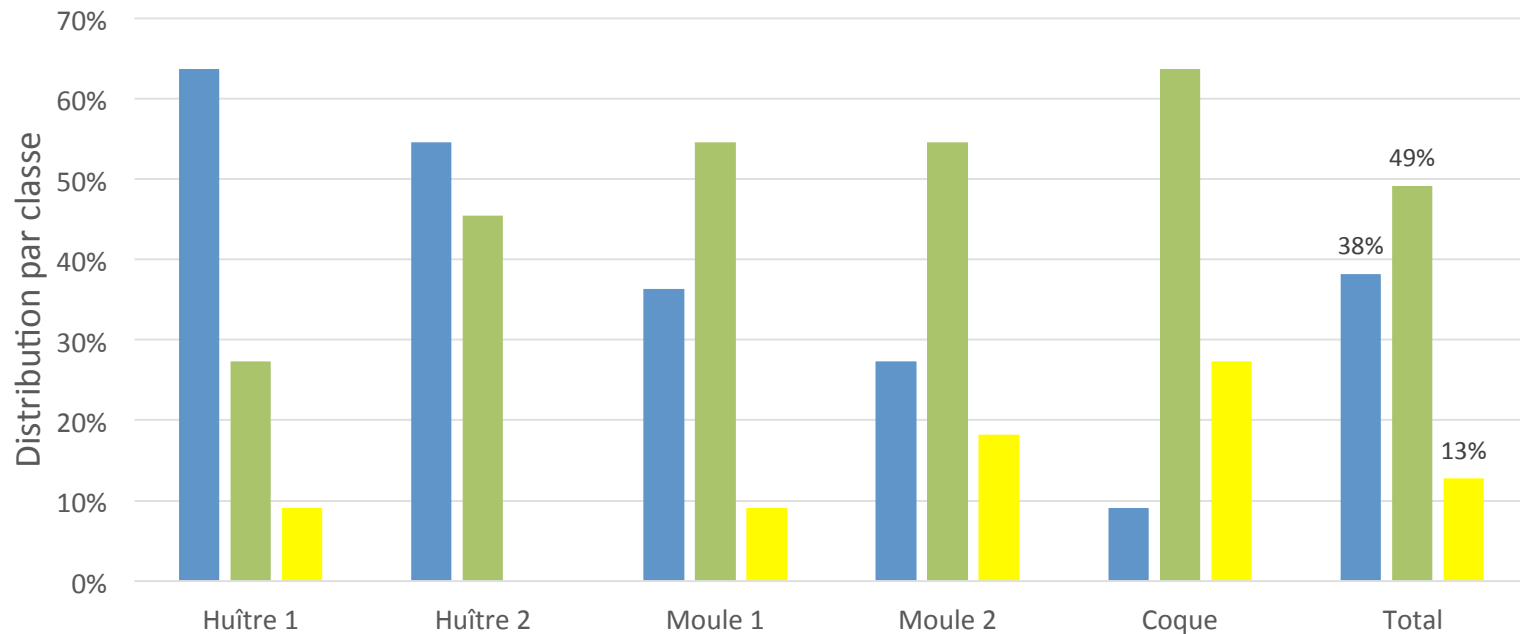
< 230 Ec/100g CLI

230-4600 Ec/100g

>4 600 Ec/100g CLI

- Coquillages: *E. coli*

*Microbial quality (*E. coli*) of shellfish by class of quality*



< 230 Ec/100g CLI



38% of shellfish in the A-category (Feb. to July)

230-4600 Ec/100g



**49% of shellfish in the B-category (Aug. to Dec.)**

>4 600 Ec/100g CLI



13% of the shellfish in the C-category (mainly cockles, Aug. to Dec.)

- Coquillages: stanols et bactéroïdales

### Empreinte stanol:

Huître 1    Huître 2    Moule 1    Moule 2    Coques

	Huître 1	Huître 2	Moule 1	Moule 2	Coques
Feb					
Mar					
Apr					
May					
Jun					
Jul					
Aug					
Sep					
Oct					
Nov					
Dec					

