



RAPPORT DE L'ACTION SE 3 DU PLAN DE GESTION 2015-2025 DU LAC DE REMORAY

CARTOGRAPHIE QUALITATIVE ET QUANTITATIVE DES DEPOTS ORGANIQUES DANS LES SEDIMENTS DU LAC DE REMORAY

Rapport d'analyse

Coordination et rédaction : L. Millet,
Prélèvement: L. Millet, V. Verneaux, D. Etienne, H. Masclaux, J. Didier
Analyses CN : L. Millet, C. Loup (Chrono-Env.)
Analyses isotopes stables du Carbone : V. Verneaux (Chrono-Env.)
Analyses lipides : H. Masclaux (Chrono-Env.)
Analyses pigments : D. Etienne (CARRTEL)
Analyses bactéries fécales : D. Etienne (CARRTEL)

I Contexte et objectifs

La synthèse de l'état écologique du lac de Remoray menée à partir de l'ensemble des études et travaux antérieurs a conclu à un profond dysfonctionnement trophique du système (Geffroy 2015). Cet état dysfonctionnel se caractérise plus particulièrement par une accumulation de matière organique excédentaire dans le compartiment sédimentaire et ses conséquences en cascade sur les conditions physico-chimiques (hypoxie prolongée de la zone profonde) et la faune aquatique (macro-invertébrés, poissons). De plus, l'approche paléolimnologique (étude des carottes de sédiments de la zone profonde) a démontré que cet état trophique du système n'est pas référentiel et que sa mise en place date du milieu des années 70 (Belle 2015).

L'origine de cette matière organique sédimentaire et les processus responsables de son accumulation restent encore mal définis et plusieurs hypothèses non exclusives peuvent être proposées :

- des apports excédentaires de matière organique particulaire (MOP) allochtone en provenance du bassin versant
- des apports en nutriments (azote et phosphore) conduisant à une production phytoplanctonique autochtone excédentaire (eutrophisation)
- la présence de substances toxiques réduisant les capacités de minéralisation de la matière organique dans la colonne d'eau et le sédiment (cf volet « toxiques » de l'action SE03).

L'objectif majeur de ce volet est donc de quantifier l'importance respective des différentes sources de matière organique (allochtone vs autochtone) accumulée dans les sédiments du lac de Remoray et d'identifier les principaux vecteurs ponctuels et/ou diffus des apports en MOP et nutriments.

D'un point de vue opérationnel, cette étude vise plus particulièrement à évaluer l'influence des pratiques agro-pastorales sur l'état fonctionnel actuel du système et d'orienter ainsi les mesures de gestion du système lac-bassin versant dans la perspective d'une restauration durable de la fonctionnalité du lac.

II Stratégie d'étude

Pour atteindre ces objectifs, la présente étude consiste à dresser une cartographie détaillée des accumulations sédimentaires de matière organique à la fois quantitativement et qualitativement par l'analyse d'échantillons de sédiments de surface distribués dans l'ensemble de la cuvette lacustre.

Approche quantitative :

- les **concentrations en carbone organique** sont évaluées par des approches classiques (analyseur CNS et COTmètre) dans les différents échantillons de sédiments de surface.
- *In fine*, ces concentrations seront transformées en flux ($\text{mg de Corg.an}^{-1} \cdot 100\text{cm}^{-2}$) d'après les taux de sédimentation déterminés grâce à la mise en place de piège à sédiment à différentes stations (**Au moment de la rédaction**

de ce rapport d'analyse, le relevé des pièges à sédiment n'a pas encore pu être réalisé. Les données en flux seront intégrées au rapport de synthèse final)

Approche qualitative :

- la nature (et la source) de la matière organique sédimentaire sera déterminée par la combinaison **du ratio C/N**, de l'analyse de la **signature isotopique du carbone** ($\delta^{13}\text{C}$, ex Andrews et al. 1998, Solomon et al. 2011) et de l'analyse des **composés lipidiques** (Pearson et al. 2007).
- Le niveau de **contamination fécale d'origine bovine** dans les sédiments de surface sera appréhendé par la quantification de **l'ADN de bactéries fécales**. Les approches MST (Microbial Source Tracking) ont été développées afin de déterminer, grâce à l'utilisation de marqueurs moléculaires bactériens fécaux hôte spécifiques (*Bacteroidales*), l'origine et l'intensité des contaminations fécales (humains, bovins, ovins, porcins ...) dans les eaux de surface provenant de bassins versants complexes regroupant des activités agricoles et urbaines (Gourmelon et al., 2010).

III- Mise en œuvre et protocole

III-A Points de prélèvement et mise en place de piège à sédiment

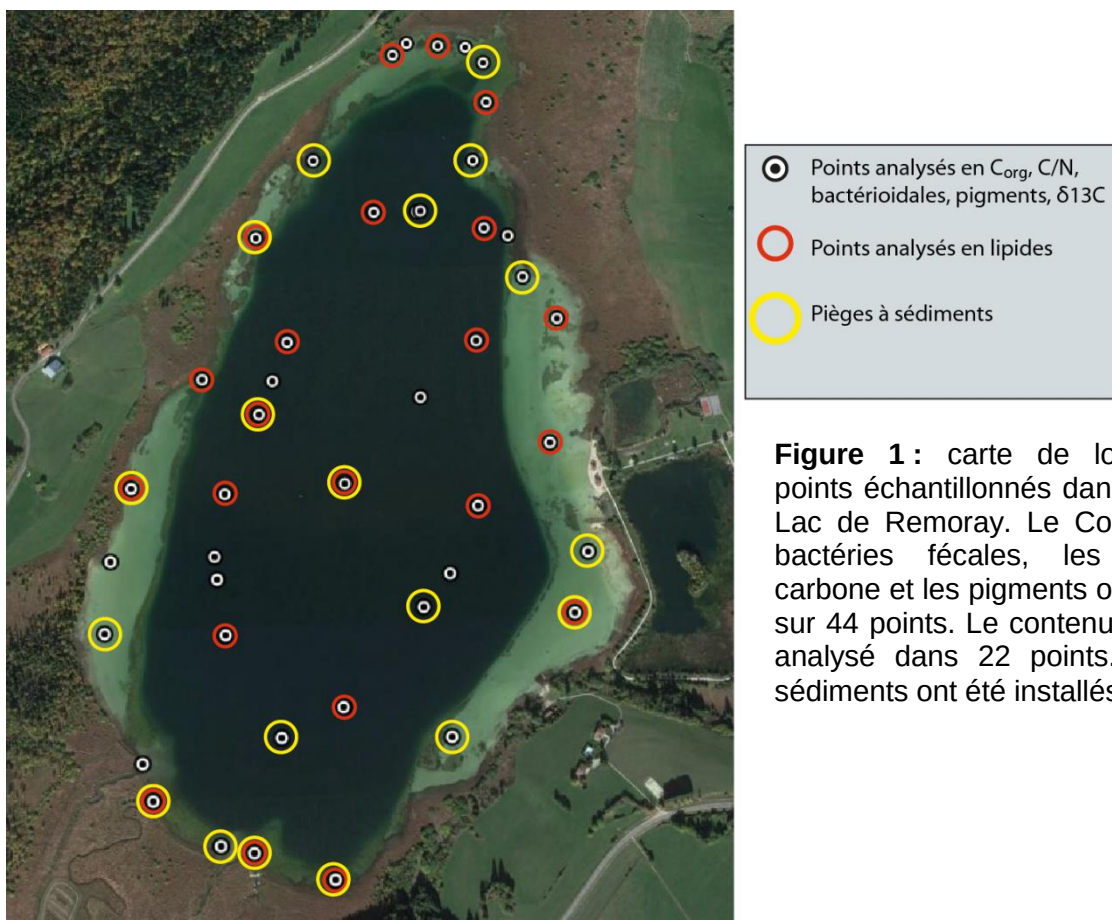


Figure 1 : carte de localisation des points échantillonnés dans la cuvette du Lac de Remoray. Le Corg, le C/N, les bactéries fécales, les isotopes du carbone et les pigments ont été analysés sur 44 points. Le contenu lipidique a été analysé dans 22 points. 18 pièges à sédiments ont été installés.

