

UNIVERSITE DE LIMOGES

Secteur Sciences-Technologie-Santé

ECOLE DOCTORALE SCIENCES POUR L'ENVIRONNEMENT,

GAY LUSSAC ED N°523

PRES Limousin, Poitou-Charentes

Groupement de Recherche Eau Sol Environnement (GRESE EA 4330)

UMR Inserm U1092,

Anti-infectieux : supports moléculaires des résistances et innovations thérapeutiques

Thèse N° 74-2012

Thèse

pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE LIMOGES

Discipline / Spécialité : Eau, Sol, Environnement

présentée et soutenue par

Thibault STALDER

le 21/12/2012

**Implication des effluents d'activités hospitalières et de la filière carnée sur
la dissémination de l'antibiorésistance : dynamique des intégrons de
l'émission au rejet.**

Thèse dirigée par Christophe DAGOT et Marie-Cécile PLOY

JURY :

Professeur François DENIS

Président

Professeure Fabienne PETIT

Rapporteur

Professeur Antoine ANDREMONT

Rapporteur

Docteur Christophe MERLIN

Examineur

Professeure Marie-Cécile PLOY

Examineur

Professeur Christophe DAGOT

Examineur

Docteur Issa NAFO

Invité

A ma famille,

A Jennifer

Remerciements

Tout d'abord, je tiens à remercier le Professeur François Denis de me faire l'honneur de présider ce jury de thèse.

Je remercie également le Professeur Fabienne Petit et le Professeur Antoine Andremont d'avoir bien voulu évaluer ce travail de recherche, et j'en profite également pour leur exprimer toute ma considération.

Je tiens aussi à exprimer mes remerciements au Docteur Christophe Merlin et à Issa Nafo d'avoir participé à ce jury, et à qui je témoigne tout mon égard.

Mes remerciements vont tout particulièrement à mes deux encadrants, le professeur Christophe Dagot et le professeur Marie-Cécile Ploy, qui m'ont accueilli, accompagné et fait voyager aussi bien scientifiquement que physiquement durant ces 3 années de thèse. Vous avez su m'accorder votre confiance et m'apporter chacun votre savoir, complémentaire, afin de pouvoir réaliser au mieux ce projet. J'ai passé 3 années inoubliables en votre compagnie, et je tiens à vous exprimer tous mes sentiments d'amitié.

Je tiens également à remercier le Professeur Michel Baudu, directeur du GRESE, de m'avoir accueilli au sein de son laboratoire.

Je remercie la ville de Limoges, et notamment Cyril Moyen et Cécile Chatard pour leur implication dans mes campagnes de prélèvements, et le CHU Dupuytren, avec Laurent Boulesteix pour nous avoir permis de réaliser ce travail.

Merci à tous les membres des différents projets de recherche avec lesquels j'ai collaboré tout au long de ma thèse :

- Audrey Roch et Vivien Leconte pour leur aide sur les campagnes de prélèvement dans le cadre du projet SIPIBEL,
- Au sein du projet PILLS, Pal, Karine et Colin pour leur implication lors de mon séjour en Ecosse, Issa et Sven lors de mon séjour en Allemagne, Silvia lors de mon séjour au Luxembourg, et Herman lors de mon séjour en Hollande,
- Les partenaires du projet DEFI-VIANDES, pour les discussions scientifiques.

Bien que le travail de thèse soit un travail personnel, il est en réalité un véritable travail d'équipe, et je tiens à remercier tous les membres des équipes de recherche de l'unité U1092 et du GRESE qui ont pris part à ce projet. J'adresse un grand merci à Olivier et Magali, pour les nombreuses discussions et les conseils que vous m'avez prodigués sur ce travail pendant ces 3 années ; Margaux, pour ton aide technique précieuse ; Corinne, pour ton aide sur la DGGE ; Mousaab, pour ton aide sur les pilotes ; Jean-Noël, pour les nombreuses discussions et tes connaissances sur la microscopie ; Thomas, pour tes blagues, tes spams ☺ et tes connaissances intégrognonesques ; Emilie S., qui a dû lire au moins deux fois cette thèse pour débusquer les moindres fautes d'orthographe ; Lourdès, qui m'a supporté et aidé dans les réservations et (nombreux !) ordres de missions ; Sandra, pour les relectures d'anglais et tout son soutien logistique.

Je remercie également chaleureusement tous les autres membres et anciens membres des laboratoires, pour les bons moments de vie passés ensemble au labo ou en dehors :

- Marie-Line, Audrey, Rudy, pour ces soirées « traquenard » toujours articulées autour de grandes discussions et théories,
- Anthony, Raphaël, Emilie G., Lucie, Elodie, Aurore, Sébastien, Fadi pour ces soirées et week-ends ludiques ainsi que pour cette ambiance conviviale au labo,
- Delphine, Maud, Aurély, Kais, Ficus, Junfeng, Thouraya, Billy, Naima pour leur gentillesse qui m'a permis de passer de très agréables moments à l'ENSIL.

Et je n'oublie pas tous les autres membres, Virginie, Serge, David, Sébastien H., Sophie R., Fabien, Sophie A., Karine, Patrice, Geneviève, Guy, Mathieu, Pouf, Patrick, Philippe et tous les p'tits nouveaux à qui je souhaite le meilleur pour la suite : Camille, Déborah, Pierrette, Murielle.

Je tiens aussi à remercier les potes de Rennes (Mathieu, Benoit, Pierre, Cédric...) pour ces bons week-ends de décontraction thématiques.

Enfin, ces remerciements ne seraient pas complets sans remercier ma famille pour leur soutien alors qu'ils ne m'ont pas beaucoup vu durant ces trois dernières années, et Jennifer pour sa présence malgré la distance, et qui après avoir enduré mes monologues quotidiens autour de mes interrogations scientifiques, les virées romantiques autour d'un pilote ou d'une station d'épuration, a su m'apporter tout son soutien intellectuel et affectif au cours de ce projet.

TABLE DES MATIERES

INTRODUCTION	1
ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE	9
1 Emergence de la résistance aux antibiotiques, et relation avec l'environnement.....	11
1.1 Origines et fonctions des antibiotiques et de l'antibiorésistance	11
1.1.1 Les antibiotiques	11
1.1.2 L'antibiorésistance	12
1.2 Emergence de la résistance chez les souches pathogènes.....	14
1.3 Liens entre émergence de la résistance chez des pathogènes et environnement.....	16
2 Dissémination de la résistance aux antibiotiques.....	18
2.1 Niveau moléculaire	18
2.1.1 Les mutations	18
2.1.2 Les transferts horizontaux	19
2.2 Dissémination de la résistance aux antibiotiques au sein des écosystèmes	21
2.3 Evaluation de l'antibiorésistance et de sa dissémination dans l'environnement.....	24
3 Les effluents anthropiques dans la dissémination de la résistance aux antibiotiques.....	26
3.1 Les effluents hospitaliers et leur influence sur la dissémination de la résistance aux antibiotiques	27
3.2 Déchets issus de la production carnée et leurs influences : cas particulier des abattoirs	29
3.3 Autres effluents anthropiques.....	31
4 Cas particulier des usines de traitement des effluents (STEP).....	33
4.1 Généralités sur les STEP	33
4.2 Effet des procédés de traitement des effluents sur la résistance aux antibiotiques..	34
4.3 Les procédés d'épuration avancés et leur influence sur l'antibiorésistance.....	37
4.3.1 Présentation des procédés de traitement des eaux avancés utilisés au cours de cette étude.....	37
4.3.2 Influences des procédés de traitement avancés sur l'antibiorésistance.....	38
5 Implication des intégrons dans la dissémination de la résistance aux antibiotiques dans l'environnement	41
<i>Integron involvement in environmental spread of antibiotic resistance</i>	<i>43</i>
6 Synthèse.....	59

RESULTATS ET DISCUSSION63

1 Estimation de la concentration d'IR dans des matrices anthropiques, et influences des procédés de traitement..... 67

1.1 Matériels et méthodes.....	69
1.1.1 Caractéristiques générales des différents points de prélèvement étudiés.....	69
1.1.1.1 Les centres hospitaliers	70
1.1.1.1 Les zones urbaines.....	72
1.1.1.2 Les abattoirs	72
1.1.1.3 Les STEP à boues activées	73
1.1.1.4 Pilotes de traitement avancé des effluents hospitaliers.....	74
1.1.1.5 Eaux de surface	75
1.1.1.6 Lisier et fumier.....	77
1.1.2 Méthode de prélèvement et conditionnement	77
1.1.2.1 Prélèvement des eaux	77
1.1.2.2 Prélèvement des matrices solides	77
1.1.3 Biologie moléculaire	78
1.1.3.1 Extraction des acides nucléiques.....	78
1.1.3.2 PCR en temps réel	79
1.1.3.3 Imagerie par microscopie confocale	80
1.1.3.4 Analyse de la diversité bactérienne par PCR-DGGE	80
1.1.3.5 Analyses physicochimiques.....	81
1.2 Résultats et discussion.....	83
1.2.1 Estimation des IR dans les matrices anthropiques	83
1.2.1.1 Concentrations des IR dans les matrices liquides et solides	83
1.2.1.1.1 Les matrices liquides.....	83
1.2.1.1.2 Les matrices solides.....	86
1.2.1.2 Abondances relatives des IR dans les matrices liquides et solides	89
1.2.1.2.1 Les matrices liquides.....	89
1.2.1.2.2 Les matrices solides.....	92
1.2.2 Devenir des IR dans les matrices liquides des procédés conventionnels et avancés.	94
1.2.2.1 Stations d'épuration à boue activée (STEP).....	94
1.2.2.2 Influence de procédés avancés pour le traitement des effluents hospitaliers	97
1.2.2.2.1 Influence sur les concentrations de <i>Bact-16S</i> et d'IR.....	97
1.2.2.2.2 Influence sur l'abondance relative des IR.....	100
1.2.2.2.3 Analyse de la présence de bactéries par microscopie confocale.....	102
1.2.2.2.4 Analyse de la diversité bactérienne par PCR-DGGE	103
1.3 Conclusions	107

2 Evaluation dynamique de la morphologie des floes, de la diversité bactérienne, et des IR de classe 1 dans un réacteur à boues activées traitant les effluents d'un hôpital..... 109

Dynamic assessment of the floc morphology, bacterial diversity and integrons content of an activated sludge reactor processing hospital effluent..... 113

3 Impact quantitatif et qualitatif des effluents d'un hôpital sur la dissémination des intégrons de résistance..... 137

Quantitative and qualitative impact of hospital effluent on dissemination of the integrons pool 141

SYNTHESE ET CONCLUSIONS DES TRAVAUX.....169

1 Pertinence et faisabilité de l'évaluation globale de l'antibiorésistance en utilisant les IR comme marqueur génétique..... 172

2 Mesure globale des quantités d'IR dans des effluents issus de différentes activités anthropiques..... 174

3 Caractérisation quantitative et qualitative de l'impact d'un effluent hospitalier sur la dissémination des IR 177

4 Efficacité de procédés de traitement avancé sur le traitement des effluents hospitaliers 181

5 L'impact du traitement des effluents hospitaliers sur la biomasse bactérienne active des procédés biologiques..... 183

PERSPECTIVES187

BIBLIOGRAPHIE195

Annexes –1 : Informations supplémentaires de l'article : « *Dynamic assessment of the floc morphology, the bacterial diversity and the class 1 integrons in an activated sludge reactor processing a hospital effluent* » 213

Annexes –2 : Informations supplémentaires de l'article : « *Quantitative and qualitative impact of hospital effluent on dissemination of the mobile integron pool* » 233

Annexes –3 : Publications, communications, formations 249

LISTE DES ABREVIATIONS

AAC :	Acétyltransférases
ADN :	Acide DésoxyriboNucléique
ANR :	Agence nationale de la recherche
ANSES :	Agence national de la sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail
ANT :	Nucléotidyltransférases
APH :	Phosphotransférases
ARNr :	ARN ribosomique
<i>Bact-16S</i> :	Estimation du nombre de bactéries calculé à partir du nombre de gènes codant pour l'ARNr 16S divisé par le nombre moyen de copies de ce gène par bactérie (4,1) : $Bact-16S = \text{nombre de gène codant pour l'ARNr-16S} \div 4,1$
BàM :	Bioréacteur à membrane
BHA :	Bactérie hétérotrophe aérobie
CAG :	Charbon actif granulaire
CAP :	Charbon actif en poudre
CG :	Cassette de gène
DBO5 :	Demande biochimique en oxygène à 5 jours
DCO :	Demande chimique en oxygène
DDD :	Defined daily dose (dose définie journalière)
DEFIViande :	Développement environnemental de la filière viande
DGGE :	Denaturing gradient gel electrophoresis (électrophorèse sur gel en gradient dénaturant)
DN :	Dénitification
E :	Entrée de la station d'épuration
<i>E. coli</i> :	<i>Escherichia coli</i>
EH :	Equivalent habitant
ERE :	Entérocoque résistant à l'érythromycine
ERV :	Entérocoque résistant à la vancomycine
FS :	Filtration sur sable
ICE :	Integrative and conjugative element (élément intégratif et conjugatif)
IM :	Intégron mobile
INTERREG :	Inter-régionalité
IR :	Intégron de résistance, nommé également intégron mobile (IM)
ISI :	Institute for scientific information (institut pour l'information scientifique)
MDR :	Multidrug resistance (multirésistance aux antibiotiques)
MES :	Matière en suspension
MF :	Microfiltration
NC :	Non communiqué

ND :	Non déterminé
NWE :	North-West Europe (Europe du Nord-Ouest)
OMS :	Organisation mondiale de la santé
PCR :	Polymerase chain reaction (réaction de polymérisation en chaîne)
PILLS :	Pharmaceutical input and elimination from local sources (entrée et élimination des produits pharmaceutiques à la source)
S :	Sortie de la station d'épuration
SARM :	<i>Staphylococcus aureus</i> résistant à la méticilline
SIDA :	Syndrome d'immunodéficience acquise
SIPIBEL :	Site pilote de Bellecombe
STEP :	Station d'épuration
TAE :	Tris acétate EDTA (acide éthylène diamine tétraacétique)
UF :	Ultrafiltration
UFC :	Unité formant une colonie
UV :	Ultraviolet

LISTE DES ABREVIATIONS SPECIFIQUES AUX POINTS DE PRELEVEMENTS

A1 :	Abattoir 1
A2 :	Abattoir 2
E1-FC :	Etang 1 « France-Centre »
E2-FC :	Etang 2 « France-Centre »
E-A1 :	Effluent de l'abattoir 1
E-A2 :	Effluent de l'abattoir 2
E-A3 :	Effluent de l'abattoir 3
H-AL :	Hôpital d'Allemagne
H-EB :	Hôpital « d'Ecosse-Borders »
H-EBG :	Unité de soins gériatrique de l'hôpital « d'Ecosse-Borders »
H-EG :	Hôpital « d'Ecosse-Glasgow »
H-EGG :	Hôpital gériatrique « d'Ecosse-Glasgow »
H-FC :	Hôpital « France-Centre »
H-FSE :	Hôpital « France-Sud-Est »
H-HO :	Hôpital Hollande
H-LU :	Hôpital du Luxembourg
H-SU :	Hôpital Suisse
P-AL :	Pilote d'Allemagne
P-HO :	Pilote de Hollande
P-LU :	Pilote du Luxembourg
R1-FC:	Rivière 1 « France-Centre »
R2-FC:	Rivière 2 « France-Centre »
R3-FSE:	Rivière 3 « France-Sud-Est »
S-A1:	Station d'épuration de l'abattoir 1
S-A2 :	Station d'épuration de l'abattoir 2
S-A3 :	Station d'épuration de l'abattoir 3
S-FC:	Station d'épuration « France-Centre »
S-FSE:	Station d'épuration « France-Sud-Est »
U-EB :	Urbain « Ecosse-Borders »
U-FC :	Urbain « France-Centre »
U-FO :	Urbain « France-Ouest »
U-FSE :	Urbain « France-Sud-Est »

INTRODUCTION

La découverte des antibiotiques est très récente et leur première utilisation thérapeutique ne remonte que vers la fin de la première moitié du XX^{ème} siècle. Avancée pionnière de la médecine contemporaine, l'introduction des antibiotiques a contribué à la progression de l'espérance de vie observée dans la dernière partie du XX^{ème} siècle selon l'organisation mondiale de la santé (OMS) (<https://apps.who.int>, aide-Mémoire, No 194, Janvier 2002). Cependant, peu après leurs premières utilisations, les premiers cas de souches résistantes furent identifiées : en 1939 pour les résistances aux sulfonamides, 1941 pour celles à la pénicilline, et 1946 pour celles à la streptomycine (Wax, 2008). L'apparition de souches résistantes n'a pas posé de problème tant que de nouvelles molécules étaient régulièrement développées, mais la réduction de la découverte de nouvelles cibles thérapeutiques vers la fin des années 70 et l'augmentation en parallèle du nombre de bactéries pathogènes résistantes et multirésistantes, ont sérieusement compromis l'efficacité des molécules actuelles. Aux Etats-Unis en 2006, 18 964 décès liés aux infections par des souches de *Staphylococcus aureus* résistantes à la méticilline (SARM) ont été recensés. La comparaison avec les 14 627 décès infligés par le syndrome d'immunodéficience acquise (SIDA) dans le même pays et la même année, souligne le problème de santé publique majeur lié à une seule souche multi-résistante d'un pathogène dans un pays industrialisé (Sommer *et al.*, 2009). Par ailleurs pour un hôpital, les coûts liés à la résistance aux antibiotiques s'élèveraient au minimum à 13,35 millions de dollars par an (Roberts *et al.*, 2009). La maîtrise de la résistance aux antibiotiques est ainsi devenue un enjeu de santé publique prioritaire dans de nombreux pays industrialisés.

L'intérêt suscité par les enjeux liés à la résistance aux antibiotiques a mené de plus en plus de chercheurs à travailler sur le sujet, aboutissant à la découverte de nombreux mécanismes d'adaptation bactérienne. Parmi les modalités d'acquisition de la résistance aux antibiotiques, le transfert horizontal de gènes est un élément-clé. Différents éléments génétiques sont impliqués dans ce transfert de gènes. A côté des plasmides et des transposons, les intégrons, plus récemment décrits vers la fin des années 80, jouent un rôle majeur dans l'acquisition et l'expression de gènes de résistance aux antibiotiques, notamment chez les bactéries à Gram négatif. Aujourd'hui, alors que l'implication des intégrons dans l'adaptation bactérienne au-delà de la résistance aux antibiotiques est avérée, le rôle d'une partie de ces intégrons, parfois nommés intégrons de résistance (IR), dans la dissémination de la résistance aux antibiotiques et notamment chez des souches d'intérêt clinique est majeur.

Au cours des 10 dernières années, la problématique de la résistance aux antibiotiques s'est étendue au-delà des contextes cliniques et vétérinaires, et le milieu environnemental est

Introduction

devenu de plus en plus étudié à la fois comme récepteur et source de l'antibiorésistance. Ainsi une augmentation globale de la résistance aux antibiotiques dans l'environnement serait observée. Bien que les causes et les facteurs restent encore mal connus, cette augmentation est principalement attribuée à la pollution anthropique aussi bien par des facteurs biotiques qu'abiotiques.

Dans l'optique d'une compréhension des mécanismes de la résistance aux antibiotiques et donc, d'une certaine façon de son contrôle, la détection des IR peut être primordiale. Ainsi différentes approches peuvent être menées, soit en terme de bilan (mesure de l'antibiorésistance sur des sites anthropisés, tels que des sites d'activités de soins, des bassins versants, des lieux d'élevage, des sites d'activités agro-alimentaires), soit en terme d'évaluation des risques (notamment dans le cadre de la réutilisation des eaux), soit en terme de procédés (modifications de traitements existants, désinfection).

L'objectif du travail présenté est de caractériser la dissémination globale de l'antibiorésistance dans l'environnement au travers de :

- L'évaluation de la faisabilité de la mesure globale de l'antibiorésistance en utilisant les IR comme biomarqueur.
- L'estimation des quantités de ce biomarqueur dans des effluents issus de différentes activités (hospitalières, industrie de production/transformation de la viande). Cette partie s'intègre dans le programme de recherche de l'ANR ECOTECH DEFIViande et dans le programme de recherche SIPIBEL (<http://www.graie.org/graie/sipibelpublic/a-sipibel.htm>).
- La caractérisation de l'efficacité de procédés de traitement des effluents d'établissements de soins sur la dissémination des IR, ces effluents étant considérés comme des *points chauds* potentiels. Cette étude est menée dans le cadre du programme INTERREG IVB NWE PILLS.
- La mise en exergue de l'impact d'effluents hospitaliers sur la biomasse bactérienne active des procédés biologiques traditionnels des stations d'épuration (STEP) urbaines, travaux menés en collaboration avec les recherches doctorales de Moussab Alrhoun.

Le présent manuscrit est divisé en :

Une **synthèse bibliographique** des travaux récents dans ces domaines transversaux avec :

- Une vue d'ensemble sur l'émergence de la dissémination de la résistance aux antibiotiques à différentes échelles.
- Une synthèse sur l'état des recherches effectuées sur la résistance aux antibiotiques dans les effluents anthropisés et plus particulièrement sur l'influence des effluents hospitaliers et d'abattoirs dans la dissémination de l'antibiorésistance.
- Un résumé des études réalisées sur l'effet des procédés de traitement des effluents sur la résistance aux antibiotiques.
- Un point sur l'implication des IR en tant que supports génétiques de la dissémination de la résistance aux antibiotiques dans l'environnement. Cette partie est présentée sous la forme d'une revue publiée dans *Frontiers in microbiology* en 2012.

Une partie **résultats** et discussion avec quatre volets:

- Le bilan quantitatif des IR dans un panel d'effluents et de résidus biologiques solides afin d'avoir une vue d'ensemble, et de cibler les activités pour lesquels le risque de dissémination de l'antibiorésistance semble important. L'efficacité des procédés de traitement classiques et avancés des effluents est décrite dans cette partie.
- L'influence d'un effluent hospitalier sur la biomasse épuratrice à l'échelle pilote. Ces travaux sont présentés sous la forme d'un article soumis à publication.
- L'impact d'un effluent hospitalier sur la dissémination des IR et leur contenu en cassettes de gène (CG) de résistance, évalué au niveau du petit cycle de l'eau (de l'effluent jusqu'à la rivière). Ces travaux sont également présentés sous la forme d'un article soumis à publication.

Finalement, une synthèse et les conclusions générales des différents résultats et discussions abordés au cours de ce manuscrit seront présentées, avant de conclure ce manuscrit sur quelques perspectives comme autant de propositions de suites à ce travail.

ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

1 EMERGENCE DE LA RESISTANCE AUX ANTIBIOTIQUES, ET RELATION AVEC L'ENVIRONNEMENT.

1.1 Origines et fonctions des antibiotiques et de l'antibiorésistance

1.1.1 Les antibiotiques

Le terme d'antibiotique est utilisé pour définir toute molécule organique inhibant ou détruisant des bactéries. Pour cela, les antibiotiques agissent par interaction avec des cibles bactériennes spécifiques afin d'inhiber des voies métaboliques majeures. Les cibles les plus courantes sont impliquées dans la synthèse de la paroi bactérienne, la synthèse des protéines, ou la réplication et la synthèse d'ADN. Selon les cibles d'action ou la nature chimique des molécules, une vingtaine de classes d'antibiotiques sont distinguées, parmi lesquelles une dizaine est plus couramment employée, comme les β -lactamines, les aminoglycosides, les tétracyclines, les quinolones, les sulfonamides, les macrolides... Une grande partie des antibiotiques utilisés en thérapeutique est soit directement synthétisée par des microorganismes, ou soit dérivée de molécules produites par ces microorganismes. Quelques microorganismes environnementaux comme les bactéries du genre *Streptomyces*, ou des champignons du genre *Penicillium* contribuent à la majeure partie de la production de ces antibiotiques. Néanmoins certaines molécules, comme les sulfonamides, le triméthoprim, le chloramphénicol, la ciprofloxacine sont des antibiotiques synthétiques.

L'origine et la fonction des antibiotiques naturels sont encore mal connues. Certaines voies de biosynthèse d'antibiotiques auraient déjà existé il y a plus de 240 millions d'années (Baltz, 2008). Concernant leur rôle dans l'environnement, ils fourniraient un avantage sélectif pour les microorganismes producteurs dans la compétition pour des niches écologiques. Cette vision peut même s'étendre jusqu'aux organismes supérieurs, tels que les plantes, qui produisent de manière constitutive des molécules antibiotiques leur assurant une protection naturelle et efficace contre des bactéries pathogènes. Cependant, des données récentes semblent indiquer que la fonction originelle de certains antibiotiques serait tout autre que celle qu'on leur a attribuée. Ainsi pour certains antibiotiques, il a été montré qu'à des concentrations sub-inhibitrices, c'est-à-dire en deçà du seuil de toxicité bactérienne et correspondant probablement aux concentrations retrouvées dans l'environnement, ces molécules agiraient comme des agents de signalisation bactérienne (Fajardo et Martínez, 2008).

1.1.2 L'antibiorésistance

La résistance aux antibiotiques par les bactéries est conférée par des mécanismes résumés dans la figure 1 : certains permettent de déjouer les interactions antibiotique/cible par modification de la cible ou de l'antibiotique, d'autres permettent l'élimination de l'antibiotique de la cellule ou d'en empêcher leur intrusion.

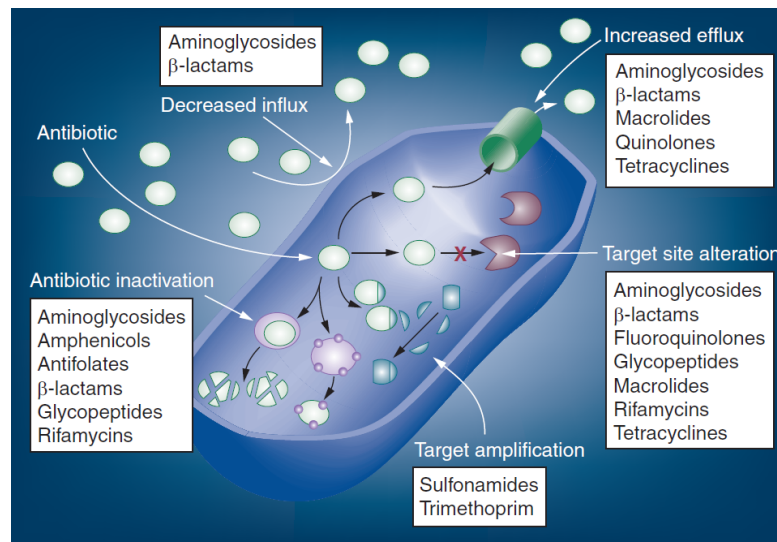


Figure 1 : Présentation des mécanismes de résistance aux antibiotiques par les bactéries. D'après Schmieder et Edwards (2012).

Pour chacun des mécanismes, plusieurs familles et sous-groupes de protéines peuvent être impliqués (tableau 1). Cette diversité mécanistique et enzymatique se traduit par une grande diversité de gènes impliqués dans la résistance aux antibiotiques. Par exemple pour les aminoglycosides, 4 types de mécanismes de résistance ont été décrits, parmi lesquels l'inactivation de l'antibiotique est très fréquente chez les souches résistantes. Cette inactivation peut être réalisée par 3 types d'enzymes différentes : les acétyltransférases (AAC), les nucléotidyltransférases (ANT), et les phosphotransférases (APH), pour lesquelles plusieurs sous-familles existent selon la réaction catalysée. Pour les AAC, l'acétylation des aminoglycosides peut être catalysée en 4 positions différentes. Ainsi 4 groupes d'AAC sont décrites (AAC(1), AAC(3), AAC(2'), et AAC(6')), qui selon leurs substrats sont regroupées en sous-groupes, pouvant aller jusqu'à 9 déclinaisons pour les AAC(3). Finalement chacune de ces déclinaisons d'enzymes est codée par des gènes pour lesquels jusqu'à 50 variants ont été décrits. Pour les β -lactamines, environ 1 253 variants de gènes ont été proposés comme conférant une résistance acquise (tableau 1).

Tableau 1 : Exemples de la diversité protéique et génétique impliquée dans la résistance acquise à certaines familles d'antibiotiques. Tableau réalisé à partir des revues bibliographiques de Ramirez et Tolmasky (2010) et Mullany *et al.* (2011)

Famille d'antibiotique	Mécanisme	Protéines	nombre de variants de gène	exemple de famille de gène
Aminoglycosides	Inactivation de l'antibiotique	Acétyltransférases	80	<i>aacA, sat</i>
		nucléotidyltransférases	37	<i>aadA, aadB</i>
		Phosphotransférases	32	<i>aphA</i>
		Méthyltransférase	9	<i>rmt</i>
β-lactamines	Inactivation de l'antibiotique	β-lactamase, "Amber classA"	594	<i>bla_{BEL}, bla_{TEM}, bla_{CTX-M}, bla_{SHV}, bla_{GES}</i>
		β-lactamase, "Amber classB"	219	<i>bla_{IMP}, bla_{VIM}</i>
		β-lactamase, "Amber classC"	216	<i>bla_{CMY}</i>
		β-lactamase, "Amber classD"	224	<i>bla_{OXa}</i>
Chloramphénicol	Inactivation de l'antibiotique	acétyltransférases type A	16	<i>catA</i>
		acétyltransférases type B	6	<i>catB</i>
	Efflux	-	8	<i>cmlA, floR, fexA, cmrA</i>
Quinolones	Protection de la cible	protéines de la famille des "pentapeptide repeat protein"	8	<i>qnrA</i>
			32	<i>qnrB</i>
			1	<i>qnrC</i>
			1	<i>qnrD</i>
			4	<i>qnrS</i>
Tetracyclines	Efflux	-	26	<i>tet</i>
	Protection de la cible	-	11	<i>tet</i>
Thriméthoprimés		dihydrofolate réductase	41	<i>dfrA, dfrB</i>

Dans des environnements n'ayant aucun impact anthropogénique, l'analyse fonctionnelle de gènes par des approches métagénomiques¹ a montré la présence naturelle de déterminants génétiques impliqués dans des mécanismes d'efflux ou d'inactivation d'antibiotiques (Schmieder et Edwards, 2012). Plus généralement, une grande diversité de gènes de résistance y est détectée (D'Costa *et al.*, 2006; Allen *et al.*, 2010; Schmieder et Edwards, 2012). Ainsi, l'environnement constituerait un vaste réservoir de déterminants génétiques indirectement ou directement impliqués dans la résistance aux composés antimicrobiens, et plus couramment nommé sous le terme de « résistome » (Wright 2007; Allen *et al.* 2010). Ce résistome serait très ancien. Il a été estimé que l'apparition de certains déterminants impliqués dans la résistance aux antimicrobiens serait antérieure à l'émergence de la vie terrestre, mais les données restent encore parcellaires. Par exemple, une estimation sur

¹ C'est-à-dire des approches fondées sur l'extraction des acides nucléiques totaux directement à partir de l'échantillon brut.

l'origine des β -lactamases, enzymes impliquées dans la résistance aux antibiotiques de la famille des β -lactamines, situerait celle-ci à 2 milliards d'années (Hall & Barlow 2004).

En parallèle des antibiotiques, le développement de l'apparition des gènes de résistance dans l'environnement et leur rôle dans ce contexte restent également controversés. Concernant leur fonction, bien que leur expression par des bactéries porteuses permette la survie de ces dernières en présence de concentrations inhibitrices de l'antibiotique correspondant, la présence et le maintien de ces gènes dans des environnements où les concentrations d'antibiotiques sont bien en dessous des concentrations toxiques sont encore mal expliqués. De même que les antibiotiques ont probablement des fonctions autres que la compétition, les gènes de résistance ont sans doute des rôles initiaux différents de la résistance. Ainsi pour certains de ces gènes, il a été montré que leur fonction originelle aurait été déviée suite à la pression de sélection exercée par de fortes concentrations d'antibiotiques. Comme décrit dans la revue de Martínez (2009), chez *Providencia stuartii*, une enzyme impliquée dans des modifications du peptidoglycane, la 2'-N-acétyltransférase, est également capable d'inactiver la gentamicine, un antibiotique de structure similaire à son substrat classique. De la même manière, il a été suggéré que les β -lactamases dériveraient de protéines impliquées dans la synthèse du peptidoglycane, les « penicillin-binding proteins », et qui sont elles-mêmes la cible des β -lactamases (Martínez *et al.*, 2009). Autre exemple, une grande famille de protéines rencontrées dans les bactéries environnementales, les « pentapeptide repeats proteins », présentent des similarités avec les protéines impliquées dans la résistance aux quinolones (antibiotiques synthétiques). La fonction des « pentapeptide repeats proteins » n'est pas complètement résolue, même si une de ces protéines a été rapportée comme étant un facteur de résistance à un inhibiteur de la topoisomérase, agissant de manière analogue aux fluoroquinolones (Vetting *et al.*, 2011). Ces études expliquent, en partie, la raison pour laquelle la résistance aux antibiotiques est apparue aussi vite après leurs premières utilisations thérapeutiques, et le fait que des gènes de résistance persistent même en absence de pression de sélection.

1.2 Emergence de la résistance chez les souches pathogènes.

Alors que les gènes de résistance sont ubiquitaires dans l'environnement, la résistance de souches pathogènes pour l'homme et l'animal (au cœur de la problématique) est très récente à l'échelle évolutive. En milieu clinique, parmi les premières observations réalisées sur le sujet, une étude japonaise datant des années 60 faisait état d'une épidémie de dysenterie due à des

souches de *Shigella* développant rapidement des phénotypes de multi-résistance, conjointement à l'introduction de nouveaux antibiotiques (Watanabe, 1963). Ces travaux faisaient partie des premiers à décrire le caractère transférable des résistances vers des souches sensibles (figure 2A).

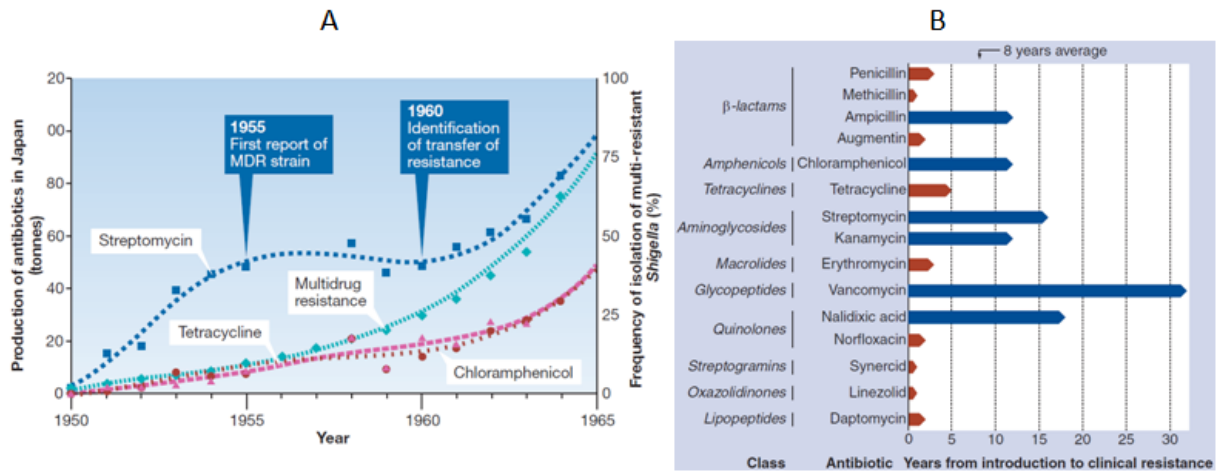


Figure 2 : (A) Relation entre le développement de la résistance aux antibiotiques chez des isolats de *Shigella*, impliqués dans des dysenteries au Japon, et l'introduction de l'antibiothérapie entre 1950 et 1965. En 1955, première description de résistance plasmidique. MDR : multirésistance. D'après Davies (2007). (B) Emergence de la résistance à certaines classes d'antibiotiques suite à leur introduction en thérapeutique. D'après Schmieder et Edwards (2012).

Rétrospectivement, l'évolution rapide entre l'introduction thérapeutique de nouvelles classes d'antibiotiques et l'apparition des premières souches pathogènes résistantes a été estimée en moyenne à 8 ans, comme l'illustre la figure 2B. Pour certaines classes de composés, les périodes de latence courtes (inférieures à 2 ans) montrent la rapidité de l'émergence de la résistance (Schmieder et Edwards, 2012).

Des études phylogénétiques montreraient que des mouvements de gènes de résistance entre bactéries commensales et pathogènes de l'homme seraient très récents. Ces mouvements, attribués aux transferts horizontaux de gènes entre bactéries (développés ci-après), auraient été accélérés au cours des 70 dernières années par la pression de sélection exercée par les antibiotiques (Aminov et Mackie, 2007). En effet, l'utilisation d'agents antimicrobiens au cours du siècle dernier est un des facteurs ayant participé à l'accroissement de la proportion de souches pathogènes résistantes, et la relation entre la consommation d'antibiotiques et l'émergence de souches résistantes est maintenant évidente (Albrich *et al.*, 1999; López-Lozano *et al.*, 2000; Harbarth *et al.*, 2001; Albrich *et al.*, 2004; Van De Sande-Bruinsma *et al.*, 2008). Comme l'illustre la figure 3, certains pays fortement consommateurs d'antibiotiques tels que la

France et l'Espagne présentaient entre 1994 et 2000, les plus fortes prévalences de souches de *Streptococcus pneumoniae* résistant aux macrolides et à la pénicilline.

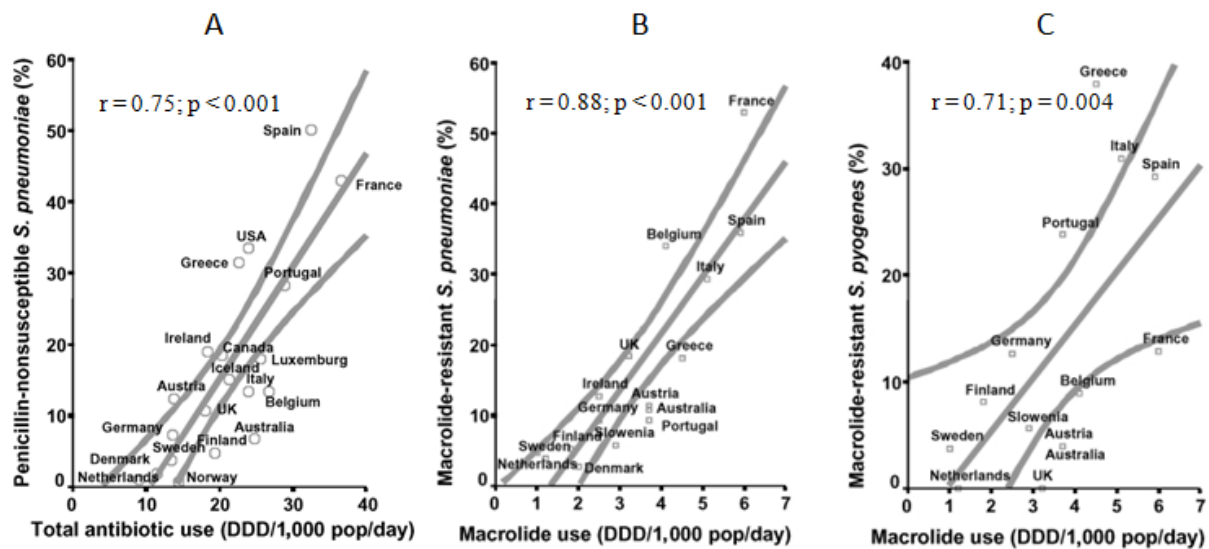


Figure 3 : (A) Représentation de la consommation totale d'antibiotiques en médecine ambulatoire en fonction de la prévalence de *Streptococcus pneumoniae* résistant à la pénicilline dans 20 pays industrialisés. (B) et (C) Relation entre l'utilisation des macrolides en médecine ambulatoire et la prévalence de (B) *Streptococcus pneumoniae* résistant aux macrolides dans 16 pays industrialisés, et de (C) *S. pyogenes* résistant aux macrolides, dans 14 pays industrialisés. Les paramètres de la droite de régression sont présentés sur chaque graphique avec des intervalles de confiance de 95%. Les données de consommation d'antibiotiques par pays sont basées sur leur quantité vendue en médecine ambulatoire, puis exprimées en dose journalière pour 1 000 habitants (DDD/1000 pop/day). D'après Albrich *et al.* (2004).

1.3 Liens entre émergence de la résistance chez des pathogènes et environnement.

La découverte dans l'environnement d'un vaste pool de déterminants génétiques impliqués dans de multiples résistances a suscité de nombreuses questions sur l'impact clinique de ce résistome. De plus, en parallèle de l'émergence clinique de souches antibiorésistantes, une augmentation globale de l'antibiorésistance dans l'environnement est observée (Knapp *et al.*, 2010). Plusieurs revues bibliographiques soulignent alors les liens plus ou moins évidents entre ce résistome environnemental et les gènes de résistance retrouvés chez des bactéries pathogènes (Witte 2000; Martínez 2008; Allen *et al.* 2010). Par exemple, certains gènes de

résistance aux quinolones portés par des plasmides (*qnrA*, *qnrS*) et retrouvés chez des souches pathogènes, ont été décrits dans des chromosomes de bactéries aquatiques appartenant respectivement aux espèces *Shewanella algae*, et *Vibrio splendidus*, soulignant les origines environnementales de ces gènes (Poirel *et al.*, 2005b; Cattoir *et al.*, 2007). De la même manière, un gène de résistance aux β -lactamines a été mis en évidence dans le chromosome d'une bactérie environnementale, *Kluyvera georgiana* (Poirel *et al.*, 2002). Plus récemment, une étude a confirmé l'évidence d'échanges récents de gènes de résistance entre des bactéries environnementales et des pathogènes cliniques, montrant que le résistome environnemental et les résistances chez les pathogènes ne sont pas indépendants (Forsberg *et al.*, 2012). Ces échanges ont alors eu lieu soit de bactéries environnementales vers des bactéries pathogènes, ou *vice versa*. Dans le premier cas, le résistome de l'environnement serait à l'origine des multirésistances retrouvées chez les bactéries pathogènes. Dans le second cas, il pourrait y avoir introduction de nouveaux mécanismes de résistances chez certains pathogènes opportunistes saprophytes et impliqués dans de nombreuses infections nosocomiales, tels les *Acinetobacter* spp. ou *Pseudomonas* spp.

2 DISSEMINATION DE LA RESISTANCE AUX ANTIBIOTIQUES

2.1 Niveau moléculaire

Dans la résistance aux antibiotiques, il faut différencier 2 types de résistance : **la résistance naturelle** et la **résistance acquise**. La résistance naturelle correspond à la résistance de toutes les souches d'une même espèce ou d'un même genre bactérien. Cette résistance est chromosomique et ne peut se transférer qu'à la descendance, d'une cellule mère vers ses cellules filles ; c'est le transfert vertical. Le caractère « immobile » ne présente pas un risque majeur dans la dissémination de la résistance, bien que les gènes impliqués puissent jouer un rôle de réservoir potentiellement mobilisable à l'échelle évolutive. Dans la problématique de la résistance aux antibiotiques, c'est l'acquisition de nouvelles résistances par des bactéries pathogènes qui en est la principale cause. La **résistance acquise** correspond ainsi à l'acquisition d'une résistance par une souche normalement sensible à l'antibiotique concerné.

L'apparition de résistance acquise chez une bactérie est associée à deux phénomènes : les mutations ou le transfert horizontal de gènes.

2.1.1 Les mutations

Les mutations se produisent de manière aléatoire au cours de la réplication du génome bactérien, par exemple par erreur de copie. Ces mutations sont le plus souvent silencieuses, n'engendrant pas de modification au niveau de la séquence primaire de la protéine codée. Il arrive cependant qu'elles conduisent à des modifications des propriétés physicochimiques de la protéine, comme l'affinité pour un type de substrat donné ou des différences de conformation. Dans ce cas, lorsque les mutations touchent des gènes dont les produits sont cibles d'antibiotiques, elles peuvent être responsables de l'apparition de nouveaux phénotypes de résistance chez la bactérie. La pression de sélection exercée par ces antibiotiques permet alors de favoriser les clones mutants résistants, et donc de sélectionner et d'enrichir dans une population des mutations au départ à caractère aléatoire. Celles-ci, conférant un bénéfice dans un environnement à forte pression de sélection, sont transmises à la descendance. A des concentrations inhibitrices, le stress causé par les antibiotiques sur les populations bactériennes a été montré comme augmentant les taux de mutation chez certaines espèces et statistiquement l'apparition de souches résistantes. De la même manière, il a été montré *in vitro* que des concentrations sub-inhibitrices en antibiotique augmentent la fréquence de mutation en

induisant un stress oxydatif pouvant aboutir à l'apparition de nouveaux phénotypes de multirésistance (Kohanski *et al.*, 2010). Cependant ce mécanisme d'acquisition de résistance ne représenterait que 10 à 20% des souches isolées en clinique et ne suffit pas à lui seul à expliquer l'ampleur et la rapidité de la dissémination de souches multirésistantes (Tenover, 2006).

2.1.2 Les transferts horizontaux

Les transferts horizontaux de gènes regroupent tous les mécanismes d'échange d'ADN intervenant en dehors de tous mécanismes de reproduction.

La mobilisation et les mouvements de gènes de résistance sont observés à plusieurs échelles (figure 4). Dans un premier temps, les gènes de résistance peuvent être portés par différents supports génétiques transférables, tels que des plasmides, des transposons, les cassettes de gène d'IRs. Au sein d'une bactérie, la diversité de combinaisons conférée par cette myriade de supports forme alors un pool de gènes de résistance variable d'une bactérie à l'autre. Au sein des niches écologiques, ces bactéries interagissent entre elles et avec d'autres espèces, permettant la dissémination de ces éléments génétiques porteurs de résistances. Toutes ces bactéries peuvent transiter *in fine* par les voies physiques *via* des courants aériens ou aquatiques, ou *via* des hôtes (homme, animaux), conduisant à une dissémination dans l'espace des gènes concernés.