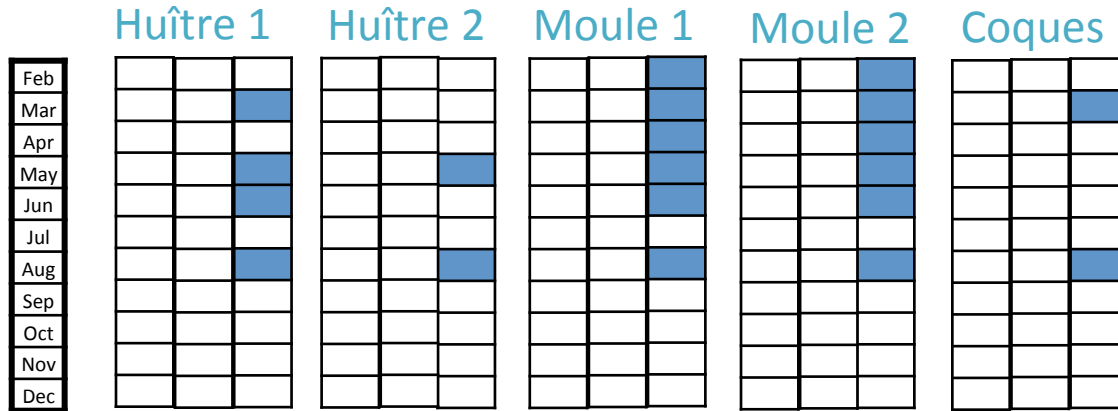
Source majoritaire unique : bovins



Similaire tendance BV

- Coquillages: stanols et bactéroïdales

### Empreinte stanol:

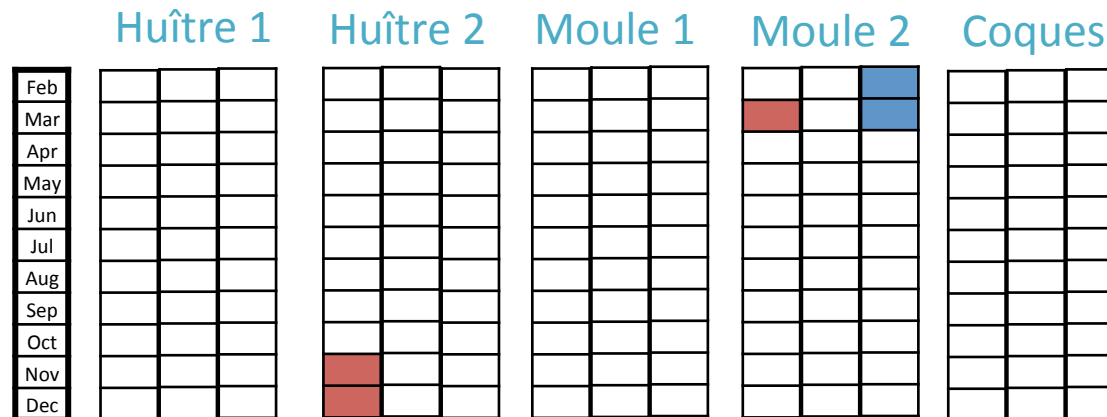


Source majoritaire unique : bovins



Similaire tendance BV

### Bactéroïdales:



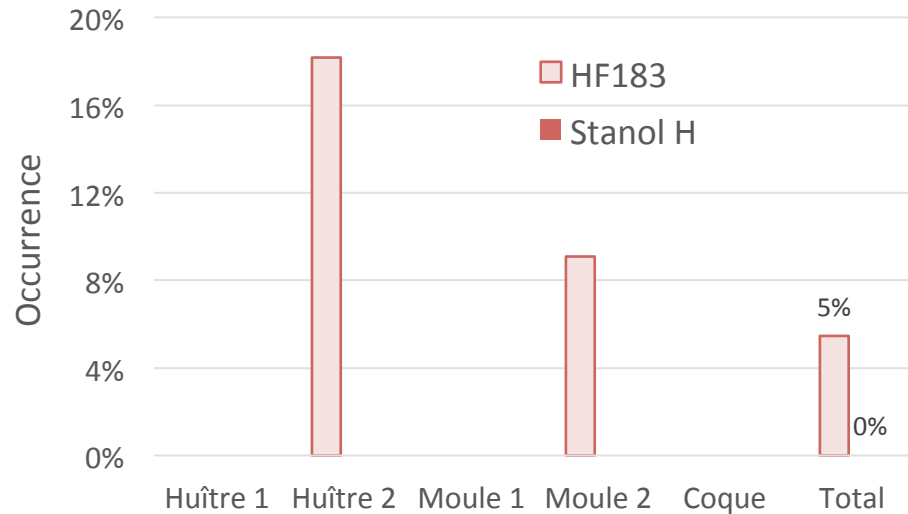
Peu de marqueurs détectés



Faible contamination (E. coli) ?

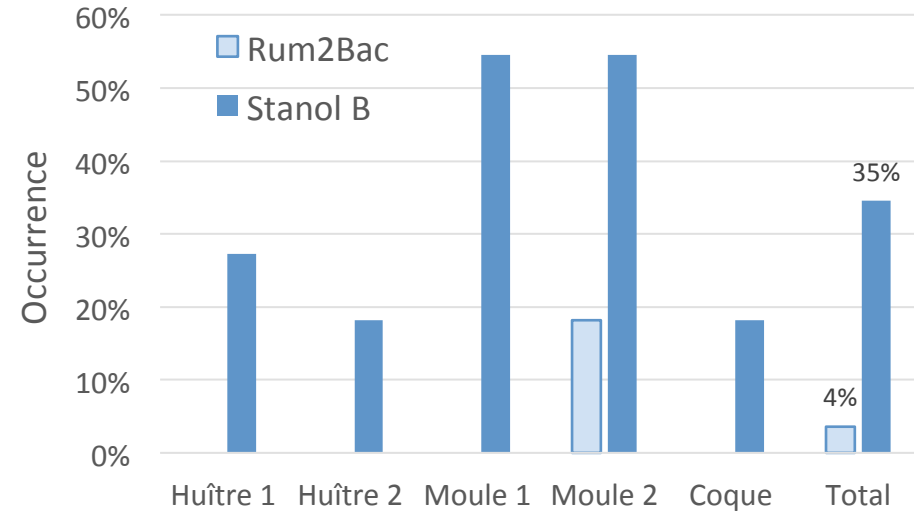
- Coquillages: *comparaison marqueurs*

### Human markers



Mauvaise corrélation

### Bovine markers



Mauvaise corrélation

- Mauvaises corrélations stanols/bactéroïdales
- Peu d'identification de source de contamination spécifique



## Eaux:

- Différentes sources de contamination: occupation des sols
- Bonne corrélation entre bactéroïdales et empreintes stanols
- **Utilité conjointe de ces 2 types de marqueurs dans les MST**

## Eaux:

- Différentes sources de contamination: occupation des sols
- Bonne corrélation entre bactéroïdales et empreintes stanols
- **Utilité conjointe de ces 2 types de marqueurs dans les MST**

## Coquillages:

- Peu de marqueurs détectés: faible contamination fécale (*E. coli*)
- Empreinte stanol **bovine** de certains coquillages: similaire au BV
- Faible occurrence de marqueurs (surtout bactéroïdales) pour comparaisons
- Nécessité de coupler à d'autres marqueurs directs ou indirects

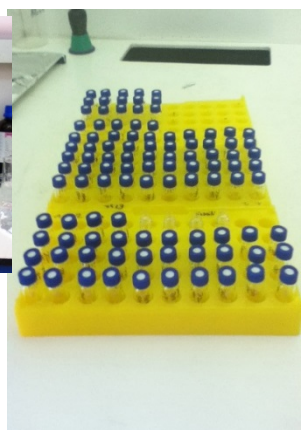
## Eaux:

- Différentes sources de contamination: occupation des sols
- Bonne corrélation entre bactéroïdales et empreintes stanols
- **Utilité conjointe de ces 2 types de marqueurs dans les MST**

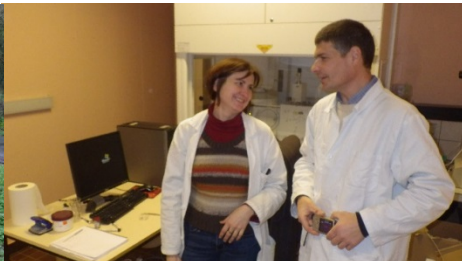
## Coquillages:

- Peu de marqueurs détectés: faible contamination fécale (*E. coli*)
- Empreinte stanol **bovine** de certains coquillages: similaire au BV
- Faible occurrence de marqueurs (surtout bactéroïdales) pour comparaisons
- Nécessité de coupler à d'autres marqueurs directs ou indirects

Dans les coquillages, marqueurs directs stanols et bactéroïdales non-adaptés à l'identification des sources lorsque la contamination fécale est faible (*E. coli*) et d'origine variée

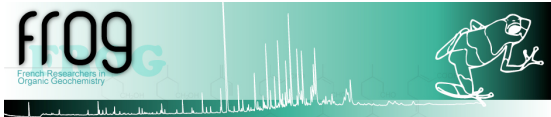


Merci pour votre attention



A la recherche d'un post-doc !