La position géographique des points de prélèvements ainsi que les analyses réalisées sont indiqués sur la figure 1. Les points analysés se distribuent en deux grands groupes : les points littoraux, prélevés à une profondeur de 0,5 à 2 m (25 points) et les échantillons profonds prélevés à une profondeur de 20 mètres (18 points). Un point d'étude a également été placé dans la zone de profondeur maximale (ca 27m). Les coordonnées géographiques ainsi que le type de points (littoraux= « L », profonds= « F », prof. Max.= « Zmax ») sont indiqués en Annexe 1.

Sur chacun de ces points, quatre carottes courtes de sédiments ont été prélevées à l'aide d'un carottier de type Kajak.

- Pour trois carottes, le premier cm est extrudé. Ces trois sous-échantillons sont poolés (44 échantillons « 1cm ») afin de disposer d'une quantité suffisante de matériel et pour prendre en compte une variabilité spatiale à l'échelle de la station.
- Pour la carotte restante, les 5 premiers cm sont extrudés afin de prendre en compte une variabilité temporelle plus longue et l'épaisseur de bioturbation potentielle (44 échantillons « 5cm »).

Parallèlement, sur 18 points, un piège à sédiment est installé. Le dispositif a été laissé en place de mai 2017 à mai 2018 et permet de déterminer les taux de sédimentation annuel (18 points).

III-B Analyses

1-Détermination des concentrations en carbone total, carbone organique et azote total

Les analyses Ctot (%), Ntot (%) et Corg (%) ont été réalisées au Laboratoire Chrono-Environnement. Les échantillons de sédiments sont séchés à 105 °C pendant au moins 4 heures. Les pourcentages de Ctot et Ntot sont déterminés par passage des échantillons dans un analyseur Variomax CNS Elementar. Le pourcentage de Corg est donné par passage des échantillons dans un analyseur VarioToc cube TN/b Elementar après décarbonatation des échantillons par une solution d'HCl.

2-Caractérisation de la matière organique

2a- C/N et $\delta^{13}C$

L'origine de la matière organique sera déterminée d'après le ratio C/N (cf III-B-1) et la signature isotopique du carbone ($\delta^{13}C$). Les analyses isotopiques seront réalisées en service par la plateforme du PTEF INRA de Nancy (IRMS couplé avec un analyseur élémentaire EA-IRMS) sur des échantillons préalablement décarbonatés par fumigation.

2b- Analyse des lipides

La nature de la matière organique a été évaluée également par l'analyse des composés lipidiques à l'instar des travaux de Pearson et al. (2007). L'analyse a été réalisée en service par la plateforme de lipidomique de Dijon située au sein de l'UMR1231 sur des échantillons préalablement lyophilisés. Une fois les lipides extraits dans des solvants organiques, les différentes fractions lipidiques seront séparées. Les échantillons seront ensuite estérifiés pour pouvoir être analysés en chromatographie phase gazeuse couplée à un spectromètre de masse (GC-MS).

2c- Pigments caroténoïdes

Un sous-échantillon sédimentaire d'environ 1 g de sédiment humide est pesé puis placé durant une nuit dans un mélange d'acétone et d'eau (90:10) pour l'extraction des caroténoïdes totaux et dérivés. Un aliquote de cette solution est ensuite prélevé puis l'absorbance est mesurée à l'aide d'un spectrophotomètre aux longueurs d'onde 450, 665 et 750 nm permettant ensuite à l'aide d'une formule de calcul de déterminer la concentration en caroténoïdes dans chaque échantillon de sédiments (Guilizzoni et al., 2011)

3-Contamination fécale

L'analyse a été réalisée en service par le laboratoire CARTEL de Chambéry. Sur les 41 échantillons, l'ADN est extrait par un kit d'extraction Nucléo Spin Soil (Promega). La présence d'ADN de Bactéroidales (non spécifique) dans les sédiments est vérifiée par PCR classique. La quantité d'ADN de Bactéroidales (non spécifique et hôte spécifique) dans les sédiments est ensuite mesurée par PCR quantitative réalisée en utilisant une amorce spécifique et une réaction fluorimétrique associée connue grâce à une gamme étalon. Chaque échantillon est testé en triplicat, avec un témoin positif et négatif. Ne sont conservés que les échantillons étant positifs à au moins deux des trois réplicats. Le protocole détaillé est décrit en annexe 2.

4-Tableau synthétique des analyses

Analyses	Échantillons « 1cm »	Échantillons « 5cm »	Total
C, N	44 échantillons : 18 profonds, 25 littoraux, 1 Zmax	44 échantillons : 18 profonds, 25 littoraux, 1 Zmax	88 échantillons
Pigments	43 échantillons : 18 profonds, 24 littoraux, 1 Zmax		43 échantillons
13C	43 échantillons : 18 profonds, 24 littoraux, 1 Zmax	43 échantillons : 18 profonds, 24 littoraux, 1 Zmax	86 échantillons
Lipides	22 échantillons : 9 profonds, 12 littoraux, 1 Zmax		22 échantillons
Bactéries fécales	44 échantillons : 18 profonds, 25 littoraux, 1 Zmax		44 échantillons

III- Résultats et interprétations préliminaires

L'ensemble des résultats obtenus est présenté dans le tableau de l'annexe 1.

1- Distribution spatiale des concentrations en **carbone organique et inorganique**

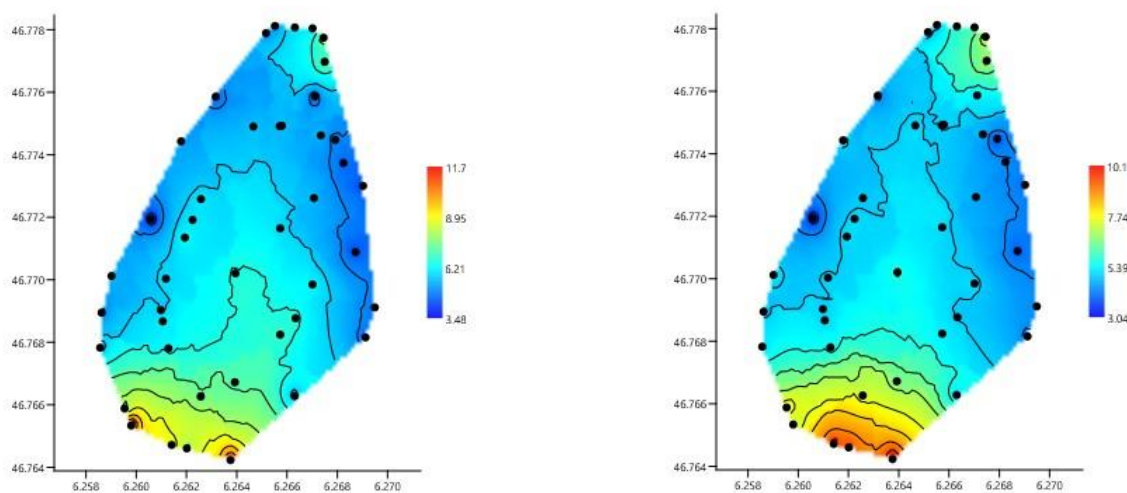


Figure 2 : carte des concentrations en carbone organique (% de Corg du sédiment sec) : a) échantillons « 0-1 cm » et b) échantillons « 0-5 cm ».