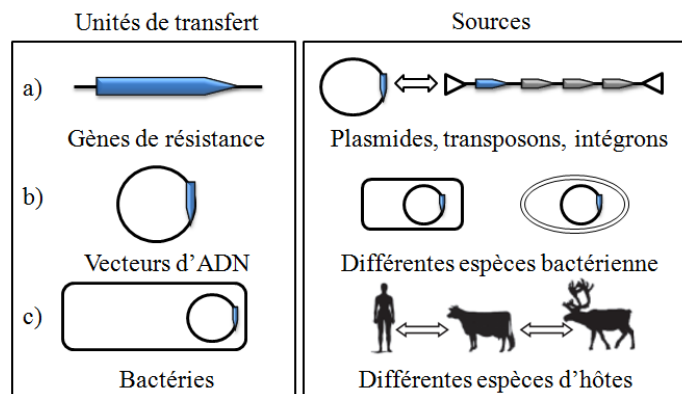


Figure 4 : Mouvement et mobilisation des gènes de résistance aux antibiotiques, les transferts horizontaux vus à différentes échelles. Modifié d'après Stokes & Gillings (2011).

Actuellement 3 modes de transfert horizontal de gènes permettant le mouvement d'ADN d'une cellule à une autre sont connus (figure 5) : la transformation, la transduction et la conjugaison.

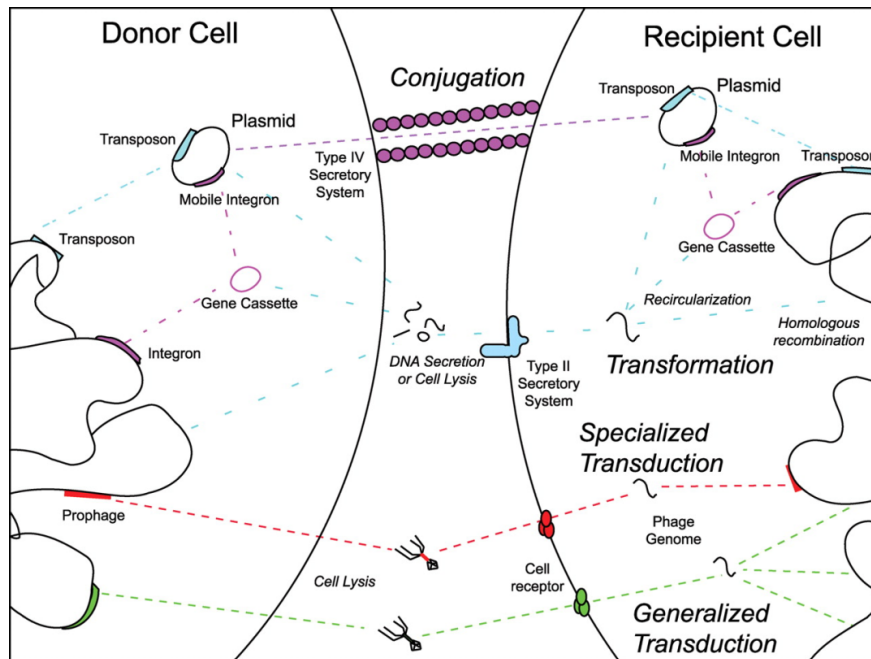


Figure 5 : Exemples de mécanismes de transfert intra et inter cellulaire de gène, faisant intervenir des mécanismes de conjugaison, de transduction et de transformation dans la mobilité de plasmide, transposons, d'IR. Les différents modes de transfert sont écrits en italique. D'après Zaneveld *et al.* (2008).

- La transformation : premier mécanisme de transfert horizontal décrit chez les procaryotes, ce processus implique l'intégration par des bactéries d'ADN linéaire ou circulaire extracellulaire par un mécanisme de translocation effectué par des protéines exprimées chez certaines bactéries naturellement compétentes pour ce type de transfert.
- La transduction : c'est une forme de transfert d'ADN qui s'effectue de manière indépendante par l'intermédiaire de virus bactériens appelés bactériophages (ou phage). A faible fréquence, les bactériophages peuvent accidentellement capturer un segment de l'ADN génomique bactérien hôte dans leur capsid et l'intégrer dans une nouvelle bactérie lors de l'infection et dans laquelle ce fragment pourra se recombinaison dans le génome de la bactérie hôte.
- La conjugaison: La conjugaison est probablement le mécanisme le plus important dans la dissémination de la résistance aux antibiotiques. Il implique le contact entre 2 bactéries *via* la formation d'un pont protéique.

Différents éléments génétiques mobiles sont impliqués dans les échanges de gènes de résistance aux antibiotiques:

- Les plasmides : ce sont des éléments extrachromosomiques capables de s'autorépliquer dans la bactérie. Tous les plasmides ne possèdent pas les déterminants génétiques

permettant leur propre transfert par conjugaison. Cependant ces plasmides, dit « non conjugatifs », peuvent être transférés d'une bactérie à l'autre au cours d'un événement de conjugaison. Eléments génétiques à part entière, les plasmides sont très divers en termes de taille, de structure, de transmission, d'histoire évolutive, et de phénotype porté.

- Les ICEs : ce sont des éléments génétiques mobiles qui, comme les plasmides, possèdent leur propre déterminants génétiques permettant de se transférer vers une cellule hôte *via* la conjugaison (Wozniak et Waldor, 2010). Cependant ils ne peuvent pas s'autorépliquer, et par conséquent ont besoin de s'intégrer dans un réplicon (plasmide ou chromosome) pour être maintenus au sein d'une bactérie. Sous le terme de ICE se regroupe toute une diversité d'éléments génétiques avec différentes propriétés et spectres d'hôtes, comprenant les transposons conjugatifs, et les îlots génomiques.
- Les intégrons: ces éléments génétiques sont impliqués dans l'acquisition, l'accumulation, et l'expression de gènes de résistance aux antibiotiques (Stokes & Hall, 1989). Ils ne sont doués ni d'autoréplication ni de systèmes de transfert et sont donc fréquemment retrouvés sur des plasmides ou des transposons. Les intégrons utilisent un système de recombinaison à site spécifique médiée par une intégrase pour capturer et exprimer des gènes (développés ci après dans le chapitre 5, p.39).

Plusieurs auteurs s'accordent pour suggérer que les gènes de résistance et les plateformes génétiques mobiles auxquels ils sont associés auraient circulé indépendamment et très lentement dans les populations bactériennes depuis des millénaires. Ainsi la prédisposition de certains gènes de résistance au sein de ces structures mobilisables aurait facilité l'émergence et la diffusion rapide de bactéries résistantes suite à la pression anthropique générée au cours de ces 60 dernières années. (Wright, 2010; Stokes & Gillings, 2011).

2.2 Dissémination de la résistance aux antibiotiques au sein des écosystèmes

Le transfert horizontal de gènes a probablement lieu dans tous les écosystèmes terrestres colonisés par les bactéries. Ainsi ces transferts ont été mis en évidence dans de nombreux écosystèmes, tels les sols, les rivières, les environnements marins, mais aussi les tubes digestifs d'insectes ou de mammifères (Aminov, 2011). L'analyse métagénomique de communautés bactériennes de cheminées hydrothermales, écosystèmes reclus dans les abysses, a montré la présence de nombreux gènes encodant des transposases, enzymes impliquées dans le transfert

d'ADN, suggérant l'importance probable des transferts horizontaux dans ces biosphères (Xie *et al.*, 2011).

Ainsi le transfert horizontal de gènes entre bactéries se fait de manière ubiquitaire dans l'environnement, et certains facteurs peuvent augmenter sa fréquence. Dans les sols, de nombreux facteurs biotiques (présence de vers de terre, de protozoaires...) ou abiotiques (pH, température...) ont été montrés comme influençant le transfert de plasmides (Sørensen *et al.*, 2005). Certains facteurs tels que les pratiques culturales favorisent le taux de transfert de plasmides dans les sols (Mølbak *et al.*, 2007; Toomey *et al.*, 2009) ; de même l'application d'amendement à base de lisier/fumier contribue aussi à augmenter localement les concentrations d'éléments génétiques mobiles, et les fréquences de transferts horizontaux (Gotz & Smalla, 1997; Heuer & Smalla, 2007). D'autres conditions, telles que le stress induit par les rayonnements ultra-violet (UV), le manque de nutriments, les concentrations sub-inhibitrices d'antibiotiques sont très fortement suspectées d'induire un transfert horizontal de gènes dans l'environnement (Aminov, 2011).

La dissémination de la résistance aux antibiotiques dans l'environnement peut être schématisée selon le modèle proposé par (Baquero *et al.*, 2008), où chaque écosystème représente un réacteur biologique dans lequel les échanges génétiques et les événements de recombinaison, influencés par les conditions biotiques et abiotiques, profilent l'évolution de l'antibiorésistance. Dans ce schéma, chaque réacteur est alors connecté au précédent par les déchets produits par ce dernier (figure 6).

Le **premier réacteur** est constitué par les microflore humaines et animales, composées d'environ 500 espèces bactériennes qui par exemple, soumises à la pression exercée lors de traitements antibiotiques, augmentent l'émergence et la proportion de souches bactériennes résistantes et multirésistantes. Cette émergence est d'autant plus rapide qu'elle est facilitée par le réservoir de gènes de résistance initialement présents dans l'appareil digestif humain (non soumis aux antibiotiques), et estimé à plusieurs centaines de gènes (Salyers *et al.*, 2004; Sommer *et al.*, 2009). Elle est aussi liée aux échanges d'ADN, favorisés par de nombreux facteurs tels que les fortes densités bactériennes (estimées à 10^{11} à 10^{12} bactéries par gramme de contenu du colon selon O'Hara et Shanahan (2006).

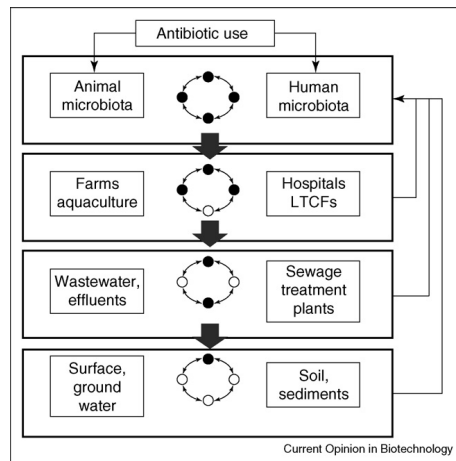


Figure 6 : Représentation des quatre principaux réacteurs impliqués dans la dissémination de la résistance aux antibiotiques dans l'environnement. Dans chaque réacteur, la mixité entre les bactéries commensales de l'homme et/ou de l'animal (point noir) avec le vaste microbiote de l'environnement (point blanc) combiné avec les transferts horizontaux (flèches), modèlent l'évolution de la résistance aux antibiotiques. A chaque étape, les contacts humains et animaux *via* différentes voies réintroduisent des bactéries. D'après (Baquero *et al.*, 2008).

Le **second réacteur** comprend tous les lieux où des facteurs, tels que les antibiotiques, augmentent la proportion de bactéries résistantes aux antibiotiques. Ceci en fait des lieux d'émergence, d'échange et de dissémination des gènes de résistance dans les populations.

Le **troisième réacteur** correspond aux eaux usées et résidus biologiques provenant des réacteurs précédents, tels que les STEP, les lagunes, les lisiers, les fumiers, où le mélange entre bactéries commensales et environnementales d'une part, et bactéries résistantes et sensibles d'autre part augmentent la probabilité des échanges entre bactéries, et par conséquent la dissémination de l'antibiorésistance.

Le **dernier réacteur** est constitué de tous les environnements naturels récepteurs des résidus du réacteur précédent. Ces environnements, constitués des milieux aquatiques et terrestres, sont composés pour les sols d'environ 400 à 10 000 espèces bactériennes, pour une densité de 10^7 à 10^8 bactéries par gramme selon certaines estimations (Wright, 2010). Comme dans le réacteur précédent, sous les contraintes biotiques et/ou abiotiques, ont lieu des échanges entre bactéries des réacteurs précédents et bactéries indigènes. Ces environnements jouent alors un rôle de récepteur, pouvant faire perdurer des mécanismes de résistance provenant des réacteurs précédents. Par ailleurs, au vu de l'origine environnementale d'un certain nombre de gènes de résistance (*cf.* chapitre I-A-1-b), ces environnements pourraient être aussi une source de mécanismes de résistances encore inconnus, pouvant être transmis à des bactéries provenant des réacteurs précédents.

Enfin, les produits issus de tout ce parcours peuvent être réintroduits *via* la chaîne alimentaire ou par contact physique dans le premier réacteur constitué par l'homme et l'animal, et ainsi parcourir de nouveau le circuit. A long terme cette boucle aboutit inexorablement à l'augmentation globale de l'antibiorésistance. Cependant cette représentation simplifiée ne traduit pas la complexité de la dissémination de la résistance. En particulier, elle ne prend pas en compte potentiellement les phénomènes de co-sélection, illustrés par exemple par la pollution en métaux lourds due à l'activité industrielle, ou les désinfectants qui influent sur l'augmentation de la résistance aux antibiotiques (Nemergut *et al.*, 2004; De Souza *et al.*, 2006; Wright *et al.*, 2008; Rosewarne *et al.*, 2010; Knapp *et al.*, 2011).

L'eau est un des principaux vecteurs physiques qui lie chacun de ces réacteurs, jouant un rôle crucial dans la dissémination de l'antibiorésistance (Taylor *et al.*, 2011; Lupo *et al.*, 2012). Pour éviter la coexistence de souches résistantes, de gènes de résistance, de structures génétiques impliquées dans l'acquisition et la dissémination de gènes, avec des pathogènes, il apparaît donc primordial de mieux comprendre et contrôler ces flux.

2.3 Evaluation de l'antibiorésistance et de sa dissémination dans l'environnement

Evaluer l'antibiorésistance totale dans un échantillon est extrêmement complexe dès lors que des centaines de déterminants génétiques sont impliqués. De plus, le caractère naturel ou acquis de la résistance complique l'évaluation de la dissémination de l'antibiorésistance, et la multitude d'éléments génétiques impliqués dans cette dissémination ne facilite pas la tâche.

Deux types d'approches peuvent être distinguées : *i*) les approches fondées sur la culture de bactéries, correspondant à la grande majorité des études ayant été réalisées, et *ii*) les approches fondées sur la détection de déterminants génétiques à partir des acides nucléiques directement extraits d'échantillons divers, et plus couramment appelées « approche métagénomique ».

Dans le cadre des effluents anthropiques, les études reposant sur la culture bactérienne se sont principalement focalisées sur l'isolement de bactéries d'intérêt clinique et connues pour être impliquées dans de nombreuses infections nosocomiales, telles que les entérocoques résistants à la vancomycine (ERV) et à l'érythromycine (ERE), les SARM, *Pseudomonas aeruginosa*, certaines espèces d'*Enterobacteriaceae* comme *E. coli*, *Enterobacter cloacae* et

Klebsiella pneumoniae présentant différents phénotypes de résistance. Ces méthodes permettent une caractérisation pointue de la résistance pour une espèce donnée ; toutefois elles ne prennent pas en compte tout le microbiote environnemental et qui, comme pour la microflore digestive, peut jouer un rôle important dans les échanges, et la conservation de l'information génétique (Sommer *et al.*, 2009; Salyers *et al.*, 2004). Les méthodes directes basées sur l'analyse des acides nucléiques totaux, plus récentes et donc moins répandues dans la littérature, permettent la détection, la quantification voire même la caractérisation de déterminants génétiques soit directement impliqués dans la résistance aux antibiotiques (*i.e.* les gènes de résistance), soit impliqués dans leur dissémination (*i.e.* les éléments génétiques mobiles). Chacune de ces approches, culture bactérienne ou méthode métagénomique, présente des avantages et des inconvénients qui sont résumés dans le tableau 2.

Tableau 2 : Avantages et inconvénients des méthodes basées sur la culture de bactéries et sur des approches métagénomiques dans l'étude de la résistance aux antibiotiques.

	Avantages	Inconvénients
Méthodes basées sur la culture de bactéries	<ul style="list-style-type: none"> - méthodes standardisées - données disponibles sur les prévalences et les profils de résistances de souches - caractérisation des profils de résistance d'une souche - détermination des niveaux de résistance exprimés - caractérisation des gènes résistances, de leur environnement génétique ainsi que des mécanismes de résistance - évaluation de la contamination d'un échantillon <i>via</i> des bactéries indicatrices. 	<ul style="list-style-type: none"> - ne rendent compte que d'une petite fraction de la diversité bactérienne réelle (<1% pour l'environnement) - ne prennent pas en compte les bactéries viables non cultivables - les données disponibles sont principalement basées sur des espèces bactériennes d'intérêt clinique - les méthodes employées d'une étude à l'autre peuvent varier (antibiotiques testés, définition de la multirésistance, utilisation de milieux sélectifs), rendant complexe la comparaison des résultats - méthodes laborieuses pour être représentatives d'un échantillon, ne permettant pas l'analyse d'un grand nombre d'échantillons à la fois
Méthodes basées sur des approches métagénomiques	<ul style="list-style-type: none"> - méthodes actuelles les plus représentatives, prenant en compte le plus d'espèces bactériennes. - sensibilité - possibilité d'analyser la diversité et les espèces bactériennes présentes - détection, quantification et caractérisation des gènes et structures génétiques impliqués dans la résistance - rapidité permettant l'analyse d'un grand nombre d'échantillons. 	<ul style="list-style-type: none"> - biais liés aux méthodes d'extraction des acides nucléiques - pour les méthodes comprenant une étape de PCR : biais d'affinité des amorces et de leur conceptions basées sur les connaissances disponibles. - ne donnent pas d'information directe sur les espèces bactériennes impliquées dans la résistance ainsi que leur phénotype de résistance - prend en compte les bactéries mortes et vivantes

3 LES EFFLUENTS ANTHROPIQUES DANS LA DISSEMINATION DE LA RESISTANCE AUX ANTIBIOTIQUES

Au cours de la dernière décennie, le nombre d'études portant sur la résistance aux antibiotiques dans les effluents d'origine anthropique n'a cessé de croître, soulignant l'intérêt de la communauté scientifique pour l'étude de la dissémination de l'antibiorésistance *via* les effluents anthropiques (figure 7).

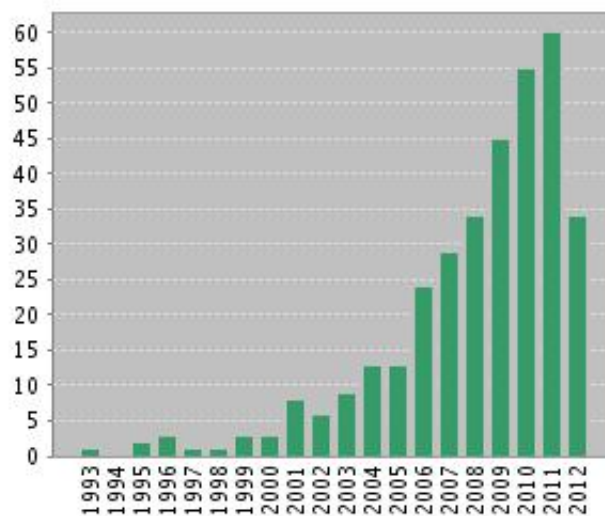


Figure 7 : Nombre de publications traitant de la résistance aux antibiotiques dans les eaux usées. L'histogramme a été obtenu sur le site de l'ISI web of science le 29-07-12 pour tous les sujets de publication contenant les mots « antibiotic resistance » avec « wastewater ».

Ces études ont mis en évidence dans les effluents anthropiques (influent, effluent, et boues de STEP, fumiers/lisiers...), une grande variété de bactéries d'intérêt clinique résistantes et multirésistantes à de nombreux antibiotiques. Elles ont également montré la présence dans ces effluents de nombreux gènes de résistance et de structures génétiques impliquées dans la dissémination et l'acquisition de ces gènes, tels que plasmides, transposons et IRs. Cependant, la diversité des méthodes employées rend difficile la comparaison des études entre elles ainsi que la généralisation des résultats.

La majorité des études s'est focalisée sur les effluents arrivant dans les STEP et/ou les impacts des effluents de STEP sur les milieux récepteurs, à savoir les rivières et les sols (Goñi-Urriza *et al.*, 1999; Iwane *et al.*, 2001; Volkmann *et al.*, 2004; Poole *et al.*, 2005; Da Silva *et al.*, 2006; Auerbach *et al.*, 2007; Ferreira da Silva *et al.*, 2007; Caplin *et al.*, 2008; da Costa *et al.*, 2008; Taviani *et al.*, 2008; Łuczkiwicz *et al.*, 2010; Novo & Manaia, 2010; Figueira *et al.*, 2011; Figueira *et al.*, 2012). De ce fait, l'implication et la contribution dans la dissémination de

l'antibiorésistance de certains effluents provenant de biotopes, comme les hôpitaux ou les fermes d'élevage considérés comme des *points chauds* de la diffusion de l'antibiorésistance dans l'environnement, reste encore floue.

3.1 Les effluents hospitaliers et leur influence sur la dissémination de la résistance aux antibiotiques

Les hôpitaux sont des lieux de consommation d'antibiotiques et de dissémination de l'antibiorésistance qui est favorisée par la densité des individus dans ces structures augmentant ainsi le risque de transmission croisée. Conséquemment, de fortes prévalences en bactéries multirésistantes sont observées en milieu hospitalier (Albrich *et al.*, 1999; Vander Stichele *et al.*, 2006; Kunz et Brook, 2010). Les effluents hospitaliers peuvent donc représenter une importante voie d'entrée de souches multirésistantes dans l'environnement et participer à la dissémination de l'antibiorésistance dans l'environnement.

De nombreuses souches bactériennes d'intérêt clinique, présentant ou non des phénotypes de résistance ou de multirésistance ont été isolées et caractérisées à partir d'effluents hospitaliers. Plusieurs de ces études font ressortir la prévalence du caractère de multirésistance comme étant très élevée dans les effluents hospitaliers, selon les souches, les résistances et la définition de la multirésistance considérée (Chitnis *et al.*, 2004; Passerat *et al.*, 2010; Sharma *et al.*, 2010; Fuentefria *et al.*, 2011). Par ailleurs certaines structures génétiques comme les IRs, ont été retrouvées à de fortes proportions ($\approx 50\%$) dans un panel de 486 *Enterobacteriaceae* isolées d'effluents hospitaliers (Guo *et al.*, 2011). Cependant ces résultats sont probablement biaisés par l'utilisation de milieux sélectifs contenant des antibiotiques pour l'isolement des souches, et une étude réalisée sur un plus petit panel de 50 souches d'*E. coli* isolées d'un hôpital rapporte des prévalences de 6% en IR (Oberlé *et al.*, 2012). La même étude retrouve de plus hauts taux de prévalence d'IR (36%), mais aussi d'*E. coli* résistantes et multirésistantes dans les effluents d'une maison de retraite, avec des prévalences respectives de 82% et 38% (*vs.* 16% et 10% pour l'effluent hospitalier). Les auteurs imputent ce résultat, en partie à une antibiothérapie plus longue, due à des temps de séjour des patients plus long dans ces établissements. En outre, pour *E. coli*, il ne semble pas y avoir de relations entre la quantité d'antibiotiques consommés à l'hôpital, et la prévalence des souches résistantes ou multirésistantes retrouvées dans leurs effluents. De la même manière, il ne semble pas y avoir de relations entre les types d'antibiotiques consommés à l'hôpital, et les profils de résistance

Etude bibliographique

des souches retrouvées dans leur effluents (Diwan *et al.*, 2010; Oberlé *et al.*, 2012). Ceci serait principalement expliqué par une multitude de facteurs comme les propriétés pharmacodynamiques des composés, plus ou moins métabolisés par les organismes, plus ou moins persistants dans l'environnement, mais aussi la présence d'éléments génétiques pouvant conférer plusieurs phénotypes de résistance (IRs, plasmides, transposons) (Oberlé *et al.*, 2012).