Contact: [loic.harrault@gmail.com](mailto:loic.harrault@gmail.com)



European Regional Development Fund  
The European Union, investing in your future



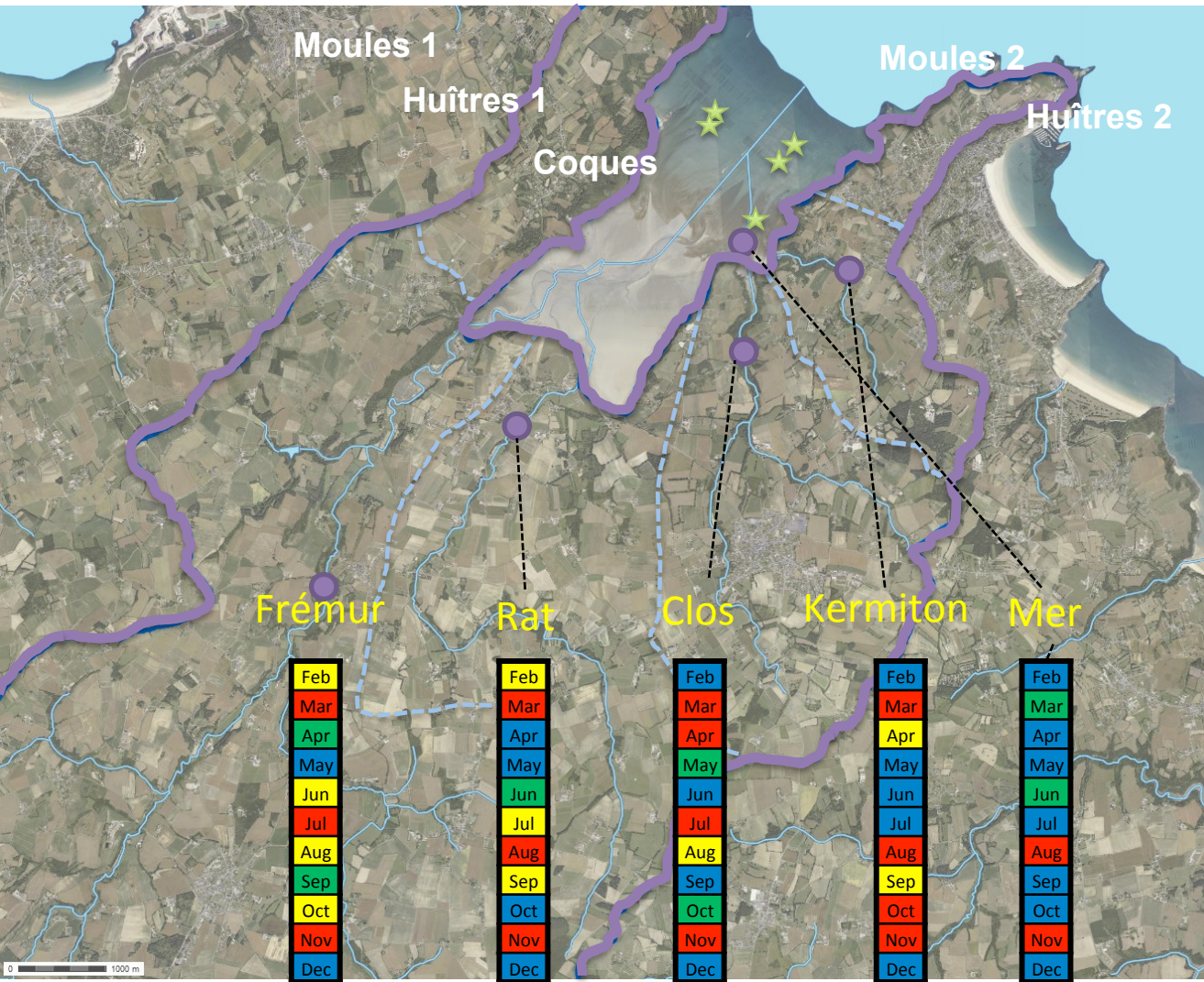
Fonds européen de développement régional  
L'Union Européenne investit dans votre avenir



- E. coli*: eaux

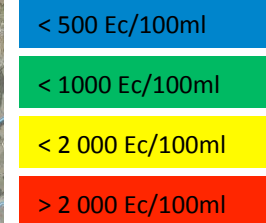
2013

February
March
April
May
June
July
August
September
October
November
December



Normes européennes:

Eau



Feb
Mar
Apr
May
Jun
Jul
Aug
Sep
Oct
Nov
Dec

Feb
Mar
Apr
May
Jun
Jul
Aug
Sep
Oct
Nov
Dec

Feb
Mar
Apr
May
Jun
Jul
Aug
Sep
Oct
Nov
Dec

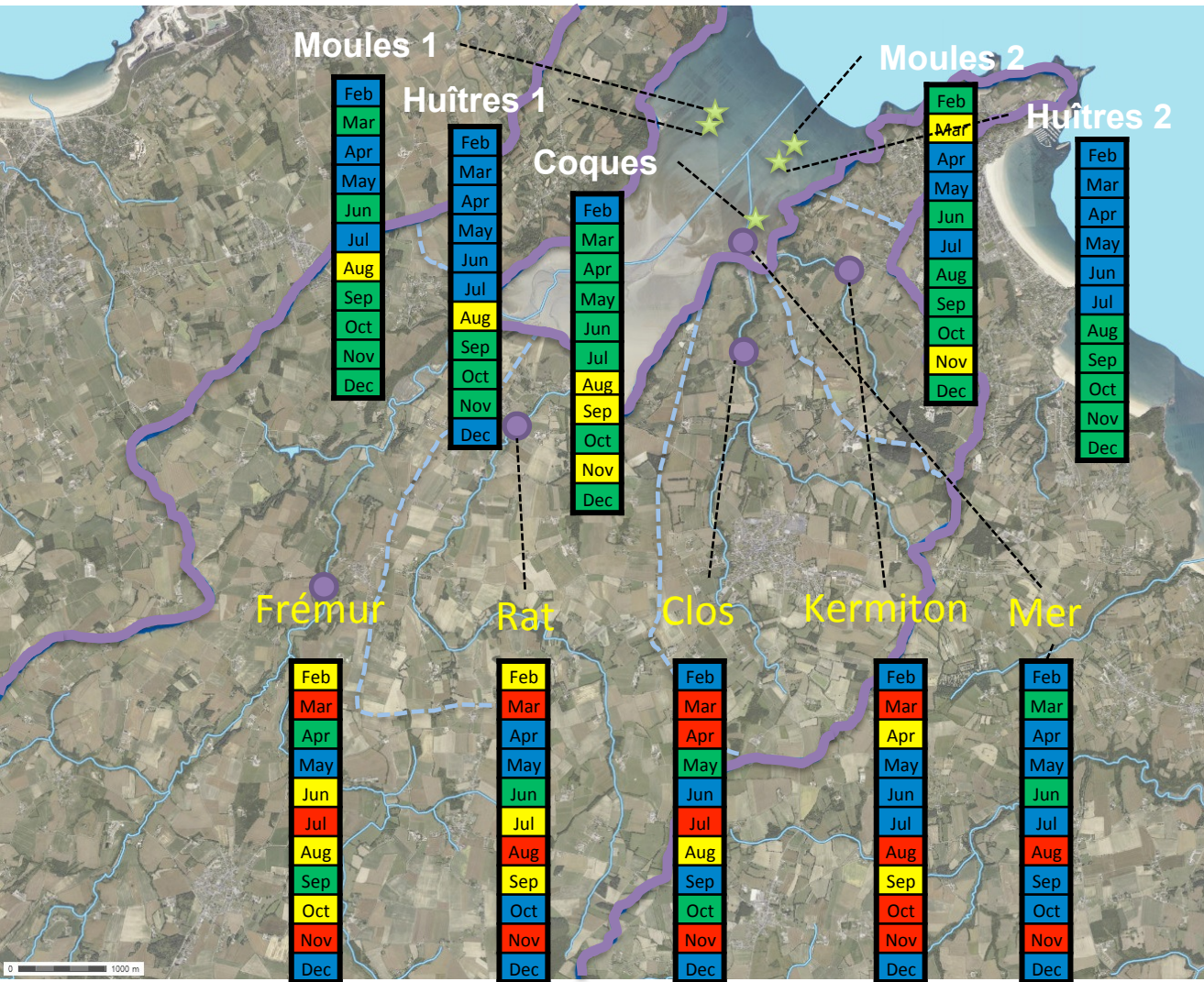
Feb
Mar
Apr
May
Jun
Jul
Aug
Sep
Oct
Nov
Dec

Feb
Mar
Apr
May
Jun
Jul
Aug
Sep
Oct
Nov
Dec

- E. coli*: coquillages

2013

February
March
April
May
June
July
August
September
October
November
December



Normes européennes:

Eau

&lt; 500 Ec/100ml

&lt; 1000 Ec/100ml

&lt; 2 000 Ec/100ml

&gt; 2 000 Ec/100ml

Coquillages

&lt; 230 Ec/100g CLI

230-4600 Ec/100g

&gt; 4 600 Ec/100g CLI

- Bactéroïdales*: eaux et coquillages

## Identification of the 3 fecal sources (no ranking between the sources)

Non-quantified:

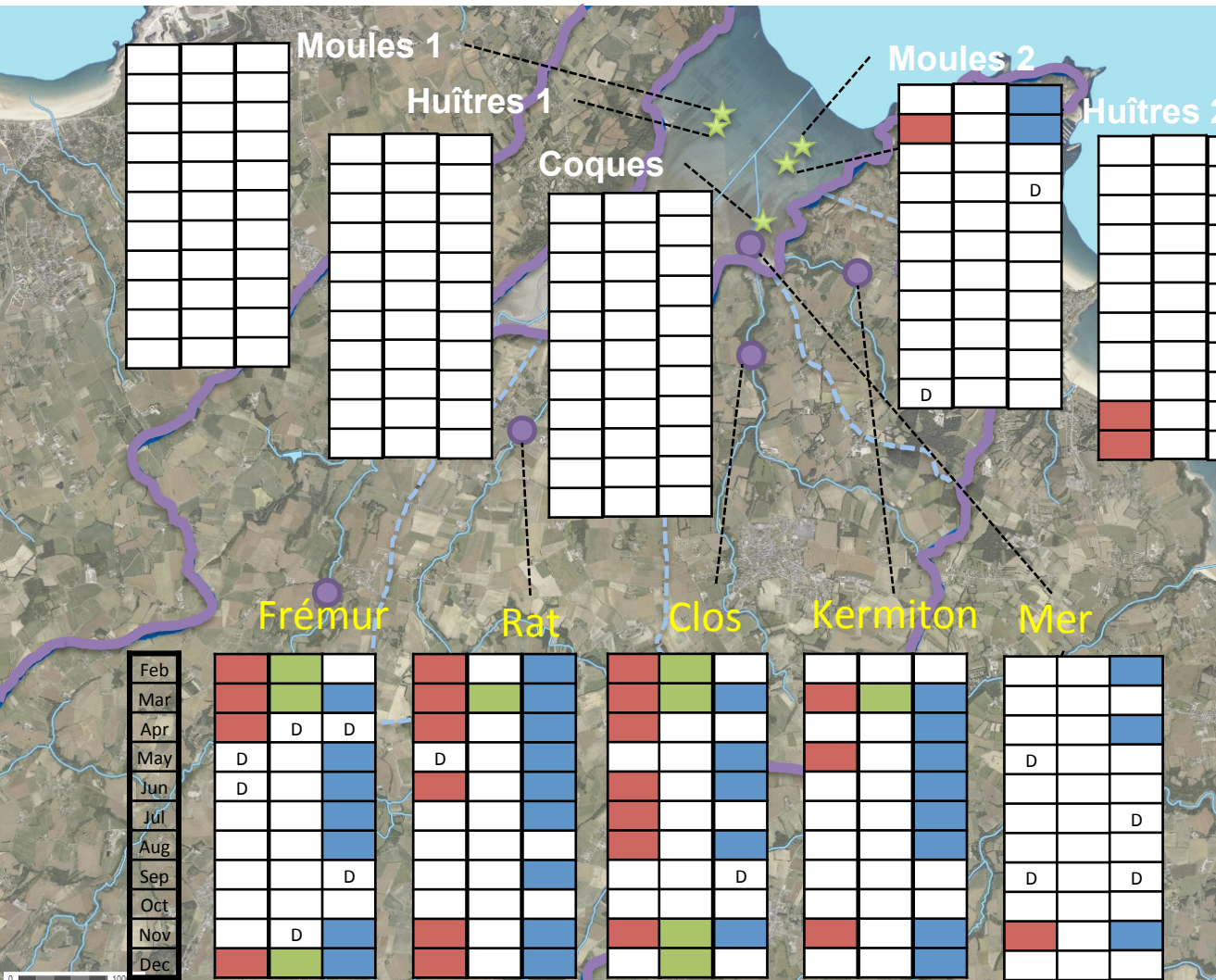
D Detected

Non Detected

Quantified:



Human  
Porcine  
Bovine

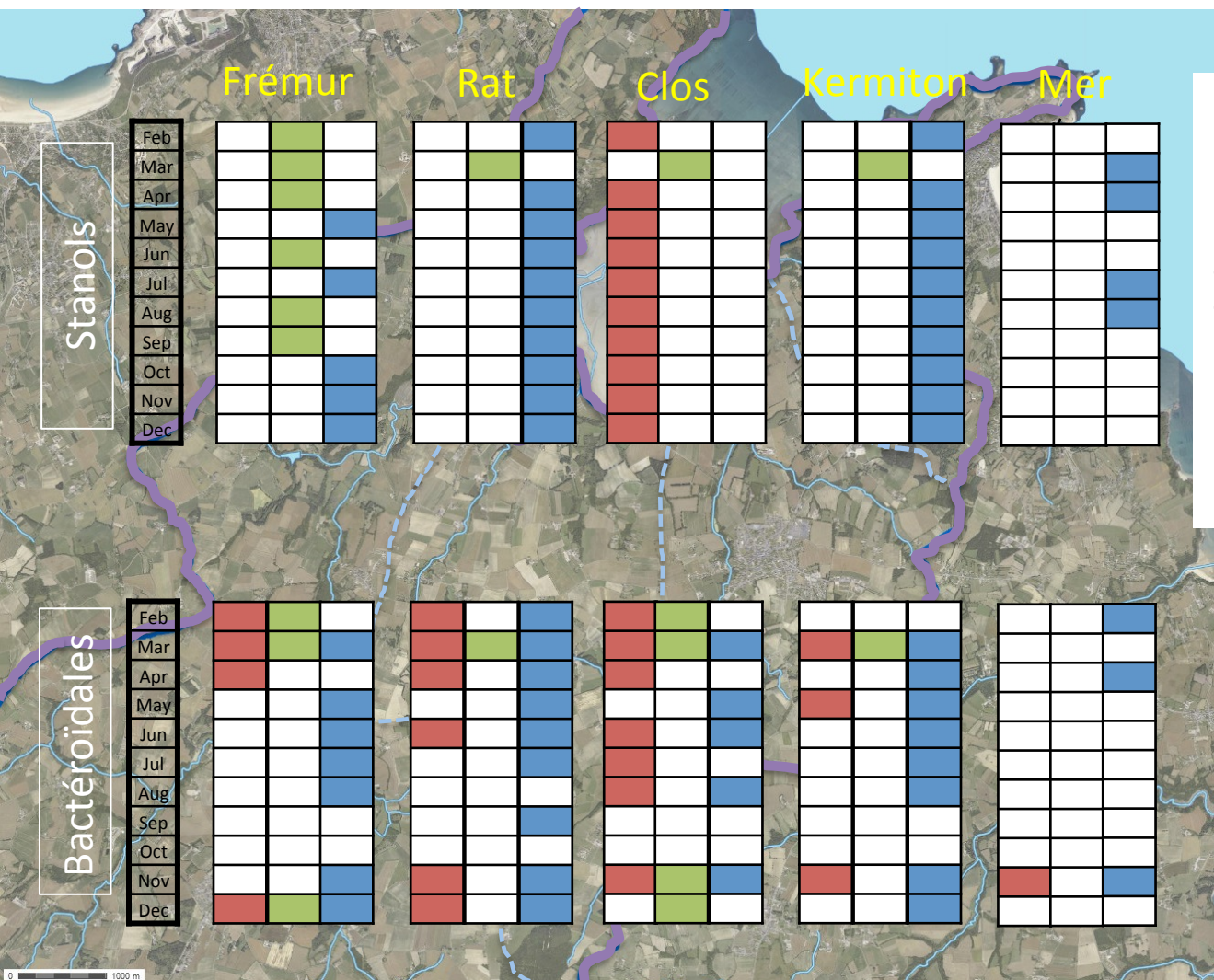


Coquillages: très peu détectés

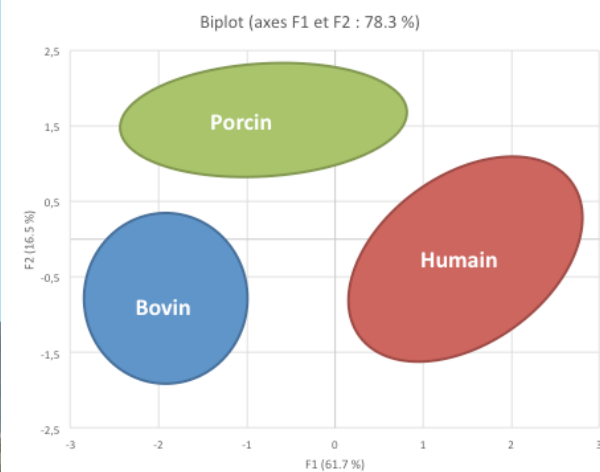
Eau:

- Sources mixtes
- Dominantes humaines et Bovines

- Eaux: stanols et bactéroïdales*



## Empreinte stanol



## Bactéroïdales

HF183

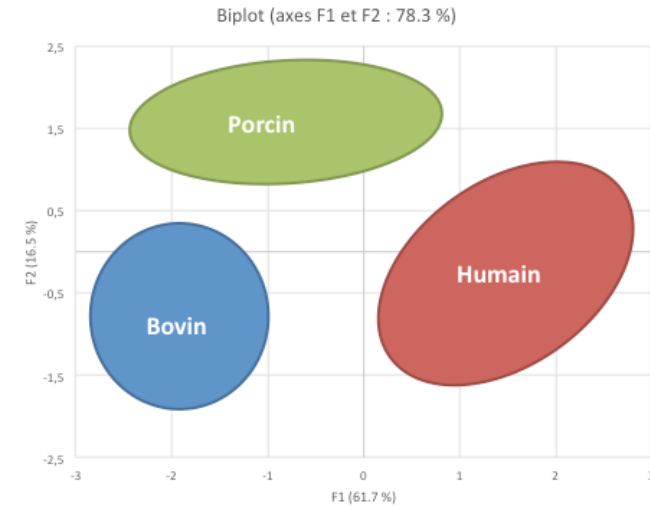
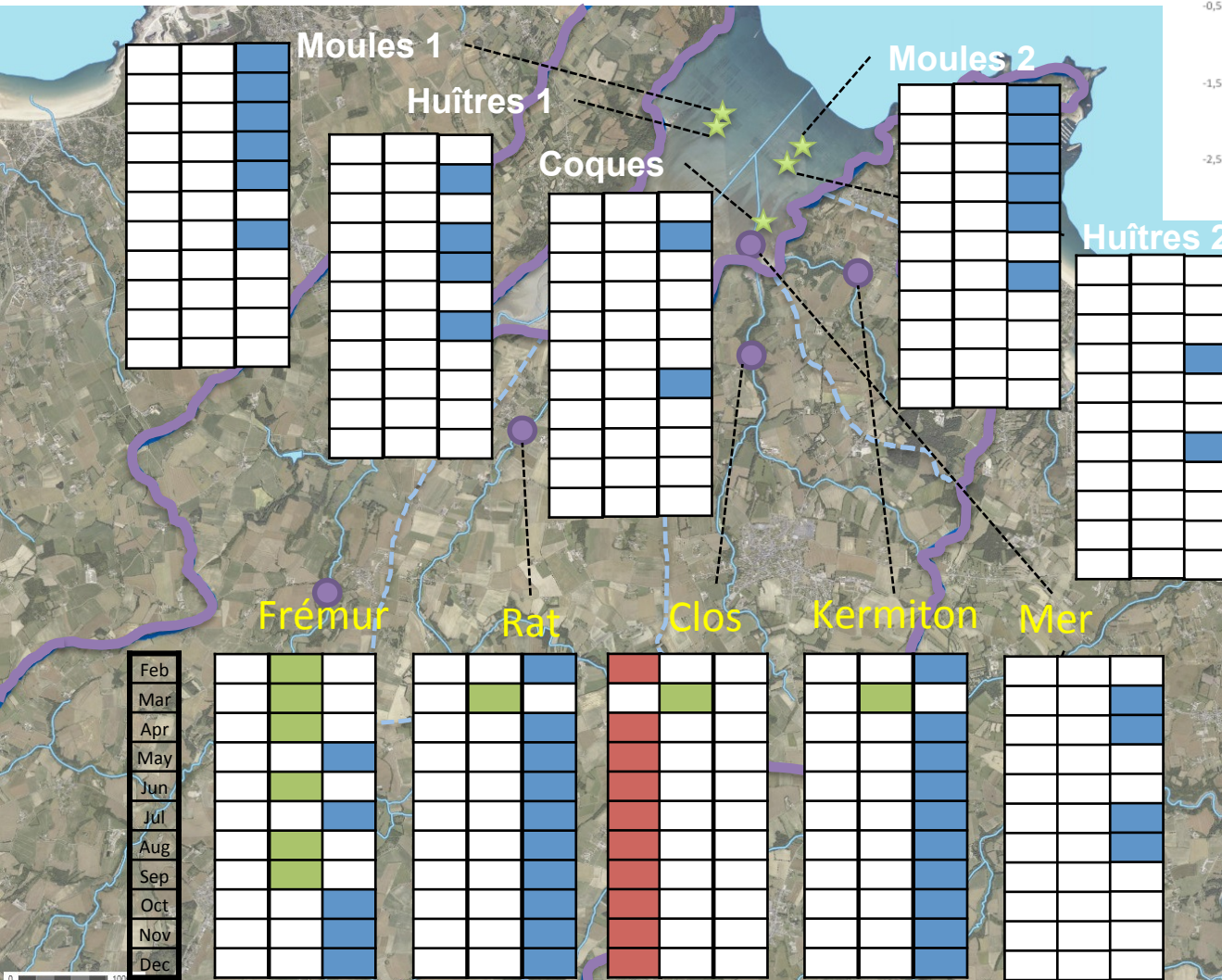
Pig-2-Bac