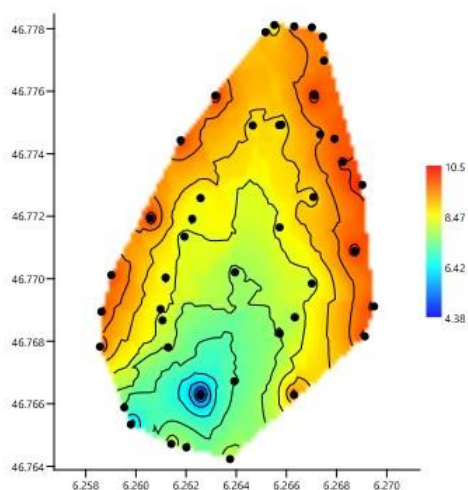


Figure 3 : carte des concentrations en carbone inorganique (% de Cinorg du sédiment sec, échantillon « 0-1 cm »)

Les concentrations (% de Corg dans le sédiment sec) des échantillons « 0-1cm » et (0-5) cm sont significativement corrélées ($p < 0.01$) et suivent une distribution identique (Fig. 2).

Les concentrations en carbone organique les plus élevées sont observées au sud du lac dans une petite zone du littoral correspondant aux débouchés des cours d'eau afférents (le Lhaut et la Drésine).

Au Nord du lac, une petite zone située en littoral non loin de l'exutoire est également caractérisée par des pourcentages plus élevés de carbone organique (Fig. 2). Mise à part, ces deux situations particulières, les concentrations organiques sont d'une façon générale plus élevées dans la zone profonde que dans les zones littorales. Celles-ci sont plus particulièrement marquées par des concentrations importantes en carbone inorganique (Fig. 3) liées à la précipitation de carbonates.

2- Distributions spatiales du rapport C/N, des isotopes du carbone et des concentrations en pigments

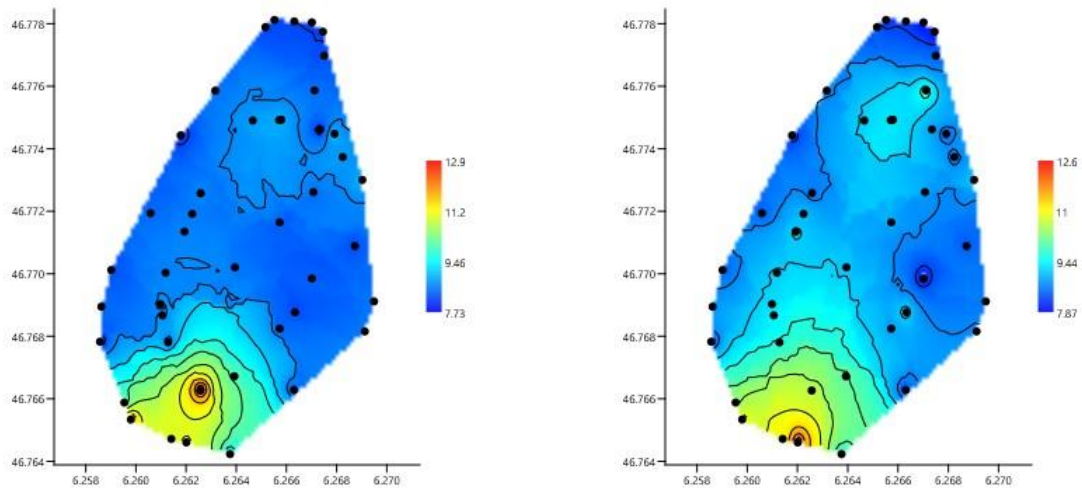


Figure 4 : carte de distribution des rapports C/N : a) échantillons « 0-1 cm » et b) échantillons « 0-5 cm ».

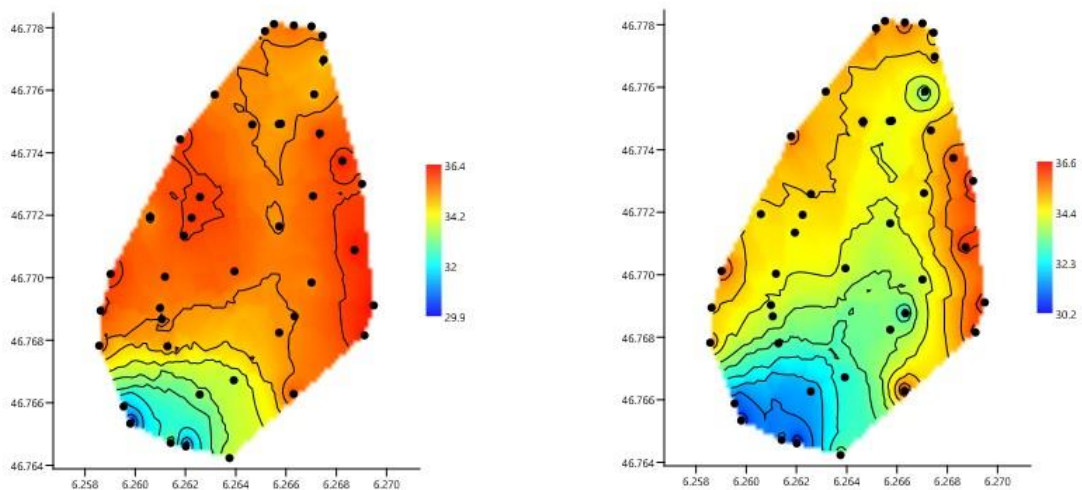
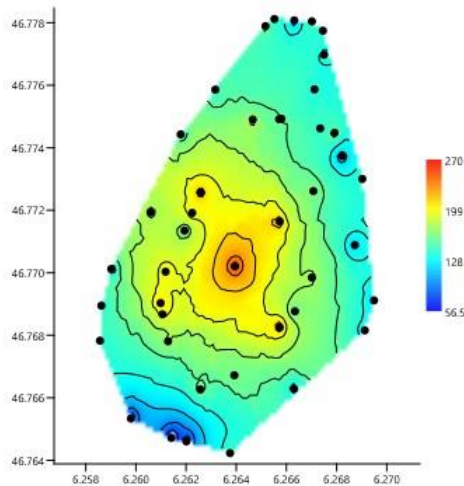


Figure 5 : carte de distribution de la signature isotopique du carbone dans le sédiment décarbonaté : a) échantillons « 0-1 cm » et b) échantillons « 0-5 cm ».