Quelques comparaisons entre les résistances aux antibiotiques dans des effluents urbains et des effluents hospitaliers montrent que les proportions de certaines souches résistantes ou de gènes de résistance sont plus importantes dans ces derniers. Passerat *et al.* (2010) a décrit 71% de souches d'*E. coli* isolées d'un effluent hospitalier présentant au moins une résistance aux antibiotiques testés, contre 41% dans les effluents arrivants dans la STEP municipale. De la même manière Schwartz *et al.* (2003) ont retrouvé des fréquences plus élevées de souches d'ERV et d'*Enterobacteriaceae* résistantes à la céfazoline dans un effluent hospitalier par rapport à l'effluent urbain. Par des approches métagénomiques, les mêmes auteurs ont détecté un gènes impliqués dans la résistance à la méticilline (*mecA*) uniquement dans des effluents hospitaliers (Schwartz *et al.*, 2003). Dans une autre étude, Börjesson *et al.* (2010) ont décrit des abondances relatives de gènes impliqués dans la résistance à la méticilline (*mecA*), à la tétracycline (*tetA* et *tetB*), et aux aminoglycosides (*aac(6')-Ie+aph(2'')*), plus élevées dans un effluent d'hôpital comparativement aux effluents arrivants à une STEP (l'abondance relative était basé sur la quantité d'acides nucléiques totaux). Cependant ces observations ne sont pas exhaustives, et certaines études ont retrouvé, dans certains cas, des prévalences en bactéries résistantes supérieures ou égales dans les effluents urbains. A titre d'exemple, une étude ayant comparé les prévalences d'ERV et ERE à partir d'un panel de 9 296 souches d'entérocoques isolées d'effluent d'hôpitaux et de STEP municipales de 3 pays Européens a retrouvé des prévalences très variables selon les pays et les résistances considérées, avec parfois des prévalences supérieures ou égales dans les effluents hospitaliers ou les effluents urbains (Blanch *et al.*, 2003). Les interprétations sur l'impact que peuvent avoir les effluents hospitaliers sur les STEP reste donc difficile à appréhender, du fait que, pour beaucoup de ces études, les effluents urbains pris en compte contenaient également les effluents des activités des hôpitaux analysés, ou bien les auteurs ne donnaient aucune indication quant à ces effluents (Blanch *et al.*, 2003; Schwartz *et al.*, 2003, 2006; Borjesson *et al.*, 2009; Passerat *et al.*, 2010).

D'autres études ont souligné un effet d'effluents hospitaliers dans la dissémination de souches bactériennes résistantes dans les réseaux d'eaux usées urbains (Reinthaler *et al.*, 2003; Chitnis *et al.*, 2004; Galvin *et al.*, 2010). Ainsi, il a été montré que dans une STEP traitant des

eaux urbaines recevant les effluents d'un hôpital, le taux de *E. coli* résistantes aux antibiotiques testés était plus important que dans deux autres STEP recevant uniquement des effluents urbains (Reinthalier *et al.*, 2003). Egalement, un taux plus important d'*E. coli* résistantes aux antibiotiques testés a été observé dans un effluent hospitalier par comparaison avec un effluent urbain (Galvin *et al.*, 2010). De plus, la proportion de ces bactéries dans le réseau urbain après regroupement des deux effluents était plus élevée, ceci ayant été précédemment décrit par (Guardabassi *et al.*, 1998), qui a observé que la prévalence d'*Acinetobacter* spp. résistantes à l'oxytétracycline augmentait dans le réseau d'eaux usées suite aux rejets d'un hôpital.

En 2004, Kümmerer a fait l'hypothèse que, au vu de la faible proportion d'effluents hospitaliers arrivant dans les STEP municipales (en général moins de 1%), leur contribution dans la dissémination de la résistance aux antibiotiques est probablement négligeable par rapport aux effluents domestiques. Son argumentation est en partie fondée sur une étude montrant que le nombre de bactéries résistantes retrouvées dans un effluent d'une unité de soins intensifs est équivalent à celui retrouvé dans les effluents arrivant à la STEP, et dans les effluents urbains sans l'activité médicale. Ces mêmes conclusions ont été faites par Passerat *et al.* (2010). D'autres résultats suggérant un impact moindre des activités hospitalières dans la dissémination de l'antibiorésistance ont montré que des souches de *P. aeruginosa* isolées des patients d'un hôpital ne sont pas les mêmes que celles retrouvées dans les effluents de l'hôpital, et qu'elles présentent des phénotypes de résistance différents (Tuméo *et al.*, 2008). De la même manière, des souches isolées dans un effluent hospitalier ne sont pas les mêmes que celles isolées des eaux de surface recevant les effluents traités de la ville (Fuentefria *et al.*, 2011).

Le rôle des effluents hospitaliers dans la dissémination de la résistance aux antibiotiques reste donc très controversé, et la standardisation des méthodes d'étude reste encore à définir.

3.2 Déchets issus de la production carnée et leurs influences : cas particulier des abattoirs

Les fermes de production animale représentent un autre biotope où, comme pour les milieux cliniques, la forte densité de bactéries commensales de l'animal soumises à la pression exercée par les antibiotiques, contribue à la dissémination de l'antibiorésistance. L'émergence de souches bactériennes résistantes dans ces filières provoque de sérieux problèmes de santé animale, et peut ainsi avoir des conséquences économiques. De plus les échanges avérés entre l'homme et l'animal surajoutent des problèmes potentiels de santé publique (van den Bogaard

et Stobberingh, 2000). En France, le suivi de la résistance aux antibiotiques dans la production animale fait l'objet d'un suivi régulier réalisé dans le cadre de plusieurs réseaux nationaux pilotés par l'ANSES, organisme chargé de la surveillance.

Bien que dans le cadre des résidus biologiques issus de la production animale il n'y ait pas de surveillance nationale de l'antibiorésistance à grande échelle, un grand nombre d'études scientifiques sur le sujet ont été réalisées. Leurs résultats sont souvent différents, mais les auteurs ont mis en évidence le risque environnemental lié principalement au lisier et fumier, notamment *via* l'épandage sur des sols agricoles (Jensen *et al.*, 2001; Binh *et al.*, 2007; Heuer *et al.*, 2008; Byrne-Bailey *et al.*, 2009, 2010; Gaze *et al.*, 2011; Kopmann *et al.*, 2012).

Les déchets issus des abattoirs sont conséquemment une autre source potentielle d'introduction de bactéries résistantes et de gènes de résistance dans l'environnement. Une fois l'animal abattu le contenu du tube digestif est éliminé, et les eaux de lavage et autres effluents de procédés de ces installations rejoignent, après des traitements plus ou moins élaborés, au mieux les réseaux urbains, avec le risque de dissémination des bactéries spécifiques des abattoirs.

Les études réalisées sur les abattoirs se sont principalement concentrées sur la dissémination de la résistance *via* la chaîne alimentaire (Barlow *et al.*, 2009, 2008), alors que la dissémination de la résistance dans l'environnement *via* les effluents a été moins investiguée. Cependant, certaines études ont décrit des phénotypes de résistance à de nombreux antibiotiques chez des souches de *Pseudomonas aeruginosa*, de *Campylobacter* spp., d'*Enterococcus* spp., d'*Aeromonas* et d'*Enterobacteriaceae* spp. ayant été isolées d'effluents d'abattoirs et/ou de STEP recevant des effluents d'abattoirs (Koenraad *et al.*, 1995; Martins da Costa *et al.*, 2006; Moura *et al.*, 2007; da Costa *et al.*, 2008; Araújo *et al.*, 2010; Igbinsosa *et al.*, 2012). Les prévalences de souches multirésistantes varient entre 37,5 et 100% selon les souches, les résistances testées et le nombre de résistances considéré.

Par ailleurs, une influence des effluents d'un abattoir sur la dissémination de l'antibiorésistance est suspectée (Koenraad *et al.*, 1995; Moura *et al.*, 2007). En effet il a été observé que, des *Campylobacter* isolés d'effluents d'un abattoir spécialisé dans la volaille et dans la STEP municipale recevant ces effluents présentent de plus fort taux de résistances aux antibiotiques de la famille des fluoroquinolones, comparés aux effluents d'une STEP municipale ne recevant aucun effluent d'abattoir. Les mêmes conclusions ont été tirées pour

des éléments génétiques tels que les IR et les plasmides. Ainsi, Moura *et al.* (2007, 2011) rapportent des prévalences en IR de 3,7% et de 30,7%, chez des souches d'*Aeromonas* et d'*Enterobacteriaceae*, respectivement isolées d'une STEP municipale et d'une STEP d'abattoir. Parmi les souches possédant des IRs, 46,7 et 62,5% de celles-ci provenant de la STEP municipale et d'abattoir respectivement sont résistantes à plus de 5 antibiotiques. La majorité des IR caractérisés sont associés à des gènes impliqués dans des résistances aux aminoglycosides, aux β -lactamines, à la streptomycine, au triméthoprime, au chloramphénicol et à la rifampicine. De plus, de nombreux plasmides conjugatifs à large spectre d'hôtes a été caractérisé dans ces souches (Moura *et al.*, 2012), ou détecté par des approches métagénomiques dans les deux STEP (Moura *et al.*, 2010). Toutes ces études montrent donc que les STEP d'abattoirs constituent potentiellement une source de dissémination de la résistance aux antibiotiques.

3.3 Autres effluents anthropiques

D'autres sources anthropiques ont été montrées comme impliquées dans dissémination de la résistance aux antibiotiques dans l'environnement. Par exemple, les fermes aquacoles (piscicultures), où les antibiotiques sont directement introduits dans l'eau *via* l'alimentation des poissons, sont impliquées dans la persistance de gènes de résistance et, plus globalement, dans l'augmentation de l'antibiorésistance dans les sédiments et/ou les eaux de rivière, bien que ces pratiques diminuent (Agersø et Petersen, 2007; Ndi et Barton, 2011; Tamminen *et al.*, 2011; Gao *et al.*, 2012a). Le rôle de l'arboriculture fruitière, où aux Etats-Unis l'oxytétracycline et la streptomycine sont vaporisées dans les cultures, a été beaucoup moins étudié et reste encore discuté même si certains auteurs ont rapporté des plus fort taux de résistance dans les sols traités comparativement à des sols non traités (McGhee et Sundin, 2011; McManus *et al.*, 2002).

Certains effluents industriels, et particulièrement les effluents d'usine de production d'antibiotiques ont été étudiés. Deux études mettent en évidence que plus de 97% des souches bactériennes isolées à la sorties de STEP traitant des effluents d'usines de production d'oxytétracycline ou de pénicilline sont multi-résistantes, et 80% des souches isolées de ces effluents sont résistantes à plus d'une dizaine des antibiotiques testés (Li *et al.*, 2009, 2010). D'autres auteurs ont mis en évidence l'impact d'effluents d'une usine pharmaceutique sur l'augmentation de la prévalence de souches d'*Acinetobacter* résistantes et multirésistantes aux antibiotiques dans un réseau d'eaux usées urbaines (Guardabassi *et al.*, 1998). Les usines de production d'antibiotiques ne sont pas les seules à avoir une influence sur l'émergence de la

Etude bibliographique

résistance aux antibiotiques dans l'environnement ; d'autres effluents d'usines induisant des pollutions aux métaux lourds, seraient également impliqués dans la dissémination de la résistance aux antibiotiques. En effet des phénomènes de co-sélection de résistances peuvent avoir lieu, soit par des éléments génétiques mobiles possédant des gènes de résistance aux métaux en question et des gènes de résistance aux antibiotiques, soit par des mécanismes d'efflux conférant un large spectre de résistance à la fois aux métaux et à certains antibiotiques (Nemergut *et al.*, 2004; De Souza *et al.*, 2006; Wright *et al.*, 2008; Rosewarne *et al.*, 2010; Knapp *et al.*, 2011).

4 CAS PARTICULIER DES USINES DE TRAITEMENT DES EFFLUENTS (STEP)

4.1 Généralités sur les STEP

Les STEP constituent l'interface entre les effluents d'origine anthropique et les milieux naturels. Ces structures, fondées sur un traitement secondaire biologique (c'est-à-dire mettant en œuvre un écosystème épurateur), ont été créées pour réduire dans un premier temps la matière organique avant son rejet dans l'environnement. La nécessité du traitement des nutriments, phosphore et azote provenant des effluents, ont mené à l'ajout de traitements tertiaires dans les chaînes de traitement (figure 8).

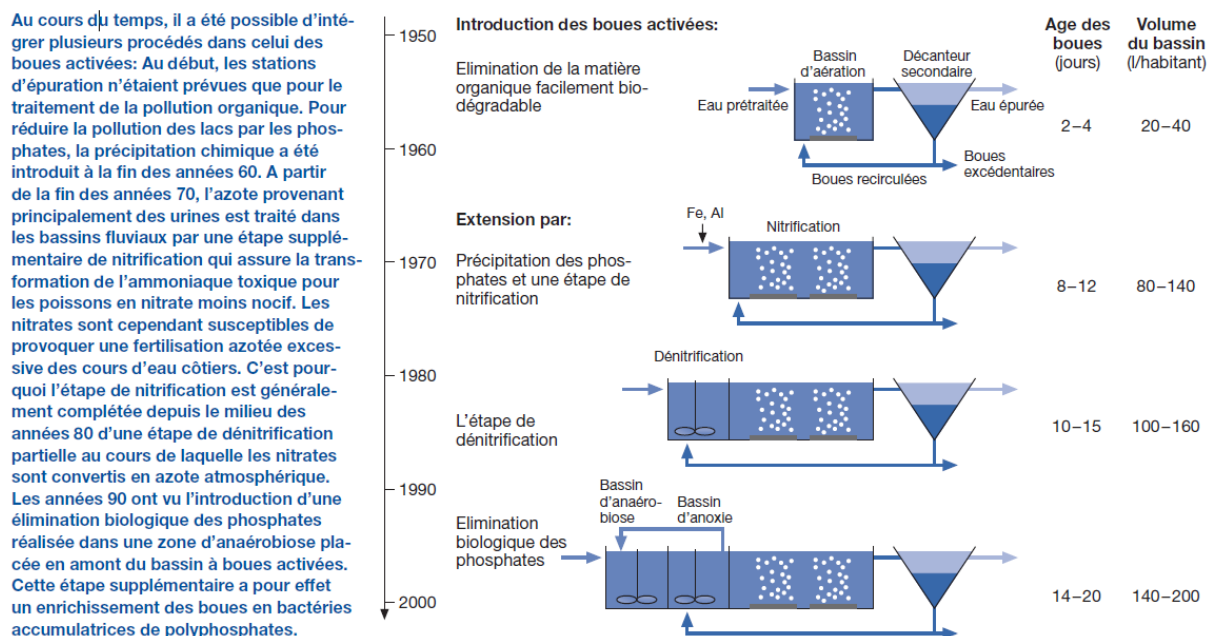


Figure 8 : Historique du procédé des boues activées selon Siegrist (2003)

L'épuration des eaux usées consiste globalement en un transfert de la pollution organique et minérale de la phase liquide (eau) vers une phase solide (les boues) et une phase gazeuse (rejet de CO_2 , N_2 ...). Cette filière comporte plusieurs étapes :

- Les prétraitements : ces traitements consistent à retirer de l'eau les plus grosses particules, les sables et les matières grasses. Ils reposent essentiellement sur des critères physiques : granulométrie (dégrillage), densité (dessablage, dégraissage).
- Le traitement primaire : cette étape de moins en moins courante est une simple décantation des matières en suspension naturellement décantables.

- Le traitement secondaire : cette étape est généralement réalisée par un traitement biologique de la pollution contenue dans les eaux usées. Le traitement le plus répandu est le traitement par boues activées. Au cours de ce traitement, l'eau usée est mise en contact avec des microorganismes en suspension qui vont consommer la pollution carbonée et/ou azotée pour satisfaire leurs besoins de croissance et énergétique. Cette biodégradation est le plus souvent réalisée en condition aérobie par des bactéries libres, parfois fixées sur des supports naturels ou synthétiques où elles se développent en formant des biofilms. Sous l'effet de différents paramètres des réacteurs (hydrodynamique, charge organique, aération), les microorganismes libres vont s'agglomérer sous forme de floccs qui vont pouvoir décanter lors de l'étape suivante de clarification. Lors de cette étape, la biomasse flocculée associée aux matières en suspension résiduelles est récupérée par décantation. Cette matière principalement organique (70-75% de matière volatile en suspension généralement) constitue ce qu'on appelle les boues. Une partie de ces boues sera recirculée dans le bassin d'aération afin de maintenir une concentration constante de biomasse et éviter une croissance trop forte (production de boue) et l'autre partie sera purgée du système vers les filières de déshydratation, de traitement puis d'évacuation (en France la valorisation agricole est prédominante par rapport à l'incinération, majoritaire en Suisse, par exemple).
- Le traitement tertiaire : en fonction du contexte local, une troisième étape d'épuration de l'eau peut être présente. Ces traitements permettent une élimination plus complète des pollutions azotées et phosphorées. Ils peuvent être de nature biologique (zone anoxique pour la dénitrification, zone anaérobie pour la déphosphatation biologique) ou physicochimique (précipitation du phosphore). A ces systèmes, des traitements plus poussés peuvent être mis en place, notamment lors de risques sanitaires microbiologiques (désinfection, filtration sur sable, étang d'affinage...).

4.2 Effet des procédés de traitement des effluents sur la résistance aux antibiotiques.

Bien que les STEP n'aient pas été initialement conçues pour traiter la pollution microbiologique, il s'avère que ces systèmes permettent de réduire la charge bactérienne totale d'environ 2 log (hors désinfection spécifique), ainsi que de certains indicateurs de contaminations fécales et pathogènes. Cependant les quantités de bactéries résistantes, continuellement rejetées dans l'environnement par le biais des STEP restent très élevées. Par

jour, un effluent de STEP déverserait environ 10^9 à 10^{12} UFC par équivalent habitant (Novo et Manaia, 2010), parmi lesquelles entre 10^7 à 10^{10} des bactéries posséderaient au moins un type de résistance acquise. Ces chiffres soulignent l'importance des STEP dans l'accumulation et l'émergence de bactéries résistantes dans l'environnement. De plus ces quantités, mesurées par des méthodes de culture, ne considérant donc qu'environ 1% de la fraction bactérienne totale, sous-estiment probablement les quantités réelles. Certaines études métagénomiques ont montré l'impressionnante diversité des gènes de résistance portés par des éléments génétiques mobiles présents dans des STEP (Szczepanowski *et al.*, 2009; Zhang *et al.*, 2011). Ainsi Szczepanowski *et al.* (2009) ont mis en évidence, dans des boues activées de STEP, la présence de 140 gènes impliqués dans la résistance à la quasi-totalité des familles d'antibiotiques (macrolides, tétracyclines, céphalosporines, fluoroquinolones, aminoglycosides, β -lactamines et sulfonamides) et portés par des plasmides, donc potentiellement transférables. Certains éléments génétiques mobiles, en particulier les IR, y sont systématiquement détectés et leur caractérisation les associe fréquemment à des gènes de résistance (*cf.* dans ce chapitre, section 5, p.51).

La combinaison des structures génétiques mobiles et des gènes de résistance, en association avec les fortes densités et l'importante diversité bactérienne présente dans les bassins biologiques ou les cultures fixées épuratrices, font des STEP des lieux avec des conditions idéales pour les transferts de gènes intracellulaires *via* transposition et recombinaison et les transferts horizontaux (Szczepanowski *et al.*, 2009; Tennstedt *et al.*, 2003; Zhang *et al.*, 2012). De plus, il a été suggéré que les conditions retrouvées dans les STEP pourraient favoriser l'intégration de gènes chromosomiques dans des plasmides (Martínez, 2009a, 2009b; Rahube et Yost, 2010). Ainsi, au lieu de réduire le risque associé à la dissémination de bactéries résistantes et /ou multirésistantes, les STEP maintiendraient voire même amplifieraient le phénomène. Néanmoins peu d'études ont mis en évidence ces transferts *in situ*, et les paramètres environnementaux impliqués restent mal compris (Merlin *et al.*, 2011).

Actuellement les procédés biologiques classiques utilisés dans les STEP permettent la réduction de la concentration en bactéries (voir ci-dessus). Cependant plusieurs études basées sur la culture de bactéries ont montré que la prévalence des bactéries résistantes n'est pas diminuée, voire même augmente, suite à un traitement conventionnel par boues activées (Zhang *et al.*, 2009c; Łuczkiwicz *et al.*, 2010; Da Silva *et al.*, 2006; Ferreira da Silva *et al.*, 2007;

Novo et Manaia, 2010). Plusieurs cas de sélection positive de souches résistantes ont été rapportés, parmi lesquels les suivants peuvent être cités :

- la proportion de bactéries du genre *Acinetobacter* résistantes à certains antibiotiques, mais aussi multirésistantes à plus de 3 antibiotiques augmentant significativement suite au traitement d'une STEP (Zhang *et al.*, 2009c),
- la proportion de souches du genre *Enterococcus* résistantes à la ciprofloxacine augmentant significativement suite au traitement d'une STEP (Da Silva *et al.*, 2006),
- la proportion de souches d'*Enterococcus faecalis* et d'*Enterococcus faecium* résistantes aux fluoroquinolones augmentant significativement suite au traitement d'une STEP (73% avant et 78% après) (Łuczkiwicz *et al.*, 2010).

Les mêmes observations ont été faites sur la base d'études métagénomiques. Ainsi, les abondances relatives de certains gènes de résistance ne sont pas diminuées lorsqu'elles sont rapportées à la biomasse totale (sur la base de la concentration des gènes codant pour l'ARNr 16S ou de la quantité d'ADN totale), et dans certains cas elles peuvent augmenter. Plusieurs études ont observé que la proportion d'un gène impliqué dans la résistance aux sulfonamides (*sul1*) est identique avant et après le traitement opéré par des STEP (Munir *et al.*, 2011; Czekalski *et al.*, 2012; Gao *et al.*, 2012b). Pour le gène *sul2*, également impliqué dans la résistance aux sulfonamides, une augmentation de l'abondance relative a été observé dans les effluents traités d'une STEP (Czekalski *et al.*, 2012). Pour ces gènes, plusieurs auteurs ont montré une corrélation positive entre la concentration de gènes et la concentration en sulfonamides, aussi bien dans des STEP que dans des rivières (Luo *et al.*, 2010; Gao *et al.*, 2012b).