Rum-2-Bac



- Stanols*: eaux et coquillages

## Stanols: Identification of the main fecal source



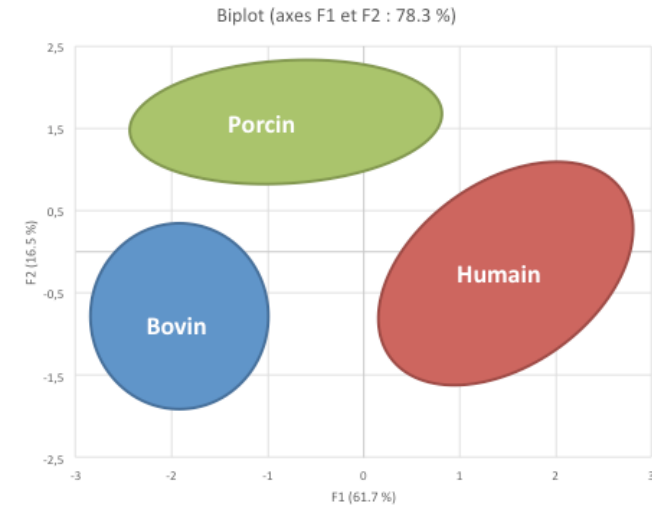
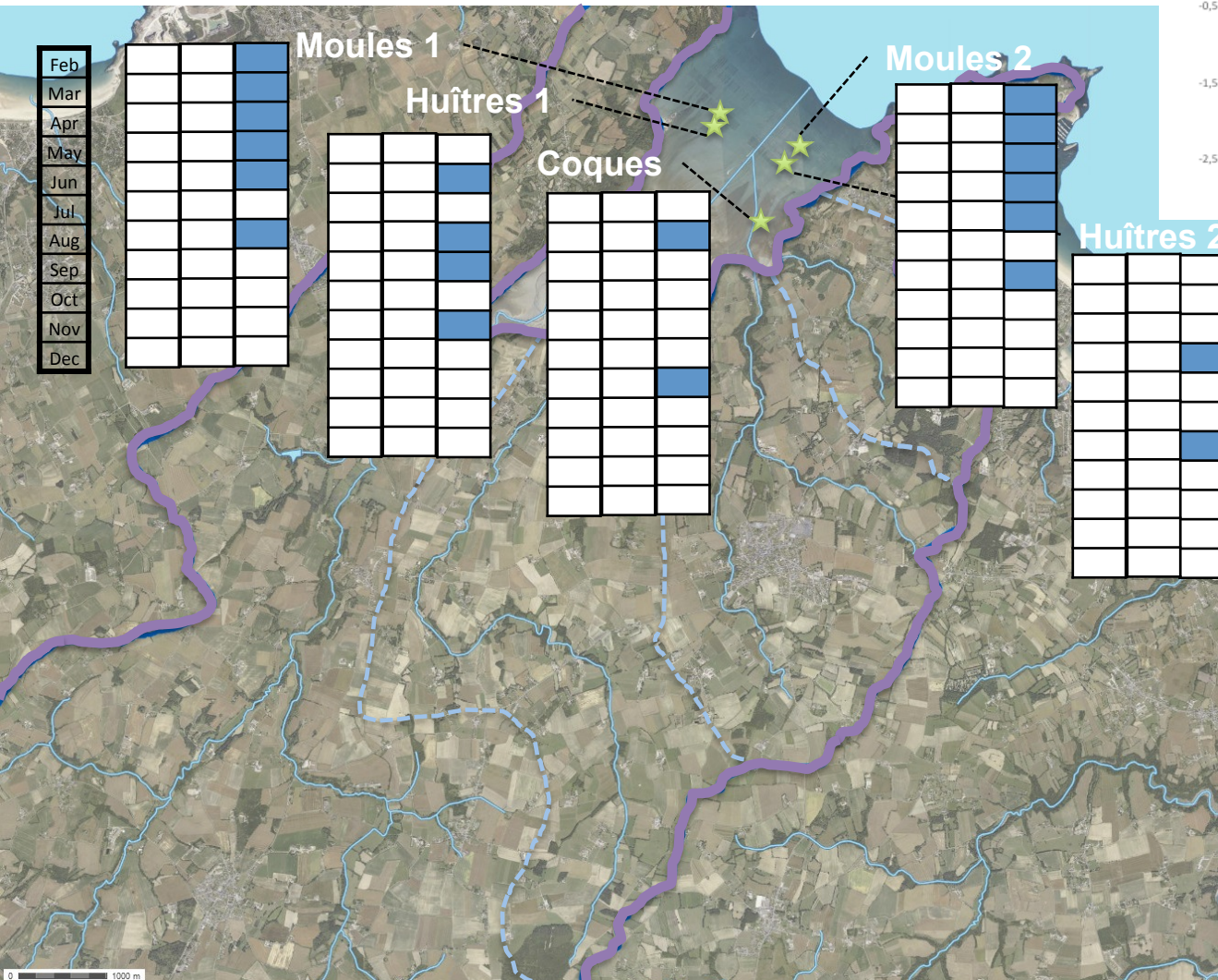
### Coquillages:

- Empreintes mixtes
- Ou bovines

### Eau:

- Majoritairement bovine
- Clos: humaine (Matignon)
- Mars: porcine (épandage)

# • Coquillages

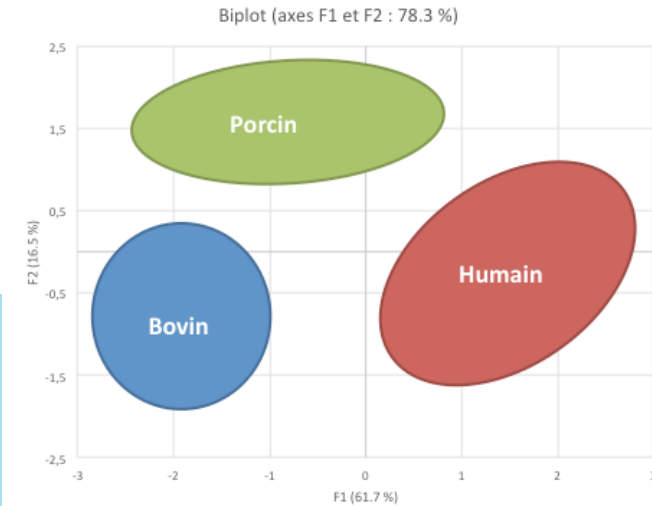
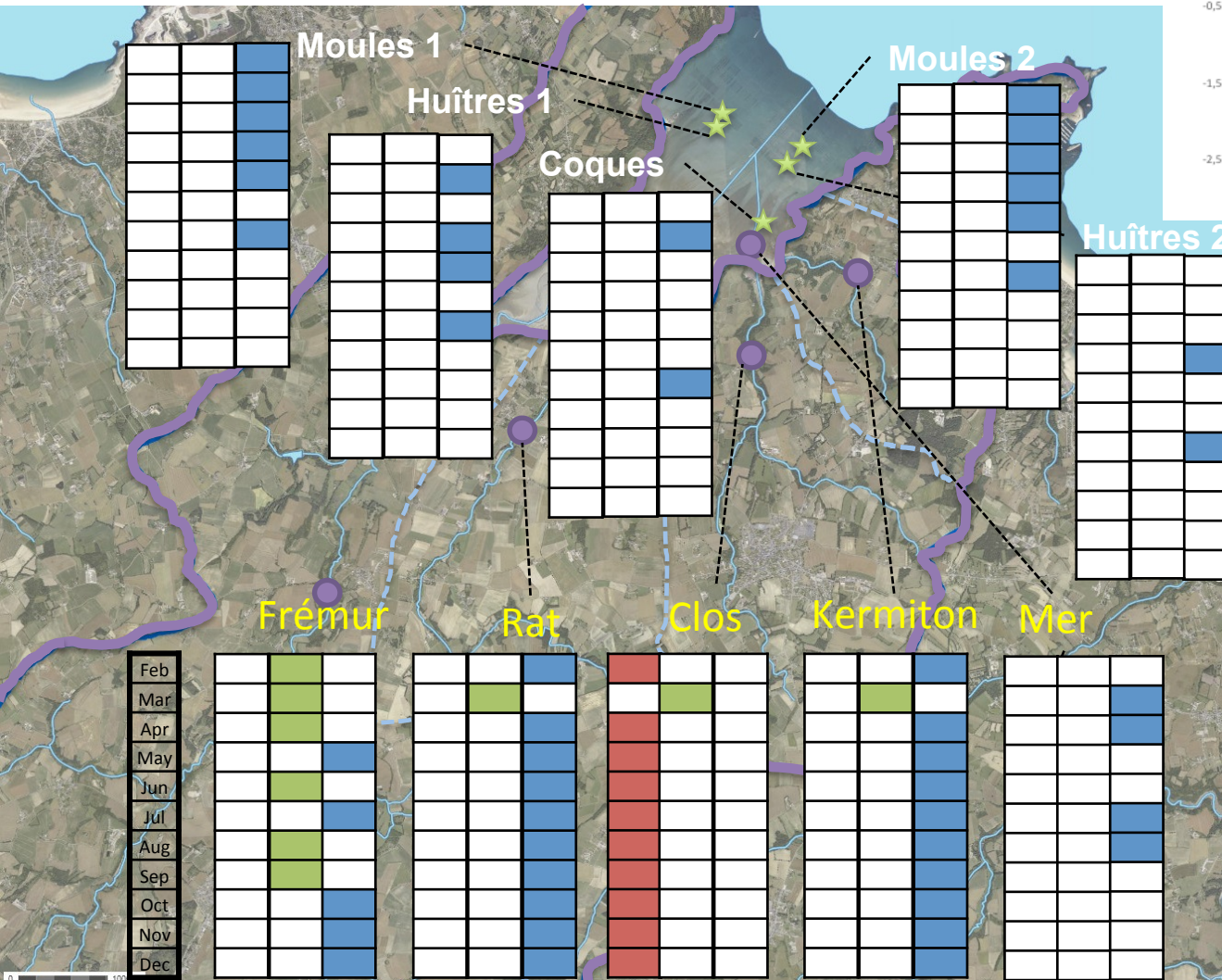