D'une façon générale, les C/N et $\delta^{13}\text{C}$ sont faibles pour l'ensemble des points analysés (Moy : $\text{C/N}_{0-1\text{cm}} = 8.8$, $\text{C/N}_{0-5\text{cm}} = 9.1$, $\delta^{13}\text{C}_{0-1\text{cm}} = -35\text{‰}$, $\delta^{13}\text{C}_{0-5\text{cm}} = -34\text{‰}$). Ces valeurs indiquent la nette prédominance de l'origine aquatique de la matière organique dans les sédiments du lac de Remoray (Meyers et Lallier-Verges 1999). Ils montrent une accumulation importante de matière organique phytoplanctonique (algues) peu ou mal dégradée dans le compartiment sédimentaire. Les valeurs plus

basses du C/N et $\delta^{13}\text{C}$ trouvées pour les échantillons « 0-1cm » comparativement à celles trouvées pour les échantillons « 0-5cm » suggèrent que ce phénomène (accumulation de MO phytoplanctonique) s'est accéléré dans la période récente. Cette hypothèse est confortée par l'analyse paléolimnologique à haute résolution d'une carotte de sédiment prélevée au centre du lac (Belle et al. 2016 et Belle et al. 2017).



L'analyse des pigments (caroténoïdes totaux) montrent des concentrations plus élevées dans la zone profonde du lac (Fig. 6). Ces résultats viennent renforcer l'hypothèse d'une accumulation massive de matière d'origine algale dans les sédiments de la zone profonde du lac de Remoray.

Figure 6 : carte de distribution des concentrations en pigments (caroténoïdes totaux $\mu\text{g.g}^{-1}\text{Corg}$) dans les échantillons « 0-1cm ».

La zone littorale située au sud du lac et correspondant aux débouchés des afférents s'individualise par un C/N et un $\delta^{13}\text{C}$ plus élevés relativement aux autres points analysés (Fig. 4 et 5). Cette signature particulière suggère une proportion légèrement plus importante de matière organique « allochtone » (terrestre et/ou en provenance des zones humides littorales) dans les sédiments de cette zone (Meyers et Lallier Vergès 1999). Cette zone présente des concentrations plus faibles de caroténoïdes dans le sédiment (Fig. 6). Ceci indique également, en accord avec les valeurs du CN et de la signature isotopique du carbone, une proportion plus faible de la matière organique d'origine aquatique (algues) dans la matière organique des sédiments de cette zone.

3- Distribution spatiale des marqueurs de contamination fécale : **stérols fécaux et Bacteroidales**

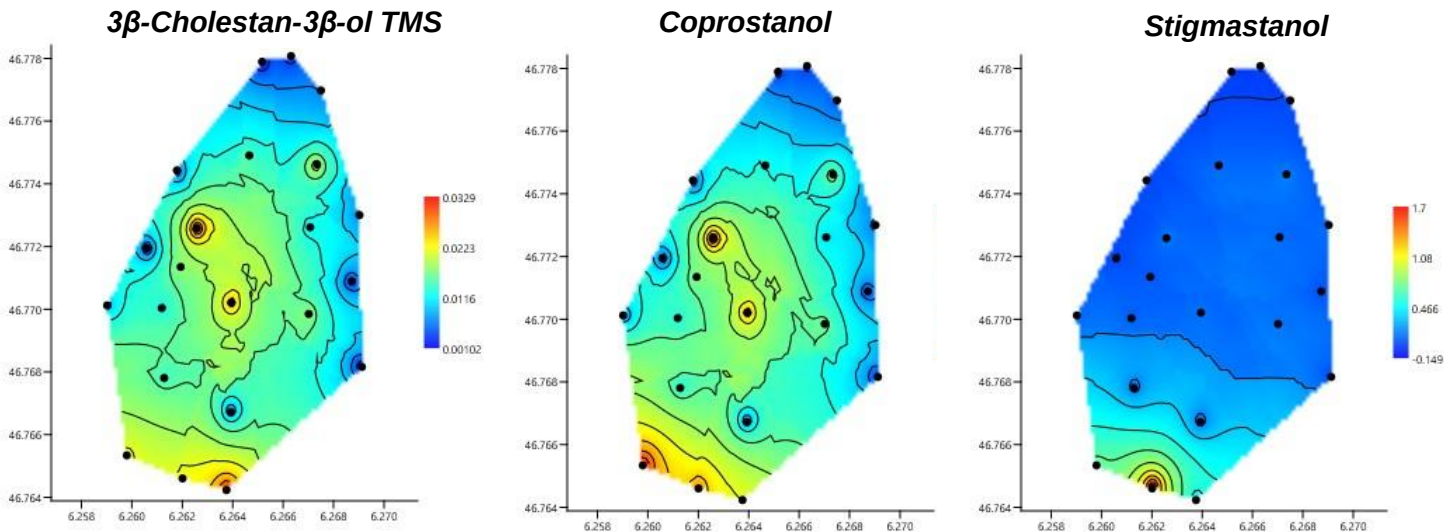


Figure 7 : carte de distribution des concentrations en stérols d'origine fécale dans les échantillons « 0-1cm » ($\mu\text{g.g}^{-1}$).

Parmi les nombreux composés lipidiques identifiés et quantifiés dans les sédiments du Lac de Remoray, plusieurs stérols peuvent être considérés d'origine fécale (Grimalt et al. 1990, Zocatelli 2017, T Guillemot pers. Com.) :

- 3β -Cholestan- 3β -ol TMS: marqueur fécal majoritairement produit par les herbivores, il constitue un produit de dégradation du cholestérol.
- Coprostanol (Coprostan-3-ol, trimethylsilylether) : marqueur fécal produit en grande quantité dans intestins d'organismes omnivores : hommes ou cochons.
- Stigmastanol, trimethylsilylether : Marqueur fécal produit en grande quantité dans intestins d'herbivores, issu de la dégradation du stigmastérol.

Les cartes de distribution des concentrations en stérols d'origine fécales montrent clairement des valeurs plus élevées relativement à l'ensemble des points analysés, dans deux zones du lac (Fig.7):

- La zone littorale du sud du lac qui correspond aux débouchés des afférents principaux (le Lhaut et la Drésine). Ces concentrations plus élevées suggèrent donc l'influence de ces vecteurs sur la contamination fécale de cette zone et du lac en général. Les zones littorales sont a priori des zones où les conditions physico-chimiques et biologiques ne sont pas favorables à la

conservation de ces marqueurs fécaux. Ainsi, les concentrations plus élevées dans ce type de milieux suggèrent des apports réguliers et importants.

- La zone profonde du lac. Les valeurs élevées de concentrations en Coprostanol et 3β -Cholestan- 3β -ol sont sans doute d'avantage liées aux conditions physico-chimiques (anoxie) favorables à la conservation de ces molécules (ex Reeves & Patton 2005) qu'à des apports particuliers dans cette zone.

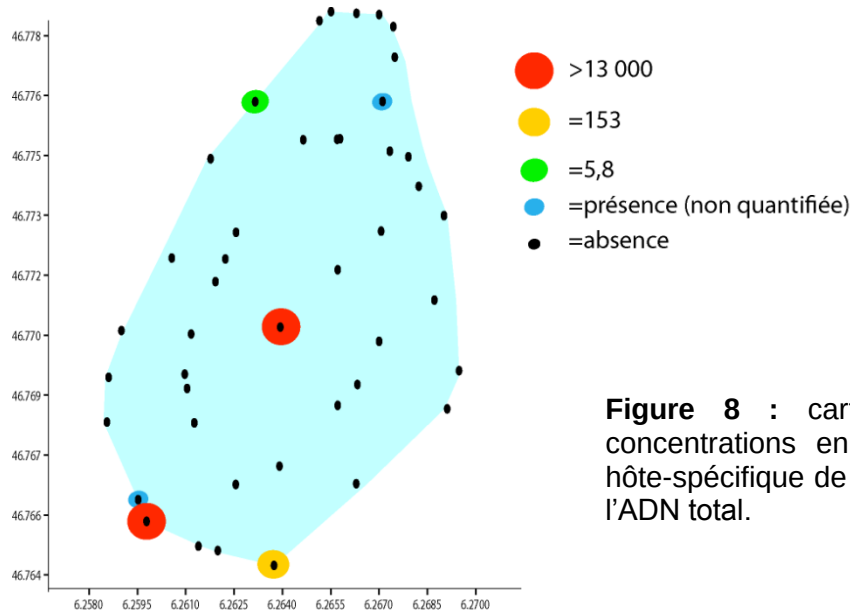


Figure 8 : carte de distribution des concentrations en ADN de Bacteroidales hôte-spécifique de ruminants relativement à l'ADN total.