A *contrario*, des diminutions de la prévalence de certaines souches bactériennes résistantes, ou de l'abondance relative de certains gènes de résistance ont été aussi observées. La proportion relative (sur la base de la concentration des gènes codant pour l'ARNr 16S) de gènes impliqués dans la résistance à la tétracycline (*tet(W)* et *tet(O)*), était diminuée suite au traitement d'une STEP (Munir *et al.*, 2011; Gao *et al.*, 2012b). Sur la base d'une normalisation des gènes par rapport à l'ADN total extrait, Zhang *et al.* (2009a) avaient observé une légère diminution de l'abondance relative des gènes *tet(A)* et *tet(C)*. Pour ce type de gènes, aucune corrélation entre leur concentration et la concentration de tétracycline n'a été mise en évidence (Gao *et al.*, 2012b). Il semble donc y avoir des comportements différents selon la nature du gène étudié, traduisant la complexité du système.

Par ailleurs, l'eau traitée n'est pas le seul résidu des STEP, et les boues issues du traitement constitueraient une voie d'entrée majeure de bactéries et gènes de résistance dans l'environnement *via* l'épandage (*i.e.* valorisation agricole). La seule étude ayant fait un bilan quantitatif entre les effluents traités et les boues traités d'une STEP, a montré que la principale voie de sortie des gènes *sulI*, *tetW* et *tetO* est les boues traitées (Munir *et al.*, 2011). L'amélioration des procédés de traitement des boues semble donc tout aussi importante que les effluents. Conventionnellement, les boues produites par les procédés de traitement des eaux sont soutirées du système pour les éliminer. Afin de réduire leur volume, ces boues sont systématiquement épaissies et/ou déshydratées, et parfois une ou des étapes supplémentaires de stabilisation sont réalisées ; ces étapes peuvent consister en un chaulage, un compostage ou une digestion anaérobie. Globalement, Munir *et al.* (2011) ont observé des concentrations inférieures de bactéries et de certains gènes de résistance dans des boues chaulées ou digérées, que dans des boues simplement épaissies ou déshydratées. Quant à l'efficacité des procédés de digestion des boues les conclusions restent divergentes (Ghosh *et al.*, 2009; Ma *et al.*, 2011).

4.3 Les procédés d'épuration avancés et leur influence sur l'antibiorésistance.

L'émergence de micropolluants (métaux lourds, composés pharmaceutiques, pesticides,...) dans l'environnement, la connaissance partielle de leur devenir dans les STEP actuelles, et la volonté de maîtriser leurs impacts dans les milieux naturels ont mené au développement de procédés de traitement avancé, qui, pour la plupart, viennent en complément du traitement par boues activées. Les procédés les plus couramment rencontrés sont basés sur la précipitation physicochimique et la filtration, et pour un traitement spécifique des bactéries, un procédé de désinfection peut être ajouté.

4.3.1 Présentation des procédés de traitement des eaux avancés utilisés au cours de cette étude.

Les bioréacteurs à membrane (BàM) : dans les STEP à boue activée des dysfonctionnements sont parfois observés au niveau de la séparation de la phase liquide (l'eau traitée) de phase solide (les boues). Ainsi des procédés également fondés sur une épuration par boue activée mais avec une séparation physique effectuée par une membrane ont été conçus depuis quelques années. Les membranes utilisées permettent une microfiltration ou l'ultrafiltration, voire une osmose inverse ou une nanofiltration, assurant à la fois une élimination des particules en suspension et une élimination bactérienne (si la membrane est

inférieure à 0,2 μm). Ces procédés appelés B \grave{a} M sont de plus en plus employés, notamment dans le cas de traitement d'eaux usées industrielles, où les problèmes de décantabilité des boues sont les plus fréquents. Deux types de configurations existent : soit les membranes sont externes au bassin biologique, soit les membranes sont directement plongées dans le bassin biologique.

L'ozonation (O₃): L'ozone est un oxydant couramment utilisé pour l'oxydation de la matière organique et désinfection d'eau aboutissant à la formation d'eau et de CO₂, et des produits d'oxydation, selon les doses d'ozone, les charges organiques, la qualité des polluants, la dynamique du système.

Le charbon actif : Le charbon actif est un composé de structure poreuse avec une très grande surface spécifique. Les polluants et les bactéries sont adsorbés sur ces surfaces poreuses. L'application de charbon actif pour le traitement des eaux peut se faire en mélangeant les eaux avec du charbon actif en poudre (CAP), ou par la filtration sur un filtre de charbon actif granulaire (CAG). Ce procédé est couramment employé pour le traitement d'eau de consommation.

4.3.2 Influences des procédés de traitement avancés sur l'antibiorésistance.

Bien que les premières études sur l'influence de ces procédés sur la résistance aux antibiotiques aient été entreprises dans les années 70, très peu de données sont actuellement disponibles sur leur influence sur la résistance aux antibiotiques.

Dans une première étude menée par (Grabow *et al.*, 1976), l'efficacité de la biofiltration (utilisant des filtres sur lesquels des biofilms se développent) et de la filtration sur sable pour éliminer les coliformes portant des résistances transférables avait été soulignée. Les auteurs avaient rapporté un taux de réduction de 50% de la proportion de coliformes possédant des plasmides présentant une ou plusieurs résistances. Le même type de procédé, mis en œuvre dans une usine de traitement d'eau potable, a montré des taux de réduction de l'ordre de 80% de la concentration de gènes impliqués dans la résistance à la tétracycline (*tetA* et *tetC*), et de la concentration d'IR (Zhang *et al.*, 2009a). Cependant lorsque ces concentrations sont normalisées à la biomasse totale sur la base de la quantité d'acides nucléiques totaux présente dans les échantillons, ces réductions sont inférieures à 42,7%, suggérant que le procédé est plus efficace pour réduire la concentration bactérienne totale que pour réduire celles des bactéries résistantes.

Dans un tout autre cadre, des biofiltres utilisés dans plusieurs procédés de traitement des déchets liquides de fermes porcines, permettent de réduire la concentration de gènes de résistance à l'érythromycine (*ermX*, *ermF* et *ermB*) avec des rendements plus ou moins importants selon les fermes (Chen *et al.*, 2010). Le taux de réduction le plus élevé allait jusqu'à 2,8 log pour le gène *ermB*. Cependant ces mêmes procédés ne permettaient pas la réduction du gène *tetG* impliqué dans la résistance à la tétracycline. Dans la même étude, les auteurs ont regardé l'influence de digesteurs anaérobies de déchets de deux fermes sur l'abondance de ces gènes de résistance, montrant de faibles taux de réduction de leur concentration (inférieurs à 1,4 log). Cependant aucune information sur l'efficacité de ces procédés pour réduire l'abondance relative de ces gènes de résistance n'est disponible. Plus prosaïquement, ce manque de données scientifiques sur l'influence des méthodes actuelles de stockage des déchets agricoles sur l'antibiorésistance a été souligné dans deux revues (Heuer *et al.*, 2011; Chee-Sanford *et al.*, 2009).

Les procédés de chloration des eaux à potabiliser sont actuellement les plus employés pour la désinfection, mais ceux-ci peuvent être appliqués à la désinfection d'eaux usées traitées. Bien que les procédés de chloration réduisent la concentration bactérienne, plusieurs études ont observé que la proportion de certaines bactéries résistantes et/ou de gènes de résistance n'est pas réduite, voire même augmente après traitement (Armstrong *et al.*, 1981, 1982; Xi *et al.*, 2009; Huang *et al.*, 2011a). De plus, des temps de rétention important après traitement à faibles doses favoriseraient la réactivation de certaines bactéries résistantes aux antibiotiques (Huang *et al.*, 2011a). Néanmoins des réductions de la proportion de certaines bactéries résistantes après traitement ont aussi été observées. Ainsi il semblerait que les résultats dépendent de nombreux paramètres tels que le temps de contact, les doses, le mode opératoire, mais aussi les bactéries et les résistances considérés (Huang *et al.*, 2011a). Par ailleurs, comme pour les antibiotiques, il résulterait du traitement au chlore une augmentation de la proportion en bactéries résistantes au chlore dans les effluents traités (Ridgway et Olson, 1982).

L'impact de la désinfection par UV d'effluents traités (issus de STEP), sur l'antibiorésistance a beaucoup moins été évalué que les procédés de chloration. A l'échelle du laboratoire, les UV permettent de réduire la concentration de coliformes totaux et résistants d'un facteur d'environ 3 log, mais une augmentation de la proportion de coliformes résistants à la tétracycline et au chloramphénicol est observée (Meckes, 1982). De plus, quasiment la moitié des souches isolées sont capables de transférer leurs résistances à *E. coli*. Finalement l'application d'UV à des doses utilisées pour la désinfection d'effluents traités de STEP a été

Etude bibliographique

montrée comme induisant l'expression du gène *recA* chez certains isolats (Jungfer *et al.*, 2007). La protéine RecA est connue pour intervenir dans la régulation de nombreux autres gènes chez la bactérie, et notamment l'expression de l'intégrase d'IR *via* la réponse SOS (Guerin *et al.*, 2009). L'utilisation d'UV pour le traitement d'eau usée présente donc des conditions idéales pour favoriser la dissémination de gènes de résistances aux antibiotiques dans l'environnement.

Une seule étude rapporte l'influence des B_àM sur la résistance aux antibiotiques (Munir *et al.*, 2011). Ainsi ce procédé montrerait de très bonnes efficacités d'élimination des gènes *tetW* et *tetO* impliqués dans la résistance à la tétracycline, avec des réductions de la concentration des gènes supérieures à 6 log. Cependant, les diminutions de la concentration du gène de résistance *sulI*, mais aussi la diminution de la flore hétérotrophique cultivable totale et résistante à la tétracycline ou aux sulfonamides ne seraient significativement pas différentes, comparées à des procédés classiques (entre 2 et 4 log selon les paramètres). Pour les abondances relatives basées sur la quantification des gènes codant l'ARNr 16S, la proportion de gènes *tet* diminue suite aux différents traitements alors que ces ratios restent identiques pour les gènes *sulI*.

5 IMPLICATION DES INTEGRONS DANS LA DISSEMINATION DE LA RESISTANCE AUX ANTIBIOTIQUES DANS L'ENVIRONNEMENT

Comme présenté précédemment, l'émergence de la résistance aux antibiotiques est un problème de santé publique majeur. Au cours des 10 dernières années, différents mécanismes génétiques impliqués dans la dissémination de la résistance aux antibiotiques entre les bactéries ont été identifiés. Les intégrons, éléments génétiques capables d'acquérir, d'échanger, et d'exprimer des gènes sous forme de cassettes de gènes (CG), en font partie. Les intégrons sont très largement distribués dans le monde bactérien, et plus particulièrement chez les bactéries à Gram négatif. Ces éléments génétiques peuvent être portés par des éléments génétiques mobiles, tels que des plasmides et des ICEs promouvant leur dissémination au sein des communautés bactériennes. Initialement principalement étudiés dans les milieux cliniques, de part leur implication dans l'émergence de la résistance aux antibiotiques, leur rôle dans l'environnement est de plus en plus étudié. L'objectif de la revue bibliographique suivante est de faire une analyse des travaux récents publiés sur les intégrons impliqués dans la résistance aux antibiotiques en dehors du contexte clinique. Une attention particulière sera donnée aux impacts anthropiques (agriculture, industrie, STEP...).

**INTEGRON INVOLVEMENT IN ENVIRONMENTAL
SPREAD OF ANTIBIOTIC RESISTANCE**

6 SYNTHÈSE

Cette synthèse bibliographique nous amène à constater l'intérêt recrudescant de la recherche pour la problématique générale de l'antibiorésistance bactérienne, liée à la fois aux craintes sanitaires mais également aux nouvelles découvertes des relations entre les micro-organismes. Ainsi les chercheurs se préoccupent des mécanismes intrinsèques aux transferts et à la dissémination de gènes, aux objets supports de cette résistance (plasmides, intégrons, transposons...) et aux facteurs de pression effectifs (consommation d'antibiotiques) ou prospectifs (procédés, stress environnementaux...).

Certaines études portant sur l'antibiorésistance dans l'environnement montrent une augmentation des liens entre les souches pathogènes pour l'homme et l'animal, et les bactéries de l'environnement. Ainsi des échanges génétiques entre ces deux compartiments et ayant eu lieu au cours de notre ère « post antibiotiques » sont démontrés. La contamination microbiologique de l'environnement par des sources anthropiques, *via* la chaîne de déchets et d'effluents reliant le microbiome de l'homme et de l'animal aux communautés bactériennes de l'environnement, favoriserait ces interactions.

L'implication de certains écosystèmes anthropiques dans cette dissémination (figure 9), comme les hôpitaux, les STEP et les fermes d'élevage est démontrée au travers des publications caractérisant *i*) le réservoir de bactéries multirésistantes, de gènes de résistance et d'éléments génétiques mobiles, et *ii*) le rôle probable de ces écosystèmes comme plateforme d'échanges génétiques. L'émission de leurs rejets dans l'environnement participerait donc à la dispersion de l'antibiorésistance dans les milieux récepteurs. De manière spécifique et parfois phantasmatique, les rejets des établissements de soins sont fortement suspectés de contribuer majoritairement à la dissémination de l'antibiorésistance dans les réacteurs biologiques des STEP positionnés en aval (cas des hôpitaux rejetant dans un réseau urbain).

Ainsi, les STEP constituent un rempart potentiel entre l'émission et la dissémination et des bilans de fonctionnement sur les différents types de procédés au regard de l'élimination de polluants émergents sont rapportés dans la littérature. Cependant, il reste difficile de conclure quant à leur efficacité dans l'élimination des germes spécifiquement résistants et sur l'intérêt des nouveaux procédés d'oxydation avancée sur ces mêmes germes.

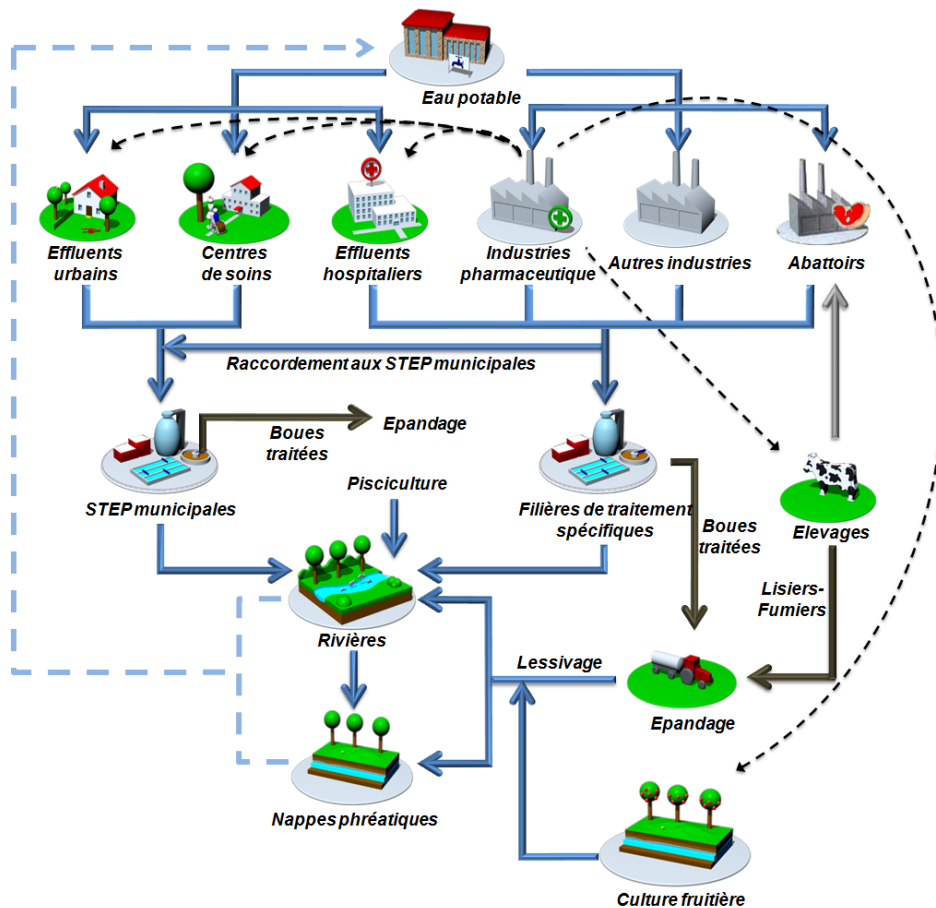


Figure 9 : Voie d'entrées impliquées ou suspectées de participer à la dissémination de la résistance aux antibiotiques dans l'environnement. Les flèches représentent en bleu : les flux d'eau (les pointillés indiquent la filière de potabilisation de l'eau), en marron : les flux de solide, en gris : le cheminement des animaux vers les abattoirs, en pointillés noirs : les consommations d'antibiotiques.

La bibliographie montre la difficulté à évaluer de manière rigoureuse, transposable et comparable l'antibiorésistance dans des matrices environnementales, du fait notamment de la diversité des bactéries et des déterminants génétiques impliqués dans cette résistance, et de la diversité des méthodes employées. Certains éléments génétiques ubiquitaires dans les communautés bactériennes jouent un rôle central dans la dissémination de la résistance aux antibiotiques. Les IR, qui permettent aux bactéries d'acquérir, d'échanger, d'exprimer des gènes présents sous forme de cassettes de gènes, ont été décrits principalement, chez les bactéries à Gram négatif comme des marqueurs potentiels de l'acquisition, ou du transfert de gènes de résistance.

Nos travaux s'inscrivent dans ces différentes problématiques.

RESULTATS ET DISCUSSION

L'objectif du travail présenté est d'évaluer l'implication des effluents d'activités hospitalières et de la filière carnée, sur la dissémination de l'antibiorésistance, au travers de la dynamique des IR de leurs sources à leurs rejets. Les résultats de cette étude sont subdivisés en trois parties.

PARTIE 1 : Estimation de la concentration des IR dans des matrices anthropiques, et influences des procédés de traitement.

Cette première partie a pour objectif d'évaluer la faisabilité de la mesure globale de l'antibiorésistance par les IR, et de donner un point de vue d'ensemble de la dissémination de l'antibiorésistance. Cette recherche est réalisée au travers de l'analyse d'un panel de résidus biologiques d'origines diverses, et comprenant des effluents d'activités hospitalières et de la filière carnée.

Dans cette même partie, les IR ont été utilisés comme biomarqueurs de l'antibiorésistance afin d'évaluer l'influence de procédés de traitements par boue activée, aussi bien au niveau de procédés classiques de STEP, qu'au niveau de procédés avancés de traitement pour l'épuration des effluents hospitaliers.

PARTIE 2 : Evaluation dynamique de la morphologie des floes, de la diversité bactérienne et des IR de classe 1 dans un réacteur à boues activées traitant les effluents d'un hôpital.

Dans cette seconde partie, l'influence du traitement par boue activée d'un effluent hospitalier sur la biomasse épuratrice est investiguée. Pour cela, dans des mêmes conditions opératoires menées à l'échelle du laboratoire, le traitement d'un effluent hospitalier est comparé au traitement d'un effluent urbain. La caractérisation des impacts sur la biomasse est effectuée à l'aide de plusieurs paramètres, comprenant le suivi de la diversité bactérienne et des IR comme biomarqueurs de l'antibiorésistance. Cette partie est présentée sous la forme d'un article soumis pour publication.

PARTIE 3 : Impact quantitatif et qualitatif des effluents d'un hôpital sur la dissémination des IR.

Dans cette troisième et dernière partie, une caractérisation approfondie de l'impact d'un effluent hospitalier sur la dissémination des IR et de leur contenu en cassettes de résistance, est réalisée de la source au rejet. L'objectif de ce travail à la fois quantitatif, en terme de bilan de

Résultats et discussion

flux, et qualitatif, en terme de détermination du contenu de gènes de résistance, est d'évaluer la contribution réelle d'un effluent hospitalier au niveau d'une partie du petit cycle de l'eau et de déterminer l'impact d'une STEP municipale sur l'antibiorésistance. Cette partie est également présentée sous la forme d'un article soumis pour publication.

1 ESTIMATION DE LA CONCENTRATION D'IR DANS DES MATRICES ANTHROPIQUES, ET INFLUENCES DES PROCÉDES DE TRAITEMENT.

Le caractère de multirésistance de souches pathogènes étant souvent associé à la présence d'IR (Barraud et Ploy, 2011), l'excrétion de bactéries les hébergeant représenterait une voie de dissémination de la résistance aux antibiotiques dans l'environnement. Dans les centres hospitaliers et les fermes d'élevages, les bactéries soumises à des pressions antibiotiques, sont suspectées d'être rejetées dans l'environnement, *via* les effluents ou résidus biologiques, créant ainsi d'éventuels points chauds de dissémination de la résistance (Schwartz *et al.*, 2003; Baquero *et al.*, 2008; Martínez, 2009a; Ferreira *et al.*, 2011). Finalement cette contamination en IR d'origine anthropique dans les milieux naturels pourrait jouer un rôle dans les échanges de gènes ayant lieu entre le résistome de l'environnement et les souches commensales et pathogènes de l'homme et l'animal.

Afin d'évaluer le potentiel des effluents anthropiques d'origine hospitalière, et de la filière de production carnée bovine à disséminer l'antibiorésistance dans l'environnement, les IR ont été suivis comme marqueurs génétiques de l'acquisition et de l'expression de la résistance aux antibiotiques. Pour cela dans cette première partie, il sera présenté :

- la réalisation d'un état des lieux sur les concentrations et l'abondance relative des IR dans un large panel d'effluents de diverses origines anthropiques, naturelles et géographiques.
- l'évaluation des performances d'élimination des IR et des bactéries dans des procédés de traitement d'eaux usées municipales équipées de bassins à boue activée, et des procédés de traitement avancé mis en place pour le traitement d'effluents hospitaliers. Dans un premier temps l'analyse des procédés par boue activée classique de STEP municipales et d'abattoirs, puis dans un second temps l'analyse des performances des procédés avancés pour le traitement des effluents hospitaliers seront réalisées. Pour cette dernière partie, certaines hypothèses soulevées seront complétées par des études de microscopie et de diversité bactérienne par PCR-DGGE.

Résultats et discussion

Le chapitre suivant présente successivement une partie « matériels et méthodes » spécifiques et la description des différents sites de prélèvement, puis la partie « résultat » proprement dite.

1.1 Matériels et méthodes

1.1.1 Caractéristiques générales des différents points de prélèvement étudiés

Au total 11 sites répartis sur 6 pays européens ont été étudiés. La figure 10 présente la localisation de chacun de ces sites ainsi que les différents types de prélèvements qui ont été réalisés.