## Coquillages:

- Empreintes mixtes
- Ou bovines

- Stanols: eaux et coquillages*

## Stanols: Identification of the main fecal source



### Coquillages:

- Empreintes mixtes
- Ou bovines

### Eau:

- Majoritairement bovine
- Clos: humaine (Matignon)
- Mars: porcine (épandage)

- Bactéroïdales*: eaux et coquillages

## Identification of the 3 fecal sources (no ranking between the sources)

Non-quantified:

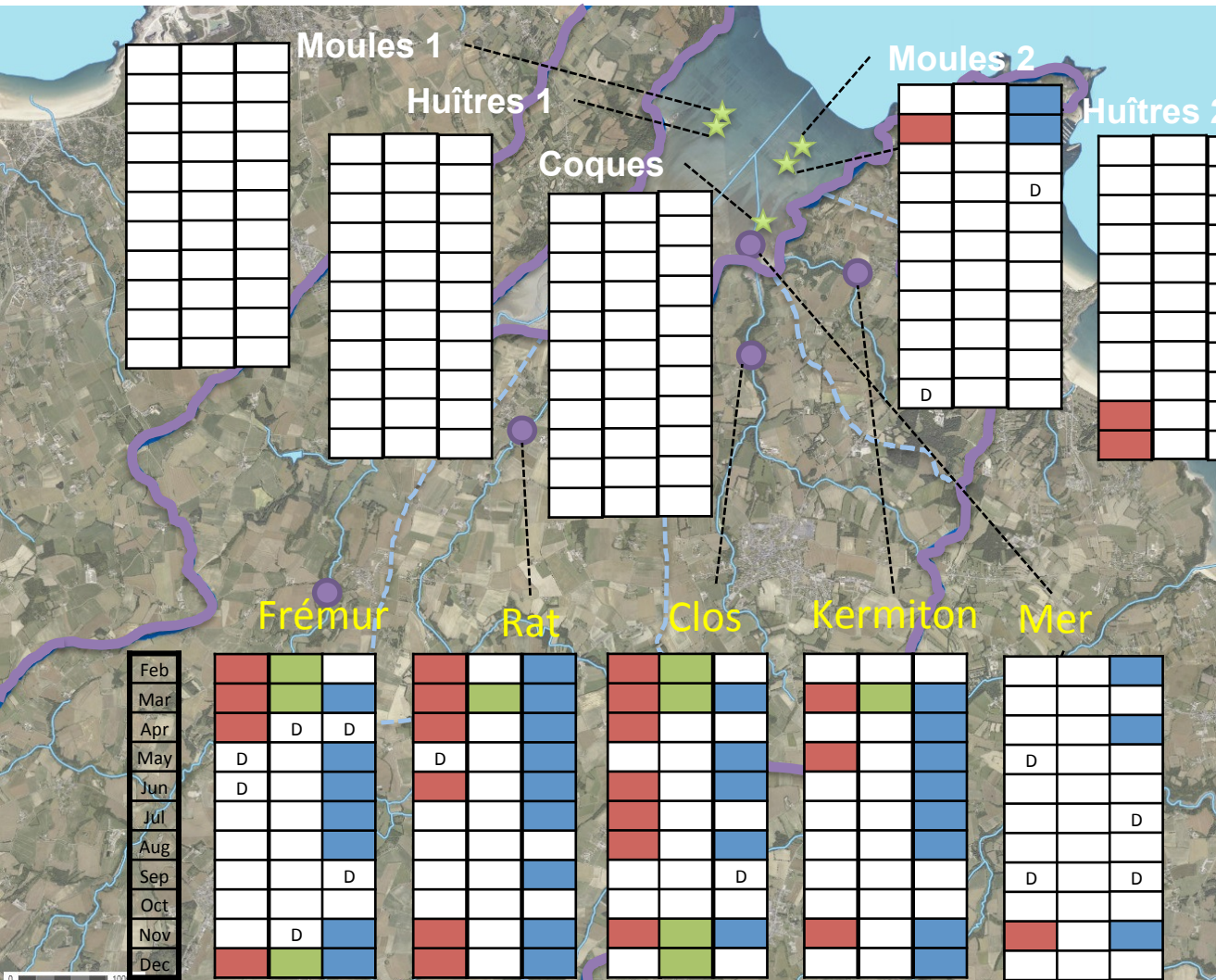
D Detected

Non Detected

Quantified:



Human  
Porcine  
Bovine



Coquillages: très peu détectés

Eau:

- Sources mixtes
- Dominantes humaines et Bovines