Les résultats issus de l'analyse de l'ADN des bactéries fécales (Bacteroidales) dans les sédiments de surface (« 0-1cm ») montrent également le rôle des ruisseaux afférents comme vecteurs de contamination fécale du lac. Les résultats suggèrent également la possibilité d'apports plus diffus en provenance des prairies pâturées qui bordent le lac.

4 échantillons sur 44 présentent des proportions quantifiables d'ADN de Bacteroidales hôte-spécifique de ruminants.

- La valeur maximale est mise en évidence pour l'échantillon situé à l'embouchure de la Drésine (en rouge au sud du lac sur la carte de la Fig. 8). C'est à ce même point que les concentrations en Coprostanol sont maximales.
- Une valeur élevée est mise en évidence pour un point situé non loin de l'embouchure du Lhaut (point en orange sur la carte de la Fig. 8). C'est également à ce point que des valeurs élevées de 3β -Cholestan- 3β -ol (stérol fécal) ont été détectées (Fig. 7).
- Une valeur très élevée proche de la valeur max est indiquée pour le point de plus grande profondeur du lac. A l'instar des marqueurs lipidiques fécaux, la

conservation de l'ADN de bactéries fécales est probablement favorisée par des conditions physico-chimiques particulières (anoxie, température ...).

- Une valeur plus faible est trouvée pour un échantillon situé dans la zone littorale au Nord-ouest du lac (Point en vert de la Fig. 8). Il faut souligner que le contenu lipidique n'a pas été analysé dans cet échantillon. La présence de bactérie fécale dans les sédiments de cette zone suggère l'existence d'une contamination fécale diffuse prenant son origine dans les prairies pâturées qui bordent le lac.

IV- Un premier bilan

Cette partie vise à rappeler les résultats et les interprétations les plus importants issus de l'étude combinée des différents indicateurs dans les sédiments de surface du lac de Remoray et présentés dans ce rapport. Une synthèse globale et plus complète, intégrant l'ensemble des résultats des différentes actions et sous actions sera proposée ultérieurement.

- La matière organique qui s'accumule dans les sédiments du lac de Remoray est principalement d'origine aquatique comme le suggèrent les répartitions spatiales des concentrations en Corg, des concentrations en pigments et de la signature C/N et isotopique de la matière organique. Cette accumulation de matière organique résulte donc d'un mauvais transfert de la matière organique phytoplanctonique autochtone dans l'édifice trophique. Cette altération de l'efficacité des transferts trophiques prend son origine soit dans une surproduction algale liée à l'eutrophisation de la masse d'eau (augmentation de la concentration en nutriments) et qui dépasse les capacités de transferts du réseau trophique, soit dans la présence de contaminants toxiques qui inhibe ces transferts et la minéralisation de la matière organique, soit une combinaison des deux mécanismes. L'analyse des toxiques dans les sédiments du lac permettra de confirmer ou d'infirmer ces différentes hypothèses.

- Au sud du lac, une petite zone située dans la plateforme littorale et correspondante aux débouchés des principaux ruisseaux afférents s'individualise par des concentrations particulièrement élevées de Corg dans les sédiments. Les signatures C/N et isotopiques montrent une proportion plus importante de matière organique d'origine allochtone dans les sédiments de cette zone comparativement au reste du lac. Cette contribution allochtone (reste de végétation terrestre ...) apportée par les petits cours d'eau afférents est restreinte à une petite zone et n'a probablement que peu d'impact fonctionnel à l'échelle du système. Elle est normale compte tenu de l'environnement immédiat du littoral lacustre (zone humide traversée par les ruisseaux).

- L'analyse des sédiments de cette partie du littoral du lac influencée par les apports particuliers des ruisseaux y révèle la présence d'une contamination fécale nette. L'étude des stérols fécaux d'une part et de l'ADN de bactéries fécales

spécifiques des ruminants concordent pour identifier la Drésine et le Lhaut comme vecteurs d'une contamination fécale d'origine agro-pastorale. Il est donc probable que ces ruisseaux constituent des sources importantes de nutriments (N et P dissous) et de matière organique particulaire à l'origine de l'eutrophisation du lac. Cette hypothèse pourra être confirmée ou infirmée en fonction des résultats issus du suivi physico-chimiques de ces deux affluents.

- Une contamination fécale ponctuelle mais significative a également été mise en évidence au Nord-Ouest du lac. Ce résultat suggère l'existence potentielle d'une contamination fécale plus diffuse, en lien avec la présence de pâtures aux environs immédiat du lac.

ANNEXE 1

Coordonnées géographiques des points analysés et tableau de résultats.