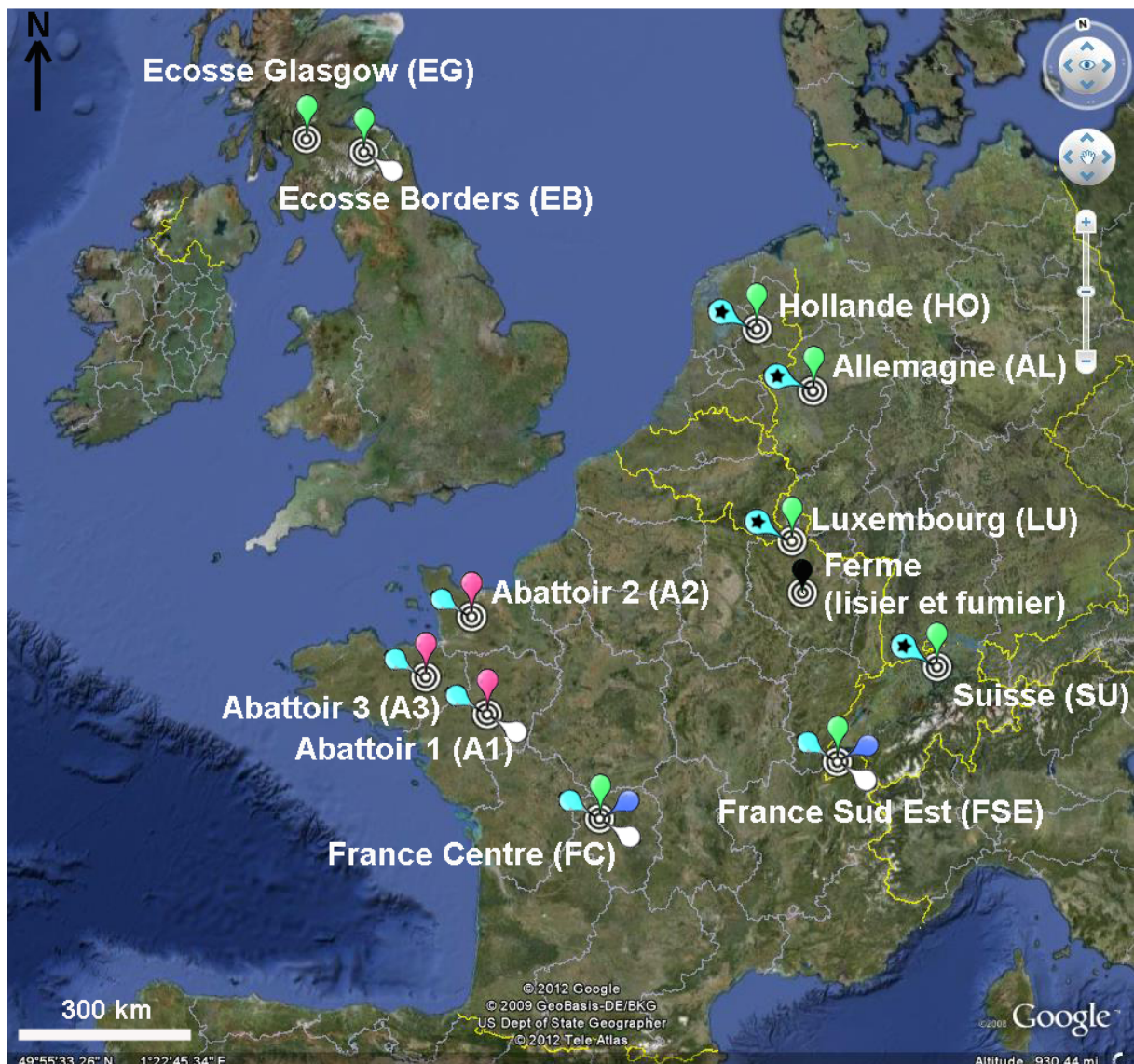


Figure 10 : Localisation des sites de prélèvements et des différents types de prélèvements associés : : effluents hospitaliers, : effluents d'abattoirs, : les milieux naturels, : les effluents urbains, : les STEP, : pilotes de traitement des effluents hospitaliers, : le lisier et le fumier. <http://maps.google>.

1.1.1.1 Les centres hospitaliers

Dix centres hospitaliers dont une unité d'hôpital et un centre spécialisés dans la gériatrie, répartis sur 6 pays européens et sur 8 zones géographiques différentes ont été étudiés. Les caractéristiques générales de chaque centre hospitalier et de leurs effluents prélevés sont présentées dans le tableau 3. Chaque centre hospitalier étudié présente des caractéristiques bien particulières, en termes de taille (nombre de lits allant de 34 à 1076), consommation d'eau (allant de 3 122 à 157 183 m³.an⁻¹), flux d'eaux usées (allant de 8,5 à 814 m³.j⁻¹), et consommation d'antibiotiques (allant de 18 à 282 g.lit⁻¹.an⁻¹). Les consommations d'antibiotiques sont plus de 10 fois inférieures pour les activités de soins spécialisés dans la gériatrie. Avec 282 g.lit⁻¹ d'antibiotiques consommés par an, l'hôpital H-SU est le centre où les antibiotiques (pour lesquels des données de consommation ont été collectées), sont le plus consommés (tableau 3). Parmi ces antibiotiques, l'amoxicilline est la molécule la plus utilisée par lit dans tous les hôpitaux.

Les caractéristiques physicochimiques des eaux collectées sont variables, avec pour certains sites des charges de matière organique du même ordre de grandeur qu'un effluent domestique (< 500 mg.l⁻¹ de demande chimique en oxygène (DCO) selon Bitton (2005)), ou plus élevées (pouvant aller jusqu'à environ 1 000 mg.l⁻¹ de DCO). Ainsi, sachant qu'un équivalent habitant produit environ 135 g de DCO par jour, un lit d'hôpital produirait entre 0,6 fois moins et 6,8 fois plus de matière organique, le minimum et le maximum correspondant respectivement à l'unité de soins gériatriques H-EBG et au centre hospitalier H-FC. Les valeurs des concentrations de l'azote et du phosphore total sont comparables à celles d'un effluent domestique. La présence des effluents d'un restaurant ou d'une laverie au point de prélèvement ne semble pas majoritairement influencer les caractéristiques physicochimiques des effluents. Cependant, la préfiltration des échantillons avant leur prélèvement diminue la quantité de matières en suspension (MES) des échantillons collectés.

Tableau 3 : Caractéristiques générales des hôpitaux, de leurs effluents et des points de prélèvement.

	Allemagne (H-AL)	Luxembourg (H-LU)	Hollande (H-HO)	Suisse (H- SU)	Ecosse Glasgow (H-EG)	Ecosse Glasgow (H-EGG)	Ecosse Borders (H- EB)	Ecosse Borders* (H- EBG)	France Centre (H-FC)	France Sud Est (H-FSE)
Nombre de lits	580	360	1076	346	318****	120	265****	34****	863	NC
occupation moyenne	>80%	84%	ND	100%	100	ND	100	100	ND	NC
Consommation d'eau ^b	73 000	51 400	87 600	84 987	47 400	9 944	63 767	3 122	157 183	NC
Flux moyen des effluents (m ³ .j ⁻¹)***	200	141	240	233	204	26	166	9	814	62
Composition des effluents prélevés	Activités cliniques générales**	Activités cliniques générales	Activités cliniques générales	Activités cliniques générales	Activités cliniques générales **	Activités générales et ortho-gériatriques pour la réadaptation des personnes âgées	Activités cliniques générales **	Activité gériatrique	Activités cliniques générales	Activités cliniques générales
Les échantillons inclus les effluents :										
d'un restaurant	Oui	Non	Oui	Oui	Oui	Oui	Oui	Non	Non	NC
d'une laverie	Non	Non	Oui	Non	Non	Oui	Non	Oui	Non	NC
Etape de préfiltration avant échantillonnage	Oui (exclusion de particules >1 mm)	Oui (exclusion de particules >2mm)	Oui (exclusion de particules >0,5 mm)	Oui (exclusion de particules >4mm)	Non	Non	Non	Non	Non	Non
Charge d'antibiotique (g.lit ⁻¹ .a ⁻¹)										
Amoxicilline	22,73	92,52	47,49	256,11	125,37	21,52	72,26	8,53	67,05	NC
Ciprofloxacine	9,61	16,50	8,96	17,88	24,19	1,32	27,31	1,45	21,80	NC
Clarithromycine	3,82	5,47	0,40	4,91	18,04	1,33	24,75	1,76	0,85	NC
Sulfamethoxazole	3,32	0,33	5,37	2,89	15,07	1,33	0,00	0,00	13,39	NC
Erythromycine	2,18	0,55	1,45	0,48	2,41	0,00	2,12	6,50	2,93	NC
Paramètres physico-chimiques										
DCO (mg.l ⁻¹)	709 ± 280	359 ± 109	424 ± 43	380 ± NC	563 ± 48	973 ± 548	746,7 ^a	300 ± 193	975 ± 137	799 ± 393
DBO5 (mg.l ⁻¹)	325 ± 112	190 ± 40	188 ± 26	ND	75 ± 30	217 ± 37	ND	258 ± 37	440 ± 49	198 ± 4
MES (mg.l ⁻¹)	97 ± 33	ND	78 ± 16	ND	ND	ND	ND	ND	395 ± 126	261 ± 239
Azote total (mg.l ⁻¹)	64 ± 11	59 ± 14	66 ± 4	30,1 ± NC (NH ₄ +NO ₃)	18 ± 1	14 ± 5	14 ^a	14 ± 4	40 ± 6	66 ± 3
Phosphore total (mg.l ⁻¹)	8,3 ± 1,3	6,4 ± 0,5	10,0 ± 0,9	13 ± NC	3,0 ± 0,3	12,0 ± 0,4	10,4 ^a	7,0 ± 1,0	ND	6,1 ± 0,2
*sous échantillon de l'hôpital général Ecosse-Borders; ** de l'eau de pluie est susceptible d'être récolté au point d'échantillonnage; *** Le flux d'eau a été déduit de la consommation d'eau, excepté pour l'effluent France-centre; **** nombre de lits correspondant au nombre de lits occupés. ^a un seul échantillon analysé, ^b données exprimées en m ³ .a ⁻¹ , NC : non communiqué, ND : non déterminé										

1.1.1.1 Les zones urbaines

Quatre zones urbaines, dont trois ne comportant aucun effluent d'activité clinique, et réparties sur 4 zones géographiques différentes ont été échantillonnées. Les caractéristiques principales de chaque point de prélèvement et de leurs eaux usées sont rapportées dans le tableau 4.

Au regard de la composition des effluents en terme d'équivalent habitant et de leur flux, les tailles des zones couvertes au niveau des points de prélèvements et leur charge organique respectives en terme de DCO sont très variables, allant de 13 à 957 mg.l⁻¹.

Tableau 4 : Caractéristiques générales des différents points de prélèvement urbain effectués.

	France Centre (U-FC)**	France Sud-Est (U-FSE)**	Ecosse Borders (U-EB)**	France Ouest (U-FO)	France Centre (U-FC)
Composition (EH)	285 000	32 000	25 000	≈ 4 000	13 360
Flux moyen (m ³ .j ⁻¹)	38 240	4 397	ND	476	4 447
Activités hospitalières	Oui	Non	Non	Non	Non
Caractéristiques Physicochimique					
DCO (mg.l ⁻¹)	957 ± 130	556 ± 47	13*	642 ± 220	250 ± 74
DBO5 (mg.l ⁻¹)	329 ± 33	219 ± 12	118*	ND	144 ± 46
MES (mg.l ⁻¹)	461 ± 128	255 ± 21	ND	237 ± 115	119 ± 33
Azote total (mg.l ⁻¹)	44 ± 7	53 ± 6	21*	55 ± 20	28 ± 4
Phosphore total (mg.l ⁻¹)	ND	9,1 ± 1,0	3,6*	9,0 ± 3,2	ND

*Données obtenues pour un seul échantillon prélevé un jour de forte pluie; **:échantillons correspondant à des influents de STEP. ND : non déterminé ;EH :équivalent habitant

1.1.1.2 Les abattoirs

Trois abattoirs spécialisés dans l'abattage de bovins ou de veaux, et répartis en France sur 3 zones géographiques différentes ont été étudiés. Les caractéristiques principales des effluents sont regroupées dans le tableau 5. La stabulation présente dans les abattoirs des sites A1 et A2 a été échantillonnée. Elle correspond aux fèces des animaux durant le trajet jusqu'à l'abattoir et pendant le stockage du bétail avant abattage. Comme pour le fumier, les fèces sont mélangés avec de la paille. Pour chaque site les caractéristiques physicochimiques des effluents sont comparables. Les charges organiques d'azote total et de MES sont beaucoup plus élevées dans les effluents d'abattoir comparativement à un effluent domestique (Bitton, 2005).

Tableau 5 : Caractéristiques des effluents des abattoirs étudiés.

	Abattoir 1 (E-A1)*	Abattoir 2 (E-A2)*	Abattoir 3 (E-A3)*
Type de bêtes	Bœuf	Bœuf	Veau
Flux moyen des effluents (m ³ .j ⁻¹)	910	NC	515

Suite du Tableau 5			
Paramètres physicochimiques			
DCO (mg.l ⁻¹)	5 592	5 936	7 020
Azote total (mg.l ⁻¹)	214	334	3 00
DBO ₅ (mg.l ⁻¹)	3 550	ND	3 450
MES (mg.l ⁻¹)	3 310	5 790	3 590

NC : non communiqué, ND : non déterminé ; *: échantillons correspondant à des influents de STEP

1.1.1.3 Les STEP à boues activées

Cinq STEP à boues activées ont été étudiées, comprenant deux STEP traitant des effluents municipaux de villes françaises, et trois STEP traitant les effluents d'abattoirs de bœufs ou de veaux (tableau 6). Les effluents traités correspondent aux effluents décrits dans les sections précédentes. Chacune des STEP est composée d'un traitement primaire physique ayant pour objectif l'élimination des plus grosses particules (les prélèvements étaient réalisés après cette étape), puis l'épuration est réalisée par un traitement biologique à boues activées suivi d'une étape de décantation dans un clarificateur. Pour certains sites, une étape supplémentaire de précipitation physicochimique avant rejet dans le milieu naturel est réalisée. Les échantillons d'eau ont été prélevés au niveau de l'entrée et de la sortie de chaque STEP, et les boues ont été prélevées au niveau de la recirculation. Pour les STEP d'abattoir les boues après traitement ont aussi été échantillonnées.

Les deux STEP municipales étudiées sont très différentes en terme de taille d'exploitation (cf. « capacité », tableau 6). Les rendements d'élimination des STEP satisfont aux normes imposées par les lois en vigueur relatives aux rejets de ces types de station.

Tableau 6 : Caractéristiques principales des STEP étudiées.

	France Centre (S-FC) ^a	France Sud-Est (S-FSE) ^b	Abattoir 1 (S-A1)	Abattoir 2 (S-A2)	Abattoir 3 (S-A3) ^d
Types d'effluents	Urbain	Urbain	Abattoir	Abattoir	Abattoir
Capacité (EH)	250 000	32 000	NC	NC	NC
Flux moyen entrant*	34 093	4 037	910	NC	515 ^c
Flux moyen sortant *	41 230	4 397	868	NC	382 ^c
Effluent de soins	Oui	Non	-	-	-
Traitement des boues	-	-	Epaissis. + chaulage	Epaissis.	Epaissis.
Performances épuratoires (%) :					
DCO	85 à 98	90 à 98	97 à 99	NC	99
Azote total	76 à 90	96 à 99	86 à 99	NC	NC*
Phosphore total	76 à 97	5 à 41	89 à 99	NC	NC
DBO ₅	97 à 100	97 à 99	ND	NC	NC*
MES	93 à 100	90 à 99	97 à 99	NC	99

EH : Equivalent habitant ; ^a données obtenues sur juin/juillet 2010 ; ^b données obtenues pour février 2011 et janvier 2012 ; ^c données obtenues pour janvier/février/mars 2011 ; ^d données obtenues pour les trois premières semaines de Mai 2011.*les valeurs en sortie de STEP étaient en dessous des normes de rejet imposées. Remarque : pour les abattoirs seules les valeurs en semaine ont été prises en compte. NC : non communiqué, ND : non déterminé, Epaissis. : épaissement * données exprimées en m³.j⁻¹

1.1.1.4 Pilotes de traitement avancé des effluents hospitaliers

Les procédés avancés testés au cours de cette étude ont été mis au point pour traiter spécifiquement certains des effluents hospitaliers décrits précédemment (tableau 3). Ces procédés sont tous fondés sur un traitement par un bioréacteur à membrane (BàM) utilisant des tailles de pores de membrane permettant la microfiltration ou l'ultrafiltration. Cette filtration membranaire peut s'effectuer directement dans le bassin biologique, ou à l'extérieur du bassin (tableau 7).

Tableau 7 : Caractéristiques et performances générales des pilotes étudiés.

Localisation	Allemagne (P-AL)	Hollande (P-HO)	Luxembourg (P-LU)
Echelle	Industrielle	Industrielle	Laboratoire
Capacité moyenne	200 m ³ .j ⁻¹	240 m ³ .j ⁻¹	2 m ³ .j ⁻¹
Prétraitement physique (mm)	1	6 + 0,5	5 + 2 + 0,2
Temps de séjour hydraulique (.h ⁻¹)	60	20	8
Temps de séjour des boues (.j ⁻¹)	249	> 50	30-40
Configuration des membranes	Interne au bassin biologique	Externe au bassin biologique	Interne au bassin biologique
Seuil de coupure	0,04 µm (MF)	0,03 µm (UF)	0,4 µm (UF)
Concentration de boue dans le bassin biologique (g.l ⁻¹)	10-12	8-12	10-13
Performances épuratoires (%) :			
DCO total	96 %	94 %	92 %
Azote total	95 %	20 %	70 %
Phosphore total	76 %	7 %	ND
DBO5	> 90 %	99 %	99 %
MES	> 90 %	93 %	ND
Traitements supplémentaires testés	- O ₃ + CAP + FS - CAP + FS	O ₃ + CAG	-
	O ₃ : 5mg.l ⁻¹ , 30 min CAP : 20mg.l ⁻¹ , 40 min	O ₃ : 13 mg.l ⁻¹ , 40 min	-

MF : microfiltration, UF : ultrafiltration, O₃ : ozonation ; CAG : charbon actif granulaire ; CAP : charbon actif en poudre ; FS : filtration sur sable

Chaque pilote de traitement est spécifique, en termes de taille (échelle du laboratoire, ou échelle industrielle), de configuration de la filtration (interne ou externe au bassin biologique), de taille des pores de la membrane utilisée (microfiltration ou ultrafiltration), et de paramètres d'opération (temps de séjour hydraulique et temps de séjour des boues). Tous les pilotes permettent une bonne élimination de la charge organique totale (DCO), de la charge organique biodégradable (DBO5), et des matières en suspension (MES).

Dans certains cas, une ou plusieurs étapes supplémentaires de traitement ont été testées sur le filtrat du BàM (tableau 7). Ces étapes consistaient en un traitement à l'ozone, et/ou au charbon actif en poudre suivi d'une filtration sur sable, ou au charbon actif granulaire, la configuration de chaque pilote est présentée dans la figure 11.

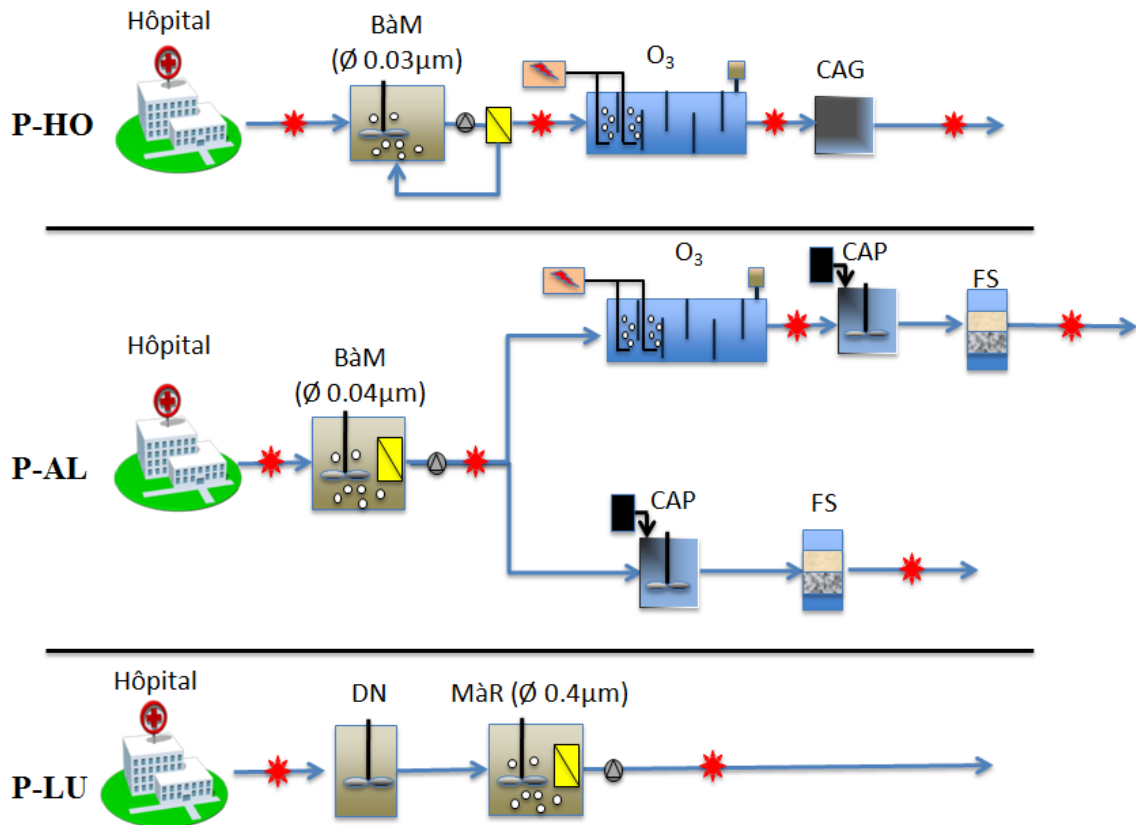



Figure 11 : Configuration et caractéristiques des pilotes étudiés. BâM : bioréacteur à membrane, pour chaque membrane la taille des pores est indiquée ; O₃ : ozonation ; CAG : charbon actif granulaire ; CAP : charbon actif en poudre ; FS : filtration sur sable ; DN : bassin anoxique de dénitrification. Les flèches bleues indiquent le flux du traitement.  : Points de prélèvement ;

 : générateur d'O₃ ;  : pompe ;  : membrane.

1.1.1.5 Eaux de surface

Trois rivières (R1, R2 et R3) ont été échantillonnées sur deux zones géographiques françaises (« France centre »,FC et « France Sud-Est », FSE), et les eaux de deux étangs ont été prélevées sur le site « France Centre » (E1-FC et E2-FC) (Figure 12). Les débits moyens des rivières sont présentés dans le tableau 8. L'étang E1-FC correspondant au site 1 sur la figure 12 est une zone protégée, et l'étang E2-FC correspondant au site 2, est un plan d'eau avec des activités récréatives.