Longitude	Latitude	Epaisseur d'échantillonage	Carbone organique (% matière sèche)	Azote total (% de matière sèche)	Carbone total (% de matière sèche)	Corg/Ntot	Carbone inorganique (% de matière sèche)	13C (pour mille) du sédiment décarbonaté
6,263922	46,766721	0-1	6,95	0,69854492	14,0735617	9,94925281	7,12356167	-33,4372208
6,262242	46,771918	0-1	6,14	0,71669763	14,2928686	8,56707168	8,15286861	-36,0146353
6,265799	46,77493	0-1	5,78	0,6568675	14,1760635	8,79933923	8,39606354	-35,3081463
6,265709	46,774917	0-1	5,4	0,58970356	13,9817467	9,1571433	8,58174667	-34,6574696
6,267344	46,774621	0-1	5,74	0,75427216	14,885148	7,6099852	9,14514805	-36,115274
6,267074	46,772615	0-1	5,62	0,66994417	13,9672775	8,38875876	8,34727753	-35,5672727
6,265727	46,771646	0-1	5,86	0,69764853	14,3120413	8,39964508	8,45204128	-35,0307891
6,262565	46,766264	0-1	6,83	0,50232589	10,4332542	13,5967508	3,60325424	-33,45
6,267012	46,76985	0-1	6,37	0,75861883	14,1872196	8,39683875	7,81721962	-35,1353628
6,265727	46,768245	0-1	6,95	0,83325058	14,5007362	8,34082826	7,55073624	-35,1986179
6,266338	46,76877	0-1	6,86	0,84240866	14,4145508	8,14331612	7,55455078	-35,1163301
6,261056	46,768671	0-1	6,41	0,75039071	14,2399273	8,54221665	7,82992729	-35,0991811
6,261281	46,767807	0-1	6,18	0,74484515	14,1297016	8,29702655	7,94970161	-35,4232063
6,260984	46,769029	0-1	5,45	0,6101954	13,7702608	8,93156522	8,32026081	-35,11
6,261182	46,770035	0-1	5,96	0,68667811	14,0946808	8,67946699	8,13468079	-35,61
6,261936	46,77135	0-1	6,59	0,76392233	14,5438766	8,6265314	7,95387665	-36,02
6,262574	46,772584	0-1	6,18	0,70382112	14,2979259	8,78064014	8,11792595	-35,9426236
6,264658	46,774905	0-1	5,72	0,64250219	14,1479616	8,90269341	8,42796162	-35,4888889
6,267452	46,777744	0-1	8,21	1,00560796	17,5514793	8,16421539	9,34147934	-35,31
6,263751	46,764233	0-1	11,37	1,26344812	19,6801605	8,99918234	8,31016052	-34,26
6,265161	46,777892	0-1	5	0,61259598	14,0524158	8,16198637	9,05241585	-35,3
6,26552	46,77812	0-1	4,82	0,58603168	12,8464546	8,22481139	8,02645462	-35,54
6,266311	46,778077	0-1	6,03	0,73485398	15,7574959	8,2057118	9,72749588	-35,77
6,267012	46,778046	0-1	5,92	0,72946191	15,6187401	8,11557112	9,69874008	-35,32
6,267497	46,776978	0-1	7,58	0,91063559	17,1737766	8,32385652	9,59377663	-34,27
6,267119	46,775868	0-1	3,78	0,44506568	14,3485155	8,49312853	10,5685155	-34,67
6,267919	46,774479	0-1	4,83	0,51836944	14,8193645	9,31767898	9,98936455	
6,268242	46,773738	0-1	4,39	0,50037664	14,6562214	8,77339115	10,2662214	-36,52
6,269024	46,773004	0-1	4,09	0,44955555	14,6323881	9,09787464	10,5423881	-35,68
6,268727	46,770887	0-1	4,14	0,50974047	14,4343767	8,12178006	10,2943767	-36,39
6,269491	46,769116	0-1	4,6	0,53776133	14,8394241	8,55398062	10,2394241	-36,5
6,262008	46,764604	0-1	7,67	0,68919277	15,5759983	11,1289618	7,90599831	-30,23
6,269123	46,768159	0-1	4,4	0,51302522	14,6556587	8,57657634	10,2556587	-36,38
6,266302	46,766282	0-1	5,15	0,63298255	15,1172733	8,13608524	9,96727333	-36,03
6,261408	46,764716	0-1	9	0,82166845	17,5638924	10,9533231	8,56389236	-33,57
6,259798	46,765338	0-1	12,37	1,00940275	17,9326515	12,2547714	5,56265152	-29,41
6,259538	46,765881	0-1	7,51	0,78571683	14,7183657	9,55815085	7,20836567	-31,46
6,258568	46,767826	0-1	5,24	0,68124616	15,385869	7,69178646	10,145869	-36,03
6,258622	46,768949	0-1	4,66	0,54769588	14,9710226	8,50837155	10,3110226	-36,2
6,259017	46,770122	0-1	5,51	0,67023593	15,7114286	8,22098568	10,2014286	-36,21
6,26058	46,771942	0-1	3,09	0,3673895	13,9132519	8,41069219	10,8232519	-34,91
6,261784	46,77443	0-1	5,21	0,66177601	15,4902372	7,87275445	10,2802372	-36,18
6,263167	46,775861	0-1	4,36	0,51196432	14,9485607	8,51621846	10,5885607	-35,27
6,263948	46,770208	0-1	6,5	0,76139432	14,0715084	8,53696936	7,57150841	-35,6622744

Longitude	Latitude	Epaisseur d'échantillonnage	Carbone organique (% matière sèche)	Azote total (% de matière sèche)	Carbone total (% de matière sèche)	Corg/Ntot	Carbone inorganique (% de matière sèche)	13C (pour mille) du sédiment décarbonaté
6,263922	46,766721	0-5	6,25	0,61954355	13,8048296	10,0880721	7,5548296	-32,4871563
6,262242	46,771918	0-5	5,26	0,57042581	13,6735487	9,22118165	8,4135487	-34,4805993
6,265799	46,77493	0-5	5,08	0,54414636	13,8977661	9,33572359	8,81776611	-34,3012254
6,265709	46,774917	0-5	4,91	0,52401888	13,8441143	9,36989134	8,9341143	-34,2937291
6,267344	46,774621	0-5	4,8	0,53816283	14,3893633	8,91923365	9,58936329	-35,2509907
6,267074	46,772615	0-5	4,65	0,52321565	13,6175089	8,88734881	8,96750889	-34,0870306
6,265727	46,771646	0-5	5,19	0,57489729	13,6782379	9,02769955	8,48823792	-34,023987
6,262565	46,766264	0-5	7,02	0,66099572	14,2272053	10,6203411	7,20720528	-31,29
6,267012	46,76985	0-5	5,29	0,6974802	13,7975426	7,58444467	8,50754257	-33,9358505
6,265727	46,768245	0-5	5,26	0,60124207	13,7678413	8,7485562	8,50784134	-33,4626006
6,266338	46,76877	0-5	4,81	0,50206971	12,5344782	9,5803429	7,72447819	-31,6894365
6,261056	46,768671	0-5	4,98	0,51921636	13,1346378	9,59137731	8,15463783	-33,5849333
6,261281	46,767807	0-5	5,4	0,56155509	13,1856461	9,61615364	7,78564606	-32,916459
6,260984	46,769029	0-5	5,02	0,54323858	13,5202446	9,24087534	8,5002446	-34,16
6,261182	46,770035	0-5	5,07	0,55180645	13,5835571	9,18800424	8,51355713	-34,61
6,261936	46,77135	0-5	5,3	0,56949061	13,6048336	9,30656255	8,3048336	-34,59
6,262574	46,772584	0-5	4,91	0,57860029	13,8377724	8,48599648	8,92777237	-34,88964
6,264658	46,774905	0-5	5,18	0,56565368	13,9979124	9,15754669	8,81791241	-35,1026678
6,267452	46,777744	0-5	8,12	1,03956211	17,3961887	7,81098114	9,27618874	-34,35
6,263751	46,764233	0-5	10,55	1,11898172	19,613266	9,4282148	9,06326599	-33,72
6,265161	46,777892	0-5	4,56	0,5340755	13,6766195	8,5381187	9,11661953	-35,81
6,26552	46,77812	0-5	4,58	0,57200009	12,6282864	8,0069918	8,04828636	-34,92
6,266311	46,778077	0-5	5,74	0,69611216	15,8794289	8,24579768	10,1394289	-36,44
6,267012	46,778046	0-5	5,93	0,76485914	15,6054049	7,75306156	9,67540485	-35,28
6,267497	46,776978	0-5	7,22	0,84682089	17,1438007	8,526006	9,92380074	-35,07
6,267119	46,775868	0-5	4,98	0,47802347	14,5430899	10,4178985	9,56308987	-32,39
6,267919	46,774479	0-5	3,42	0,41508985	14,2868872	8,23918011	10,8668872	
6,268242	46,773738	0-5	4,35	0,51707512	14,728651	8,41270411	10,378651	-36,24
6,269024	46,773004	0-5	4,01	0,43308395	14,5505018	9,25917478	10,5405018	-36,9
6,268727	46,770887	0-5	3,78	0,45213354	14,2151203	8,36036192	10,4351203	-36,46
6,269491	46,769116	0-5	4,31	0,50124443	14,7399969	8,59859936	10,4299969	-36,59
6,262008	46,764604	0-5	9,65	0,7475993	17,0338898	12,9079842	7,38388977	-29,94
6,269123	46,768159	0-5	4,1	0,46622539	14,4589977	8,79402994	10,3589977	-36,39
6,266302	46,766282	0-5	5,07	0,62111074	15,1063175	8,16279561	10,0363175	-36,64
6,261408	46,764716	0-5	9,99	0,92830223	18,2877083	10,7615814	8,29770828	-31,65
6,259798	46,765338	0-5	7	0,63443977	13,8692532	11,0333563	6,86925316	-30,18
6,259538	46,765881	0-5	8,03	0,77906758	14,3164549	10,3071932	6,28645489	-30,68
6,258568	46,767826	0-5	4,89	0,6087898	15,3136492	8,03232904	10,4236492	-36,02
6,258622	46,768949	0-5	4,59	0,52279609	14,8481369	8,77971364	10,2581369	-35,08
6,259017	46,770122	0-5	5,42	0,65129137	15,6698027	8,32192817	10,2498027	-36,36
6,26058	46,771942	0-5	2,71	0,32691094	13,6539774	8,28971945	10,9439774	-34,54
6,261784	46,77443	0-5	5,17	0,64561349	15,3814573	8,00788718	10,2114573	-35,9
6,263167	46,775861	0-5	4,1	0,47128868	14,5878134	8,69955118	10,4878134	-34,94
6,263948	46,770208	0-5	5,73	0,63062263	13,177125	9,0862582	7,44712498	-34,2259068