Tableau 8 : Débits moyens des rivières échantillonnées aux points de prélèvement.

	Rivière 1 France Centre (R1-FC) points 4, 5 et 6	Rivière 2 France Centre (R2-FC) point 3	Rivière 3 France Sud-Est (R3-FSE) points 1,2 et 3
Débit moyen (m ³ .j ⁻¹)	4 120 200	1 632 960	6 445 440

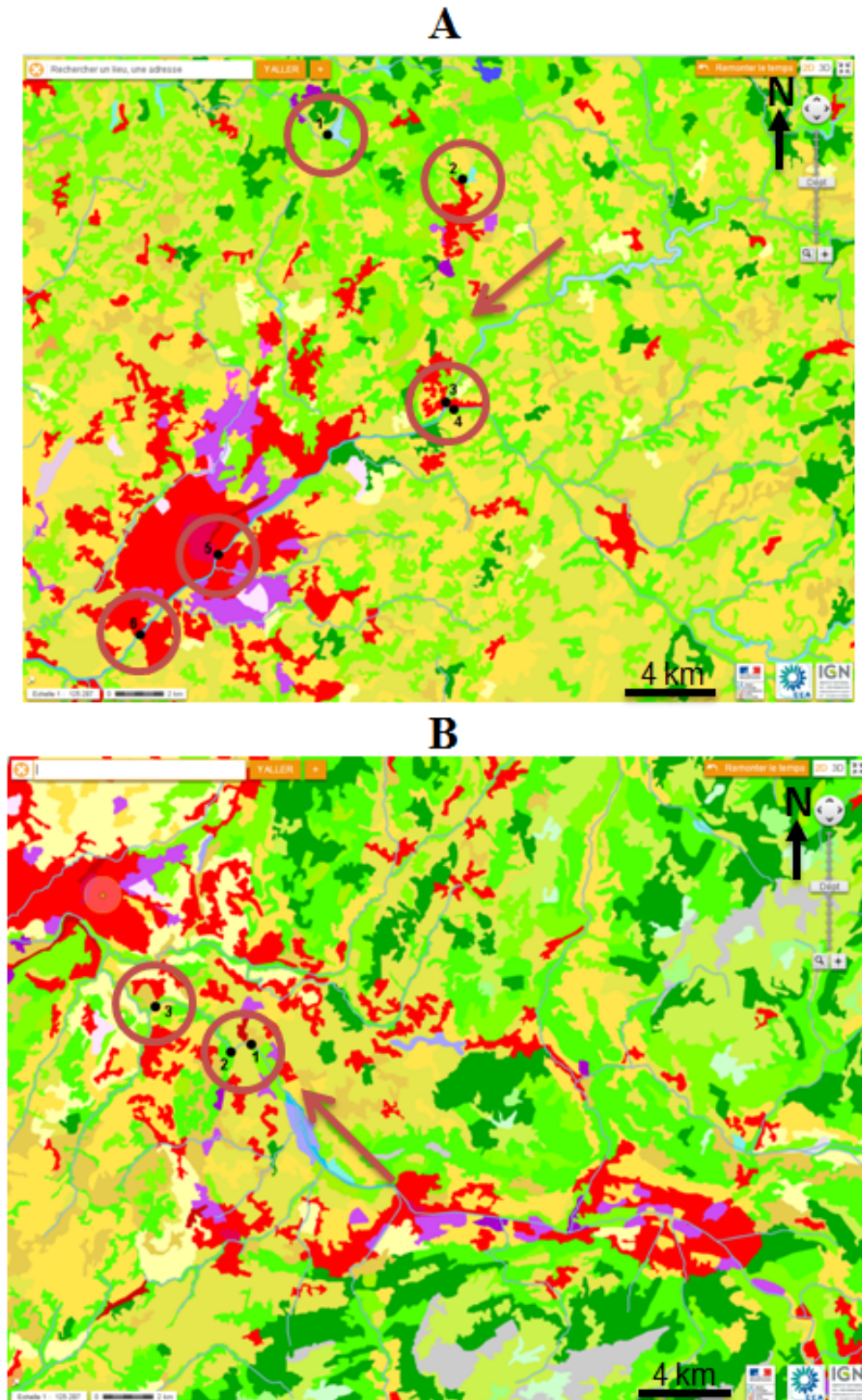


Figure 12 : Localisation des points de prélèvements réalisés pour les rivières et les étangs (A) « France Centre » et (B) « France Sud-Est ». Les teintes de couleurs rouges indiquent les territoires urbains, les teintes de couleurs roses indiquent les territoires industriels, les teintes de couleur jaunes indiquent les territoires agricoles et les teintes de vert indiquent les territoires non exploités (Carte Corinne Land Cover). Les zones de prélèvement sont indiquées par des cercles rouges, et le sens d'écoulement des rivières par une flèche rouge. <http://www.geoportail.gouv.fr>.

1.1.1.6 Lisier et fumier

Le lisier et le fumier ont été échantillonnés sur le site de la ferme expérimentale de la Bouzule située à proximité de Nancy. Cette ferme de 300 ha de terres comprend un élevage de 300 bovins incluant 80 vaches laitières. Cet élevage produit 1392 tonnes de fumier et 1577m³ de lisier par an. Les caractéristiques physicochimiques principales du fumier et du lisier prélevés sont indiquées dans le tableau 9.

Tableau 9 : Caractéristiques physicochimiques du lisier et du fumier prélevés.

Type de prélèvement	Fumier						Lisier Cuve			Lisier frais
Point de prélèvement	1	2	3	4	5	6	1	2	3	1
Température (°C)	36	33	41	50	48	46	14	15	13	14
O ₂ dissout (mg.l ⁻¹)							0,34			0,28
Conductivité (mS.cm ⁻¹)							8,17			10,97
pH							6,62			7,45

1.1.2 Méthode de prélèvement et conditionnement

1.1.2.1 Prélèvement des eaux

Tous les effluents, exceptés les effluents traités du pilote P-HO (après le Bàm, l’ozonation et le charbon actif granulaire), les eaux naturelles (R1-FC, R2-FC, E1-FC, E2-FC), et l’eau potable du robinet, ont été prélevés sur 24h à l’aide de préleveurs automatiques réfrigérés à 4°C. Pour certains prélèvements automatisés et réalisés sur site, correspondant à la rivière R3-FSE, et aux effluents hospitaliers H-FC et H-FSE, des pains de glace étaient placés dans le compartiment de prélèvement des eaux. Les prélèvements étaient asservis au débit ou au temps, dans ce dernier cas les échantillons étaient alors recomposés en prenant en compte les débits afin d’obtenir un échantillon représentatif d’une journée. Une fraction des prélèvements était ensuite prélevée dans des flacons stériles. Les échantillons prélevés ponctuellement ont été directement échantillonnés à l’aide de flacons stériles.

1.1.2.2 Prélèvement des matrices solides

Les échantillons solides (boues de STEP non traitées et traitées, lisiers, fumiers et stabulations) ont été prélevés ponctuellement en utilisant des flacons stériles. Les boues de STEP étant homogénéisées, un prélèvement ponctuel effectué directement au niveau de la recirculation ou au niveau des tanks de stockage des boues traitées a été réalisé. Le fumier et le

lisier n'étant pas homogénéisés, un protocole de prélèvement particulier à chaque matrice a été appliqué afin d'obtenir des échantillons représentatifs :

- **Fumier** : Six points du tas de fumier ont été prélevés au niveau de la zone la plus ancienne (c'est-à-dire à l'arrière du tas). Pour chaque point la température a été prise à environ 50 cm de profondeur avec une sonde (tableau 9). Ensuite la couche superficielle du fumier a été retirée (environ 30 cm) et à l'aide d'une fourche, un seau d'environ 10 L a été rempli. Chaque seau a été vidé séparément sur des sacs puis leur contenu a été homogénéisé manuellement pour former 6 tas de fumier. Puis une fraction de chacun des 6 tas a été prélevée et ont été groupés pour obtenir un échantillon composite. Après homogénéisation de ce dernier, un pot stérile a été rempli.
- **Lisier** : Pour le lisier prélevé dans la cuve de stockage, 3 points de prélèvements ont été choisis : un point au niveau du déversoir de lisier, et un point de part et d'autre du déversoir. Les échantillons récoltés à l'aide d'une perche ont été rassemblés dans un seau de 10 L. Après homogénéisation du lisier dans le seau, les échantillons ont été répartis dans les flacons stériles. La température a été mesurée au niveau des 3 points de prélèvements (tableau 9). L'oxygène dissous et la conductivité ont été mesurés *in situ* dans la cuve au niveau du prélèvement 2. Le pH a été mesuré dans le seau. Un point additionnel correspondant au lisier frais, c'est-à-dire à la sortie de l'étable, a été effectué selon le même protocole. L'oxygène dissous, le pH, la conductivité et la température ont été mesurés *in situ* dans le tas de lisier frais. Aucune différence n'a été observée dans la suite des résultats, par conséquent les valeurs du lisier frais et du lisier de la cuve ont été groupés et rassemblés sous le terme de lisier.

1.1.3 Biologie moléculaire

1.1.3.1 Extraction des acides nucléiques

Les eaux usées (traitées ou non) et les eaux naturelles (rivière/étang) ont été filtrées jusqu'à saturation en triplicat, en utilisant des filtres stériles de 47 mm de diamètre avec une porosité de 0,45 µm (Millipore). L'ADN total des bactéries retenues sur le filtre a été directement extrait à l'aide du kit d'extraction *PowerWater[®] DNA isolation kit* (MoBio Laboratories Inc.), selon les instructions du fournisseur. Pour les matrices solides (boues de STEP, fumiers, lisiers), le kit d'extraction d'ADN total *FastDNA[®] spin kit for feces* (MP Biomedicals) a été utilisé selon le protocole fourni. Dans ce cas, environ 250 mg de fumier, de

lisier ou de boue traitée étaient extraits, ou pour des boues de STEP non traitées à partir d'un culot de 2mL de boues centrifugées (15 min à 15000g). Pour chaque extraction, un témoin d'extraction a été réalisé à partir d'eau distillée stérile pour le protocole « eau », et à partir d'un tube vide pour le protocole « solide ». La qualité des ADN totaux extraits a été vérifiée par électrophorèse sur gel d'agarose 0,8 % (m/v) puis leur quantité a été dosée en triplicat par spectrophotométrie à l'aide d'un *Nanodrop[®] spectrophotometer* (Thermo Scientific). Les ADN ont été ensuite conservés à -20°C.

1.1.3.2 PCR en temps réel

Les intégrons de classe 1, 2 et 3 ont été détectés par PCR en temps réel multiplexe selon le protocole de Barraud *et al.* (2010), et la détection des gènes encodant l'ARNr 16S a été réalisée par PCR en temps réel simplex en utilisant les amorces universelles 338F et 518R ciblant les Eubactéries selon le protocole de Park and Crowley (2006). Les réactions ont été réalisées en triplicat en utilisant le thermocycleur *MX3005P real-time detection system* (Stratagene[®]). Afin de s'affranchir des effets d'inhibiteurs de PCR présents dans les échantillons environnementaux, et coextraits avec l'ADN total, l'ADN matriciel utilisé pour les PCR a été dilué. Pour chaque type de matrice d'eaux ou de solides, la dilution adéquate d'un échantillon d'ADN a été préalablement déterminée par quantification des gènes codant l'ARNr 16S dans une succession de dilutions en série au dixième.

Pour une quantification optimale des gènes *intI1*, *intI2*, *intI3* et des gènes codant l'ARNr 16S, chaque séquence ciblée a été clonée dans un même plasmide standard (pour le détail de la construction du plasmide se référer à l'annexe 2, p. 232). Ainsi une droite étalon comprise entre 10^3 et 10^8 copies du plasmide standard a été effectuée lors de chaque quantification génique. Pour chaque quantification, un contrôle négatif constitué d'eau de qualité biologie moléculaire stérile a été inclus.

Le calcul de la concentration d'IR et de gène codant l'ARNr 16S a été réalisé en soustrayant les valeurs obtenues pour le témoin d'extraction, et en prenant en compte le volume d'eau filtrée ou la masse sèche extraite pour les matrices solides. Selon la base de données *Ribosomal RNA Database*, le nombre moyen de copies par bactérie est estimé à 4,1 (Klappenbach *et al.*, 2001). Ainsi la quantité de bactéries présentes dans chaque échantillon a été estimée en divisant la quantité de gènes codant l'ARNr 16S déterminée par 4,1. Comme cette quantité est basée sur un dosage à partir de l'ADN et non un comptage direct des bactéries,

dans la suite de ce chapitre, cette quantité de bactéries estimée est indiquée par le terme *Bact-16S*. Pour chaque extrait d'ADN, l'abondance relative des IR a été calculée en divisant la concentration moyenne d'IR par la concentration moyenne de *Bact-16S* estimée (Hardwick *et al.*, 2008). Le test statistique de Mann-Whitney a été appliqué à l'aide du logiciel *StatView*® 5.0 software (SAS institute Inc.), une « p-value » < 0,05 étant considérée comme significative.

1.1.3.3 Imagerie par microscopie confocale

Le marquage par fluorescence de la viabilité bactérienne a été réalisé en utilisant le kit *LIVE/DEAD*® *BacLight*™ *Bacterial Viability Kits* (Molecular Probes), selon les recommandations du fournisseur. Le SYTO®9 est un agent intercalant de l'ADN qui marque les bactéries mortes et vivantes, alors que l'iodure de propidium, qui est aussi un agent intercalant de l'ADN, pénètre uniquement les membranes endommagées. La présence de l'iodure de propidium réduit la fluorescence du CYTO®9 résultant en un marquage rouge pour les bactéries non viables. Des fragments de filtres découpés stérilement et déposés sur des lames stériles ont été immergés avec 200 µl d'une solution diluée 300 fois de la solution équimolaire de SYTO®9 et d'iodure de propidium à 1,67 mM. Les acquisitions ont été réalisées entre lame et lamelle avec un microscope confocal *LSM 510* (Zeiss). Les longueurs d'ondes d'excitation permettant de visualiser la fluorescence des marqueurs utilisés étaient de 488 nm et de 543 nm pour la fluorescence verte et rouge, respectivement. Afin de garantir la stérilité de la manipulation, un contrôle réalisé sur site en filtrant de l'eau distillée stérile, et un contrôle réalisé au laboratoire avec un filtre stérile ont été réalisés en même temps que les autres échantillons. Aucune fluorescence n'a été détectée dans les expériences contrôles.

1.1.3.4 Analyse de la diversité bactérienne par PCR-DGGE

La PCR-DGGE a été réalisée selon le protocole décrit par Laurent *et al.* (2011), avec quelques modifications. L'amorce universelle 341F comportant une « GC clamp » et l'amorce universelle 518R ont été utilisées pour amplifier un fragment du gène codant l'ARNr 16S des Eubactéries (Muyzer *et al.*, 1993). La PCR a été réalisée à partir de 1 ng.L⁻¹ d'ADN dans un mix réactionnel final de 100 µL. Vingt-cinq microlitres de produits PCR ont ensuite été déposés sur un gel d'acrylamide/polyacrylamide (37,5:1) contenant un gradient dénaturant linéaire de 40 % à 60 % d'urée (m/v) et de formamide (v/v). L'électrophorèse a été réalisée pendant 15 h à 100 V dans du tampon TAE 1X et à une température de 60 °C, à l'aide du système *D-code universal mutation detection system* (Bio-Rad Laboratories). Après 20 min de coloration avec

une solution de *GelStar™ nucleic acid stain solution* (Lonza), et 20 min de décoloration dans de l'eau distillée, les gels ont été visualisés sous lumière UV à l'aide du *molecular imager® GelDoc™ XR* (Biorad) et finalement analysés en utilisant le logiciel *Quantity One Quantitation Software Version 4.6.1* (Bio-Rad). La similarité des profils obtenus, basée sur la présence ou l'absence des bandes, a été calculée à partir de l'indice statistique de Bray-Curtis en utilisant le logiciel *Primer6 version 6.1.6* (Plymouth Routines In Multivariate Ecological Research).

1.1.3.5 Analyses physicochimiques

Le détail des méthodes employées pour mesurer la DBO5, la DCO, l'azote total, les MES est présenté dans l'annexe 2, p. 231.

1.2 Résultats et discussion

1.2.1 Estimation des IR dans les matrices anthropiques

Il s'agit dans cette partie, d'établir la faisabilité de la recherche globale des IR comme indicateur de charge de la résistance dans toute une série de matrices, et d'évaluer l'implication des effluents d'origine hospitalière et de la filière carnée bovine dans la dissémination de l'antibiorésistance *via* ce biomarqueur. Ainsi, une étude sur un large panel d'échantillons d'origines anthropique et géographique diverses a été conduite. Des effluents d'activités de soins généraux et gériatriques, des effluents urbains, des effluents de STEP, des effluents d'abattoirs de bœufs ou de veaux, et des résidus biologiques solides de STEP et d'une ferme bovine ont été étudiés.

Le détail de la composition de chaque classe d'IR n'est pas analysé, cependant cela sera examiné dans le chapitre 3 de la partie, p.135. Néanmoins, tout au long de cette étude, les IR de classe 1 ont représenté la fraction majeure des IR.

1.2.1.1 Concentrations des IR dans les matrices liquides et solides

1.2.1.1.1 Les matrices liquides

La figure 13 rapporte les différentes concentrations d'IR dans les matrices anthropiques étudiées, au regard des concentrations présentes dans des eaux naturelles, servant de référentiel. Comparativement à ces dernières, les concentrations d'IR se sont révélées élevées dans tous les effluents anthropiques. Ces valeurs sont du même ordre de grandeur que les concentrations d'IR d'effluents arrivant dans des STEP municipales selon Zhang *et al.* (2009a, 2009b). Bien que les plus fortes concentrations d'IR aient été retrouvées dans certains effluents hospitaliers, les variations des concentrations observées d'un site à l'autre semblent indépendantes de l'origine médicale, urbaine ou d'abattoir, et ne font pas ressortir un type d'effluent particulier comme une source majeur d'IR. Ainsi ces résultats montrent que quantitativement tous ces effluents peuvent contribuer à l'introduction d'IR dans l'environnement.

Résultats et discussion

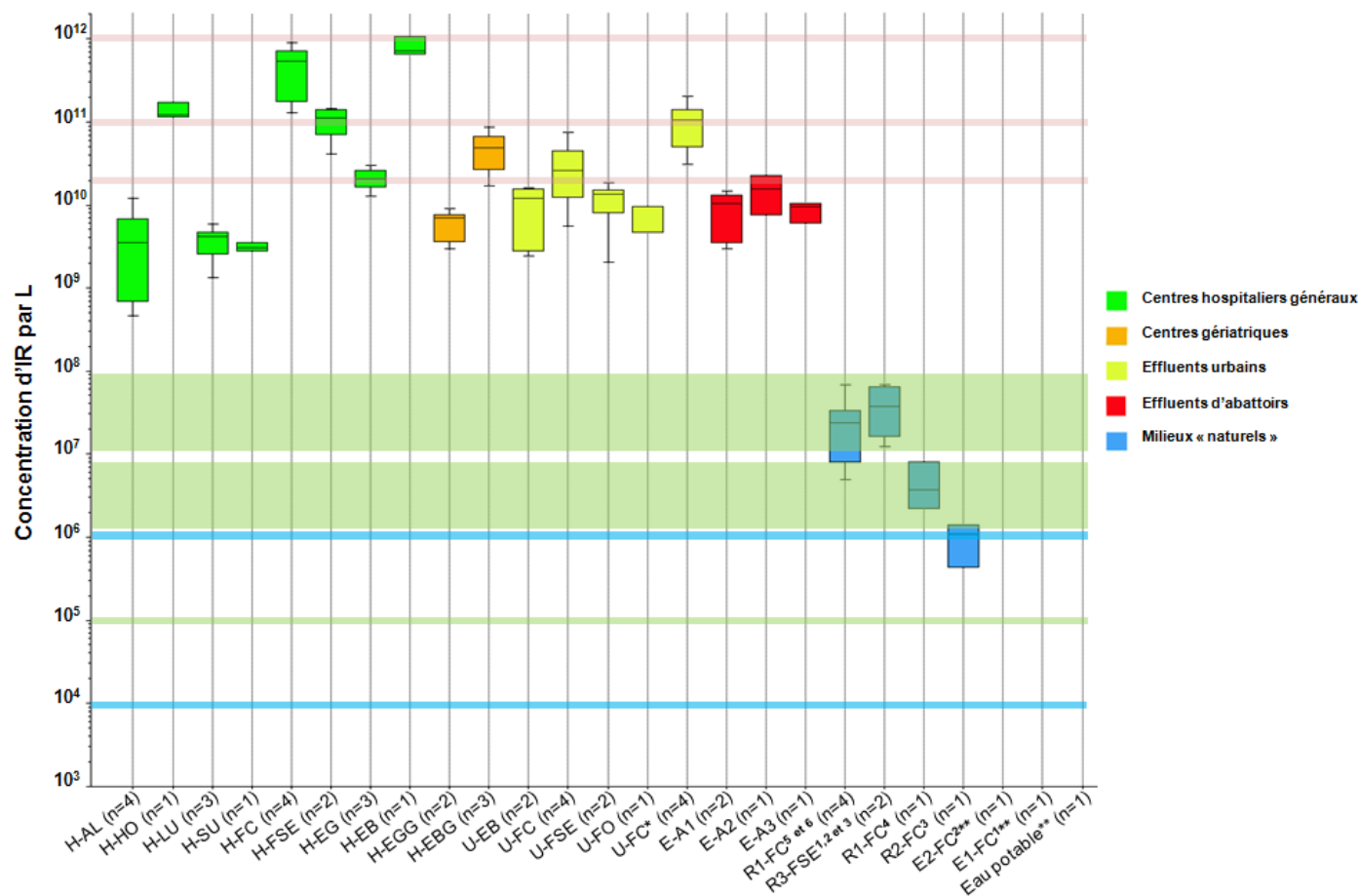


Figure 13 : Graphe en boîtes représentant la répartition des concentrations totales d'IR mesurées dans les différents prélèvements. Les boîtes représentent le 1^{er} et le 3^{ème} quartiles séparés par la médiane, et les valeurs minimum et maximum sont indiquées par les écarts. Pour les rivières et étangs, les points de prélèvement correspondant à la figure 12 sont indiqués en exposant. Les surlignages représentent les gammes de valeurs précédemment décrites dans la littérature, en rouge : pour des effluents arrivant dans des STEP (Zhang *et al.*, 2009b, 2009a), en vert : des eaux de rivières avec impact anthropique (Zhang *et al.*, 2009a; Luo *et al.*, 2010; Lapara *et al.*, 2011), en bleu : des eaux de rivières sans impact anthropiques (Wright *et al.*, 2008; Lapara *et al.*, 2011). n, nombre de fois où l'échantillonnage a été répété (chaque échantillon a été prélevé en triplicata) ; *, effluent urbain comprenant aussi les effluents hospitaliers de l'H-FC ; **, échantillons pour lesquels aucun IR n'a été détecté.