					Stérols fécaux (µg/mg de matière sèche)		
Longitude	Latitude	Epaisseur d'échantillon nage	Pigments Caroténoïdes Totaux (µg g-1 sédiment sec)	Pigments Caroténoïdes Totaux (µg g-1 Corg)	Stigmastanol, trimethylsilyl ether	3β-Cholestan-3β-ol TMS	Coprostan-3-ol, trimethylsilyl ether
6,263922	46,766721	0-1	11,03378349	158,7594747	0,037955025	0,004798348	0,001091979
6,262242	46,771918	0-1	12,55203805	204,4305871			
6,265799	46,77493	0-1	8,738226901	151,1803962			
6,265709	46,774917	0-1	8,636029412	159,9264706			
6,267344	46,774621	0-1	7,728847415	134,6489097	0,194329203	0,022737067	0,006172509
6,267074	46,772615	0-1	9,839210384	175,0749179	0,103436019	0,010535409	0,002691388
6,265727	46,771646	0-1	13,83401575	236,0753541			
6,262565	46,766264	0-1	11,24293471	164,61105			
6,267012	46,76985	0-1	11,59907692	182,0891197	0,126051516	0,018576762	0,005364018
6,265727	46,768245	0-1	17,08194783	245,783422			
6,266338	46,76877	0-1	9,875523504	143,9580686			
6,261056	46,768671	0-1	12,67776242	197,7810049			
6,261281	46,767807	0-1	11,34897108	183,6403087	0,061433911	0,013478258	0,003551337
6,260984	46,769029	0-1	12,2164192	224,1544808			
6,261182	46,770035	0-1	12,584	211,1409396	0,049953573	0,011496466	0,003362269
6,261936	46,77135	0-1	8,803413375	133,5874564	0,055973912	0,019145155	0,005754879
6,262574	46,772584	0-1	14,41180909	233,2007944	0,185342027	0,03690424	0,012034146
6,264658	46,774905	0-1	10,3439723	180,8386766	0,114439007	0,01489719	0,003572102
6,267452	46,777744	0-1	11,18432151	136,228033			
6,263751	46,764233	0-1	17,07190161	150,1486509	0,41769194	0,032194929	0,006847414
6,265161	46,777892	0-1	8,057	161,14	0,003177473	0,000346433	5,50727E-05
6,26552	46,77812	0-1	6,724409537	139,5105713			
6,266311	46,778077	0-1	5,849057437	96,99929414	0,026092205	0,002173684	0,000308948
6,267012	46,778046	0-1	8,80042047	148,6557512			
6,267497	46,776978	0-1	9,889185185	130,4641845	0,047081807	0,006450834	0,000827999
6,267119	46,775868	0-1	5,166231942	136,6728027			
6,267919	46,774479	0-1	8,10533435	167,8123054			
6,268242	46,773738	0-1	3,276838764	74,64325202			
6,269024	46,773004	0-1	5,655903004	138,286137	0,125327352	0,006344387	0,001196628
6,268727	46,770887	0-1	4,271443285	103,1749586	0,016653307	0,001344589	0,000199237
6,269491	46,769116	0-1	5,11512928	111,1984626			
6,262008	46,764604	0-1	4,091419513	53,3431488	1,911008895	0,021806567	0,009043514
6,269123	46,768159	0-1	5,188564671	117,9219243	0,002891258	0,000423343	6,09085E-05
6,266302	46,766282	0-1	6,373792759	123,7629662			
6,261408	46,764716	0-1	3,322922585	36,92136205			
6,259798	46,765338	0-1	6,868918012	55,52884407	0,750151722	0,022280423	0,011670195
6,259538	46,765881	0-1	3,747827923	49,90449964			
6,258568	46,767826	0-1	7,181878372	137,0587476			
6,258622	46,768949	0-1	5,891106353	126,4185913			
6,259017	46,770122	0-1	6,04123662	109,641318	0,08550791	0,007738694	0,001004801
6,26058	46,771942	0-1	5,068677275	164,0348633	0,003088151	0,000406532	6,21864E-05
6,261784	46,77443	0-1	6,666529915	127,9564283	0,030734281	0,003484064	0,000417257
6,263167	46,775861	0-1	5,890285714	135,0982962			
6,263948	46,770208	0-1	17,78418482	273,6028434	0,13685394	0,027863039	0,009345088

Longitude	Latitude	Epaisseur d'échantillonnage	Bactérioidales Totales				Bactérioidales spécifiques ruminants			
			Total Bacteroidales (2ul)	Total Bacteroidales (g sed humide)	Total Bacteroidales (g sed sec)	Rapport Total Bacteroidales / ADN total	Ruminant Bacteroidales (2ul)	Total Bacteroidales (copies g sed humide)	Total Bacteroidales (copies g sed sec)	Rapport Total Bacteroidales / ADN total
6,263922	46,766721	0-1	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC
6,262242	46,771918	0-1	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC
6,265799	46,77493	0-1	20,12	1898,113208	443,3208475	3,493351724	NC	NC	NC	NC
6,265709	46,774917	0-1	1121	77076,45765	18635,37465	113,0615448	NC	NC	NC	NC
6,267344	46,774621	0-1	550,8	52839,60092	13017,02502	62,92454796	NC	NC	NC	NC
6,267074	46,772615	0-1	1279	145044,2277	36768,45213	101,4235185	NC	NC	NC	NC
6,265727	46,771646	0-1	45710	3351664,467	651456,0565	4625,359752	NC	NC	NC	NC
6,262565	46,766264	0-1	607,1	47135,09317	6379,930078	54,10941807	NC	NC	NC	NC
6,267012	46,76985	0-1	57,12	4924,137931	1249,811702	43,78048937	NC	NC	NC	NC
6,265727	46,768245	0-1	548,8	55200,16093	5971,795397	56,25038098	NC	NC	NC	NC
6,266338	46,76877	0-1	283,8	27288,46154	6803,715912	92,98013252	NC	NC	NC	NC
6,261056	46,768671	0-1	248,1	22151,78571	5714,041605	43,32633051	NC	NC	NC	NC
6,261281	46,767807	0-1	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC
6,260984	46,769029	0-1	338	31482,8614	7653,396679	28,46731544	NC	NC	NC	NC
6,261182	46,770035	0-1	62,59	6136,27451	1211,47752	28,73698819	NC	NC	NC	NC
6,261936	46,77135	0-1	10890	960486,8584	246623,3369	860,0705131	NC	NC	NC	NC
6,262574	46,772584	0-1	1584	146666,6667	39857,02614	602,6410773	NC	NC	NC	NC
6,264658	46,774905	0-1	2184	235192,7633	57257,27272	261,669895	NC	NC	NC	NC
6,267452	46,777744	0-1	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC
6,263751	46,764233	0-1	1441	155884,8983	12994,54132	89,52246896	2463	266443,0982	22210,65598	153,0144629
6,265161	46,777892	0-1	721,7	68485,48112	13328,19094	48,75668568	NC	NC	NC	NC
6,26552	46,77812	0-1	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC
6,266311	46,778077	0-1	NC	NC	NC	SD	NC	NC	NC	NC
6,267012	46,778046	0-1	39,8	3685,185185	811,8186743	49,88605461	NC	NC	NC	NC
6,267497	46,776978	0-1	SD	SD	SD	SD	NC	NC	NC	NC
6,267119	46,775868	0-1	1829	174956,9543	49398,45523	102,7042986	SD	SD	SD	SD
6,267919	46,774479	0-1	SD	SD	SD	SD	NC	NC	NC	NC
6,268242	46,773738	0-1	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC
6,269024	46,773004	0-1	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC
6,268727	46,770887	0-1	141,6	14352,3211	3954,421518	15,50007015	NC	NC	NC	NC
6,269491	46,769116	0-1	SD	SD	SD	SD	NC	NC	NC	NC
6,262008	46,764604	0-1	47,61	4491,509434	1070,464845	12,91445424	NC	NC	NC	NC
6,269123	46,768159	0-1	19,96	1977,412324	517,2928992	2,539080141	NC	NC	NC	NC
6,266302	46,766282	0-1	2219	215520,5905	47128,58122	184,8479638	NC	NC	NC	NC
6,261408	46,764716	0-1	SD	SD	SD	SD	NC	NC	NC	NC
6,259798	46,765338	0-1	113,5	9784,482759	3046,440078	32,31083042	52600	4534482,759	1411830,38	14974,00599
6,259538	46,765881	0-1	33,38	3034,545455	784,4910263	14,68391361	SD	SD	SD	SD
6,258568	46,767826	0-1	651,3	82214,08735	17237,29355	52,34432728	NC	NC	NC	NC
6,258622	46,768949	0-1	244,1	21412,2807	3204,979195	54,91496166	NC	NC	NC	NC
6,259017	46,770122	0-1	123,1	11024,53878	1393,398134	16,78528786	SD	SD	SD	SD
6,26058	46,771942	0-1	88,81	8073,636364	1973,71661	67,12775299	NC	NC	NC	NC
6,261784	46,77443	0-1	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC
6,263167	46,775861	0-1	SD	SD	SD	SD	7,72	665,5172414	168,1225162	5,763439931
6,263948	46,770208	0-1	45,8	3556,452865	222,5537419	3,405339178	178200	13837552,41	865918,7075	13249,59479

ANNEXE 2

Matériel et méthode de l'étude de l'ADN des bactérioidales dans le sédiment.

Prélèvements

Les sédiments de surface ont été échantillonnés à l'aide d'une seringue stérile à usage unique, afin d'éliminer les possibles contaminations entre les échantillons, puis stockées dans des tubes Eppendorfs stériles. Ces tubes ont été directement stockés dans un transporteur à sec (Dry-Shipper) contenant de l'azote liquide à -80°C afin de préserver l'intégrité de l'ADN durant l'ensemble de la période de prélèvements, et bloquer les possibilités de multiplications bactériennes. Au retour en laboratoire ces échantillons ont été stockés dans un congélateur à -20°C au sein de la plateforme d'analyse moléculaire (AnaBM, Le Bourget-du-Lac) de l'Université Savoie Mont Blanc.

Extractions et quantifications

Les extractions ont été réalisées sur un aliquote de 0,5 g de sédiment humide, prélevé à l'aide d'instruments stérilisés (NaOH 0,1 N). L'ADN archivé dans ces sédiments est extrait des échantillons à l'aide d'un kit NucleoSpinSoil (Macherey Nagel, Hoerd, France) à l'aide des tampons de lyse SL1 associé à SX suivant le protocole proposé par le fabricant. L'élution finale a été réalisée dans un volume de 50 µL. L'intégrité de l'ADN a été vérifiée pour chaque échantillon par migration sur un gel d'électrophorèse (20 min at 9.35 V cm⁻¹) à 1% d'agarose et comparé à un marqueur de taille GeneRuler 1kb Plus DNA Ladder (Fermentas ; Saint Remy les Chevreuses, France). Les concentrations DNA total extraits par échantillons est déterminé par fluorimétrie à l'aide d'un kit de quantification QuantiFluor™ dsDNADyeSystems (Promega ; Charbonnières, France).

Amplification par PCR quantitative

Tous les échantillons (incluant la gamme étalon et les points de contrôle) sont mesurés en triplicat avec une amplification par PCR à temps réel (Bio-Rad CFX96) fournissant une quantité de copies de gènes cibles par échantillons. Les résultats obtenus sont ensuite traités à l'aide d'un logiciel spécialisé (Bio-Rad CFX Manager software v. 2.0) afin d'être exprimés en nombre de copies du gène cible par µL d'extrait.

La première étape a été de quantifier les bactéries fécales totales (Total Bactérioidales) ciblés à l'aide de deux amorces spécifiques, BacUni-520f (CGTTATCCGGATTTATTGGGTTTA) et BacUni-690r2 (AATCGGAGTTCCTCGTGATATCTA), et associées à une sonde BacUni-656p

((FAM)-TGGTGTAGCGGTGAAA-(BHQ-1)) (Sigma-Aldrich) améliorant la spécificité de cette amplification (Kildare et al., 2007). La composition des mélanges réactionnels, les protocoles expérimentaux et le rendement obtenu pour la quantification ont été précédemment décrit par Marti et al. (2011). La limite de détection de quantification par PCR en temps réel dans le cadre de cette expérimentation a été établie à 20 copies par réaction.

Nous avons également ciblés les bactéries fécales spécifiques aux ruminants (bovins, ovins, caprins) à l'aide de deux amorces spécifiques, BacR-f (GCGTATCCAACCTTCCC) et BacR-r (CATCCCCATCCGTTACC), et associées à une sonde BacR-p ((FAM)CTTCCGAAAGGGAGATT(NFQ-MGB)) (Sigma-Aldrich) améliorant la spécificité de cette amplification (Mieskin et al., 2009). La composition des mélanges réactionnels, les protocoles expérimentaux et le rendement obtenu pour la quantification ont été précédemment décrit par Mieskin et al. (2009). La limite de détection de quantification par PCR en temps réel dans le cadre de cette expérimentation a été établie à 2 copies par réaction.

Références

Kildare BJ, Leutenegger CM, McSwain BS, Bambic DG, Rajal VB, 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: 3701-3715.

Mieskin S, Furet JP, Corthier C and 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 (10): 3045-3054.