Effluents d'origine hospitalière

Au total, 10 centres hospitaliers comprenant 2 effluents issus de soins gériatriques, répartis sur 6 pays Européens différents ont été étudiés. Les concentrations d'IR sont très variables entre ces différents points, allant de $4,07.10^8$ à $1,17.10^{12}$ copies.L⁻¹ respectivement pour l'H-AL et l'H-BG (figure 13).

De nombreuses variables peuvent influencer ces concentrations, car les activités hospitalières varient au cours de la semaine, ou des saisons, impactant les paramètres physicochimiques et microbiologiques des effluents (Kümmerer et Henninger, 2003; Botitsi *et al.*, 2007; Diwan *et al.*, 2010). Cependant de nombreux autres facteurs peuvent influencer les variations de concentrations d'IR observées, telles que les activités cliniques collectées au niveau du réseau d'eau usée et leur dilution avec des eaux de pluies, des effluents de laverie ou de restauration. Dans le cas des effluents issus de soins gériatrique, structures où les patients sont soumis à des antibiothérapies moins importantes mais de plus longue durée (tableau 3), les concentrations d'IR sont variables et du même ordre de grandeur que dans certains effluents hospitaliers.

Effluents d'origine urbaine

Dans les trois zones géographiques pour lesquelles des effluents hospitaliers et des effluents urbains non influencés par des activités cliniques ont été étudiés (le site « France Centre », le site « France Sud-Est » et le site « Ecosse Borders »), les concentrations d'IR détectées sont significativement plus importantes dans les effluents hospitaliers que dans les effluents urbains non influencés. Ces résultats amènent à penser que pour une zone géographique donnée, l'antibiorésistance dans les effluents d'hôpitaux serait plus importante que dans les effluents urbains. De plus, les concentrations d'IR dans l'effluent urbain U-FC, comprenant à la fois l'effluent hospitalier H-FC et tous les autres effluents de la ville, sont significativement supérieures aux concentrations de l'effluent urbain U-FC sans activité hospitalière (figure 13). Ce dernier résultat suggère un effet possible des effluents hospitaliers sur le contenu des IR arrivant à la STEP municipale. L'analyse plus détaillée de ce point est effectuée dans le chapitre 3, p.135. Toutefois, par comparaison avec la totalité des prélèvements effectués sur toutes les zones géographiques, les concentrations retrouvées dans les effluents urbains peuvent aussi bien être égales ou supérieures aux concentrations retrouvées dans des effluents hospitaliers. Par exemple, les concentrations d'IR dans les effluents hospitaliers H-AL, H-LU et H-SU sont équivalentes aux concentrations retrouvées dans les effluents urbains

ne collectant pas d'activité hospitalière, alors que les concentrations dans les effluents H-HO, H-FC et H-EB sont significativement supérieures.

Effluents provenant d'abattoirs

Trois effluents d'abattoirs ont été étudiés, comportant 2 abattoirs de bœufs et un abattoir de veaux. Les concentrations d'IR retrouvées pour ces trois sites sont relativement homogènes et correspondent aux gammes de concentrations mesurées dans les autres effluents (urbains ou hospitaliers).

Milieux naturels

Pour les rivières échantillonnées, les concentrations sont variables et comprises entre $2,22.10^5 \pm 2,87.10^4$ et $8,15.10^7 \pm 1,69.10^6$ copies.L⁻¹, respectivement pour les rivières R2-FC et R1-FC, alors que pour les étangs et l'eau potable les concentrations sont sous la limite de quantification fixée à $6,6.10^4$ copies.L⁻¹ selon le témoin d'extraction utilisé lors de cette manipulation. Les rivières présentant les plus fortes concentrations d'IR sont situées dans des zones urbaines, ou en aval de zones urbaines et/ou de sites industriels (figure 12). Bien que la corrélation statistique entre le taux de contamination des rivières échantillonnées, et leur concentration en IR n'ait pas été réalisée, ces résultats confirment que la proximité de milieux naturels avec des activités anthropiques augmente les concentrations d'IR au sein des communautés bactériennes (Wright *et al.*, 2008; Luo *et al.*, 2010). De plus, les valeurs les plus élevées sont du même ordre de grandeur que celles précédemment décrites dans des rivières ayant des influences agricoles et/ou urbaines (Luo *et al.*, 2010; Lapara *et al.*, 2011).

1.2.1.1.2 Les matrices solides

Pour évaluer la concentration des IR dans des matrices solides, un panel de résidus biologiques issus de l'activités d'épuration d'effluents municipaux (S-FC), d'effluents hospitaliers (P-AL et P-LU), d'effluents d'abattoirs (S-A1, S-A2, et S-A3), et des résidus biologiques issus de la production bovine (fumier, lisier et stabulation), ont été étudiés (figure 14).

Avec une variation maximale de la concentration des IR de 1,6 log, les concentrations retrouvées dans les boues activées non traitées sont relativement homogènes (figure 14). Ces concentrations d'IR sont du même ordre de grandeur que celles de boues activées d'une STEP municipale étudiée par Ma *et al.* (2011), et où 5.10^9 copies d'IR par gramme de boues sèches étaient quantifiées. Une réduction de la concentration des IR suite aux traitements des boues

des STEP S-A1, S-A2 et S-A3 est observé. Cependant ces réductions sont significatives seulement lorsque les boues sont chaulées (S-A1), permettant de diminuer la concentration de 1,2 log, alors que des procédés de traitement des boues par digestion anaérobie optimisés, permettent des réductions de la concentration d'IR pouvant aller jusqu'à 3 log (Ma *et al.*, 2011).

Avec une variation maximale de la concentration des IR de seulement 1,8 log, les concentrations dans le lisier, le fumier et les stabulations sont relativement homogènes. Toutefois, le lisier correspond aux plus hautes concentrations d'IR par gramme de poids sec (figure 14). Dans ces mêmes échantillons, les concentrations d'IR sont, à 1 log près, équivalentes aux boues traitées des STEP d'abattoirs, montrant que ces deux types de matrices peuvent potentiellement contribuer de manière équivalente à la dissémination d'IR dans les sols *via* leur amendement.

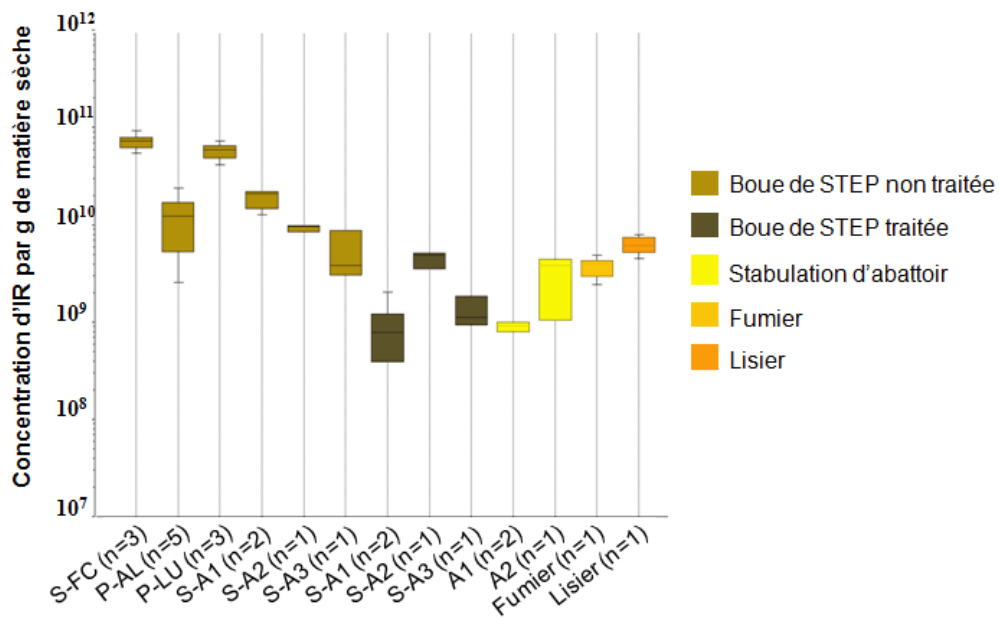


Figure 14 : Graphe en boîtes représentant la répartition des concentrations d'IR par gramme de matière sèche dans les matrices solides étudiées.

Peu de données sur la concentration des IR et exprimant des résultats par gramme de matière sèche sont disponibles. Néanmoins dans des sédiments de rivière avec des influences anthropiques, des concentrations d'IR d'environ 10⁸ copies par gramme de sédiments secs ont été quantifiées par Luo *et al.* (2010), suggérant que les matrices anthropiques solides étudiées constitueraient une voie de dissémination d'IR d'origine anthropique dans les sols.

Conclusions intermédiaires

- ➔ *Des concentrations importantes d'IR dans toutes les matrices anthropiques étudiées ont été observées.*
- ➔ *La proximité de milieux naturels avec des activités anthropiques augmente les concentrations d'IR au sein des communautés bactériennes*
- ➔ *Selon les activités ciblées, aucun effluent ou résidu biologique solide ne semble être une source quantitative d'IR plus importante que les autres.*
- ➔ *Les boues de STEP d'abattoirs de bœufs, les lisiers et les fumiers issus de la production bovine peuvent potentiellement contribuer de manière équivalente à la dissémination d'IR dans les sols via leur amendement.*

1.2.1.2 Abondances relatives des IR dans les matrices liquides et solides

1.2.1.2.1 Les matrices liquides

Afin d'étudier les quantités d'IR indépendamment de la charge bactérienne de chaque effluent, l'abondance relative des IR a été calculée en divisant leur concentration par la concentration bactérienne, estimée à partir de la quantification des gènes codant l'ARNr 16S (*Bact-16S*). Ainsi cette valeur nous permet d'exprimer une certaine image de la prévalence des IR dans les différentes communautés bactériennes étudiées, tout en sachant les limites de notre approche, telles que le fait que toutes les bactéries ne possèdent pas d'IR, et que les IR peuvent être portés par des éléments génétiques présents en plusieurs exemplaires dans une bactérie.

Effluents d'origine hospitalière

Les abondances relatives des IR dans les effluents hospitaliers varient de 0,9 à 4,8, à l'exception du site hospitalier H-EG, et sont significativement plus élevées par rapport à tous les autres échantillons (figure 15). Ainsi, dans la totalité des effluents non hospitaliers, les abondances relatives des IR sont inférieures à 0,5. Pour les effluents de soins gériatriques, les abondances relatives sont égales aux effluents urbains sans activité hospitalière, avec des valeurs comprises entre 0,036 et 0,295 pour ces deux types d'effluents.

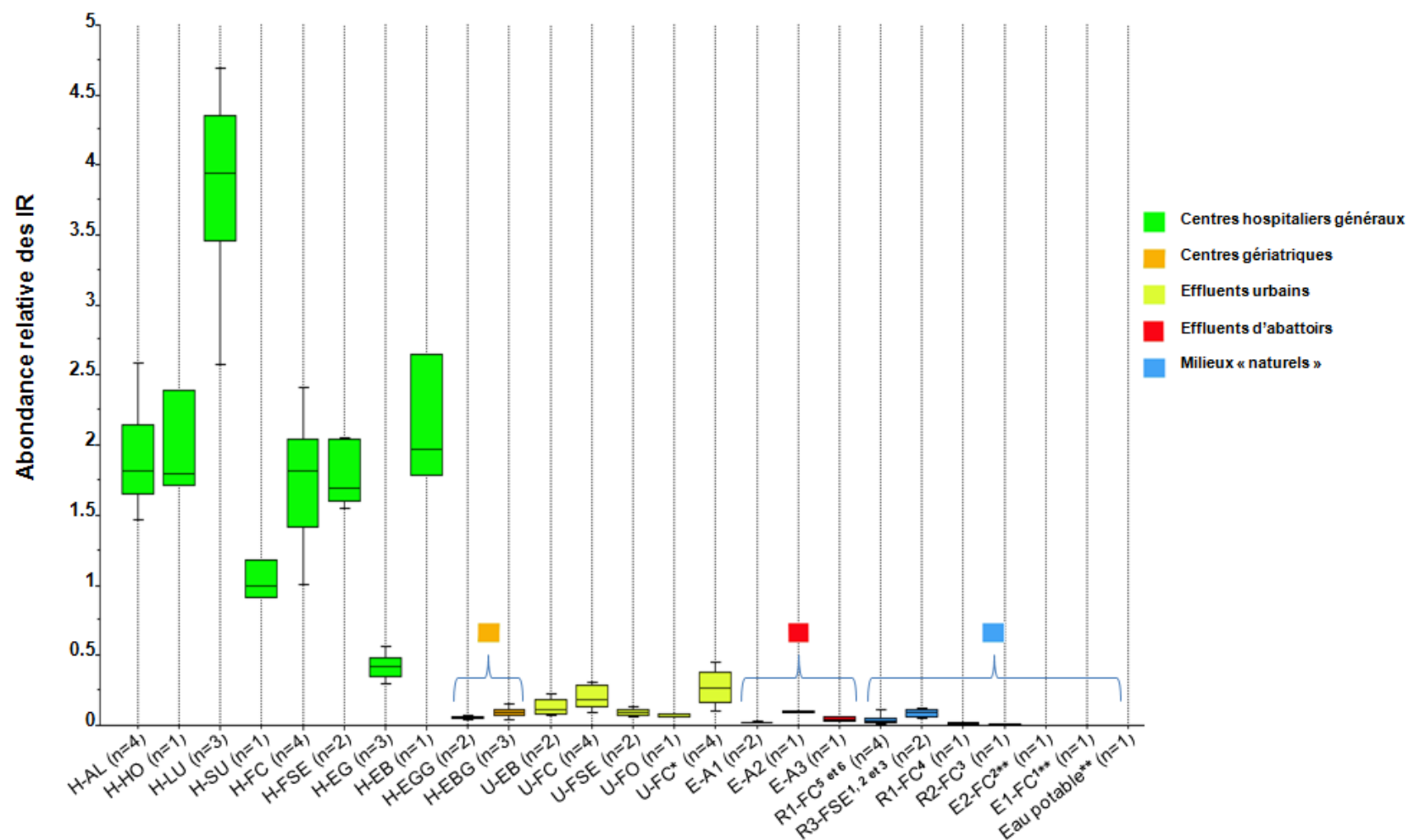


Figure 15 : Graphe en boîtes représentant la répartition des abondances relatives d'IR dans les différents prélèvements. Les boîtes représentent le 1^{er} et le 3^{ème} quartiles séparés par la médiane, et les valeurs minimum et maximum sont indiquées par les écarts. Pour les rivières et étangs les points de prélèvement correspondant à la figure 12 sont indiqués en exposant. n, nombre de fois ou l'échantillonnage a été répété (chaque échantillon a été prélevé en triplicata). *, effluent urbain comprenant aussi les effluents hospitaliers de l'H-FC ; **, échantillons pour lesquels aucun IR n'a été détecté

Autres effluents et milieux naturels

Les effluents urbains incluant des activités de soins présentent en moyenne des abondances relatives globalement supérieures, mais significativement non différentes avec les autres effluents urbains, et sont comprises entre 0,153 et 0,459. Pour les effluents d'abattoir, les abondances relatives sont comprises entre 0,017 et 0,104, soit des valeurs proches des milieux naturels étudiés où les IR sont détectés. En effet pour ces milieux naturels les valeurs d'abondance relatives sont comprises entre 0,003 et 0,128.

Avec des valeurs d'abondance relative moyenne 3 à 280 fois plus élevées que dans les effluents urbains et de 10 à 1 600 fois plus importantes que dans les milieux naturels, la proportion des IR dans les communautés bactériennes des effluents issus des activités hospitalières est globalement plus importante que dans tous les autres effluents anthropiques. Dans les environnements hospitaliers, la sélection de bactéries résistantes est associée à la pression de sélection exercée par les fortes concentrations d'antibiotiques (Vander Stichele *et al.*, 2006). Ainsi certaines études rapportent des portages d'IR élevés chez des souches isolées de milieux cliniques (Gu *et al.*, 2008; Mokracka *et al.*, 2011; Koczura *et al.*, 2012). Ces résultats suggèrent que le potentiel de dissémination de l'antibiorésistance dans les STEP par les IR est plus important avec les effluents d'activité clinique qu'avec les autres effluents d'origine anthropique. Toutefois il semblerait que les effluents issus de certaines activités spécialisées telle que la gériatrie, où l'antibiothérapie est moins importante mais avec une hospitalisation des patients plus longue, ne soit pas une source de sélection d'IR aussi importante que les autres activités cliniques. Néanmoins, il a été montré que pour *E. coli*, les prévalences de bactéries résistantes, multirésistantes, et hébergeant des IR de classe 1 sont significativement plus importantes dans un effluent d'une maison de retraite que dans un effluent d'hôpital. Ainsi les auteurs suggéraient un effet plus significatif d'une antibiothérapie longue sur la sélection de l'antibiorésistance (Oberlé *et al.*, 2012).

Les IR sont des éléments génétiques ubiquitaires et retrouvés dans de nombreux environnements sans impact anthropique (Gillings *et al.*, 2008a). Pour les différents milieux naturels testés, les abondances relatives sont systématiquement inférieures à 0,128. Dans la littérature, sur la base d'approches expérimentales similaires, des abondances relatives inférieures à 0,09 sont décrites pour des matrices telles que des rivières ou lacs (Gillings *et al.*, 2008b; Hardwick *et al.*, 2008; Wright *et al.*, 2008). Il semblerait que, malgré les biais possibles liés à la méthodologie employée entre les différentes études (extraction d'ADN, amorces

différentes), l'abondance des IR dans les communautés bactériennes des milieux naturels ne dépasse pas un certain seuil, correspondant probablement au « bruit de fond » d'IR naturellement présent dans les communautés bactériennes.

1.2.1.2.2 Les matrices solides

Les valeurs d'abondance relative des boues activées du Bàm du pilote P-LU traitant les effluents hospitaliers H-LU sont presque 10 fois supérieures aux autres matrices solides (figure 16). Comme les boues constituent un mélange entre les bactéries épuratrice des boues, et les bactéries de l'effluent les alimentant, cette différence est très probablement due à l'abondance relative élevée des IR dans les effluents hospitaliers H-LU (figure 15). Ces résultats suggèrent que dans certain cas, les activités hospitalières pourraient augmenter la proportion relative d'IR dans les boues d'épuration, accroissant conséquemment la probabilité de dissémination de l'antibiorésistance dans l'environnement *via* la dissémination d'IR. Cependant ce phénomène n'a été observé que pour un seul site incitant à une certaine prudence dans l'interprétation. En effet, pour le second site du même type, correspondant au Bàm du pilote P-AL traitant spécifiquement des effluents hospitaliers, les abondances relatives d'IR sont équivalentes à une STEP municipale (figure 16). Ainsi des études plus approfondies sur ce sujet sont encore nécessaires afin de d'évaluer ce risque à sa juste valeur.

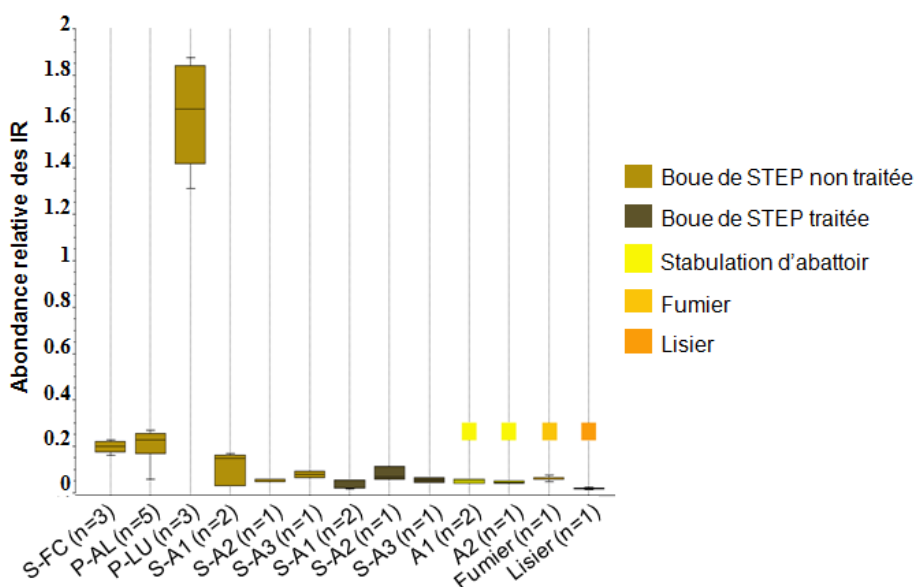


Figure 16 : Graphe en boîtes représentant la répartition des abondances relatives d'IR dans les matrices solides étudiées.

Pour toutes les autres matrices, les abondances relatives des boues traitant des effluents municipaux ou d'hôpital (S-FC, $0.20 \pm 0,06$ et P-AL, $0.19 \pm 0,08$, respectivement) sont en moyenne plus élevées que dans les boues de STEP d'abattoirs traités, le lisier, le fumier et la stabulation, et où ces valeurs sont respectivement de $0.066 \pm 0,019$, $0.018 \pm 0,004$, $0.062 \pm 0,010$, et $0.047 \pm 0,007$. Globalement, ces proportions sont plus élevées que dans des sols sans influence anthropique, où les abondances relatives rapportées sont de l'ordre de $3,6 \cdot 10^{-5}$ et $2,0 \cdot 10^{-6}$ (Byrne-Bailey *et al.*, 2010; Gaze *et al.*, 2011). Ainsi ces auteurs ont montré que l'application de lisiers de porc ou de boues traitées de STEP augmenterait significativement les abondances relatives d'IR à long terme dans les sols receveurs.

Conclusions intermédiaires

- ➔ *La proportion d'IR est spécifiquement plus importante dans les communautés bactériennes des effluents hospitaliers que dans toutes les autres matrices étudiées. Ceci suggère que les environnements hospitaliers seraient une source de sélection plus importante de souches hébergeant des IR, incitant à une certaine vigilance dans la gestion de ces effluents*
- ➔ *Un impact potentiel du traitement des effluents hospitaliers sur la proportion des IR dans les communautés bactériennes des boues d'épuration a été observé, nécessitant des investigations plus poussées.*

1.2.2 Devenir des IR dans les matrices liquides des procédés conventionnels et avancés.

Dans le chapitre précédent, des concentrations élevées d'IR ont été mises en évidence dans tous les effluents anthropiques étudiés. Il est donc nécessaire de réduire leur concentration avant leur rejet dans les milieux naturels récepteurs, pour réduire au maximum la dissémination dans l'environnement d'IR provenant d'activités anthropiques. Ainsi, afin d'évaluer l'influence des procédés de traitement à boue activée sur les concentrations d'IR et de bactéries, les efficacités particulières de plusieurs STEP, utilisées pour traiter les effluents municipaux ou d'abattoirs, ont été évaluées.

1.2.2.1 Stations d'épuration à boue activée (STEP)

Les procédés conventionnels par boues activées permettent une diminution maximale significative de 2 log de la concentration totale d'IR et de *Bact-16S*² initialement présentes dans les effluents bruts (figure 17), et ce, indépendamment de l'origine de l'effluent (urbain comprenant ou non des activités hospitalières, ou provenant d'abattoir).

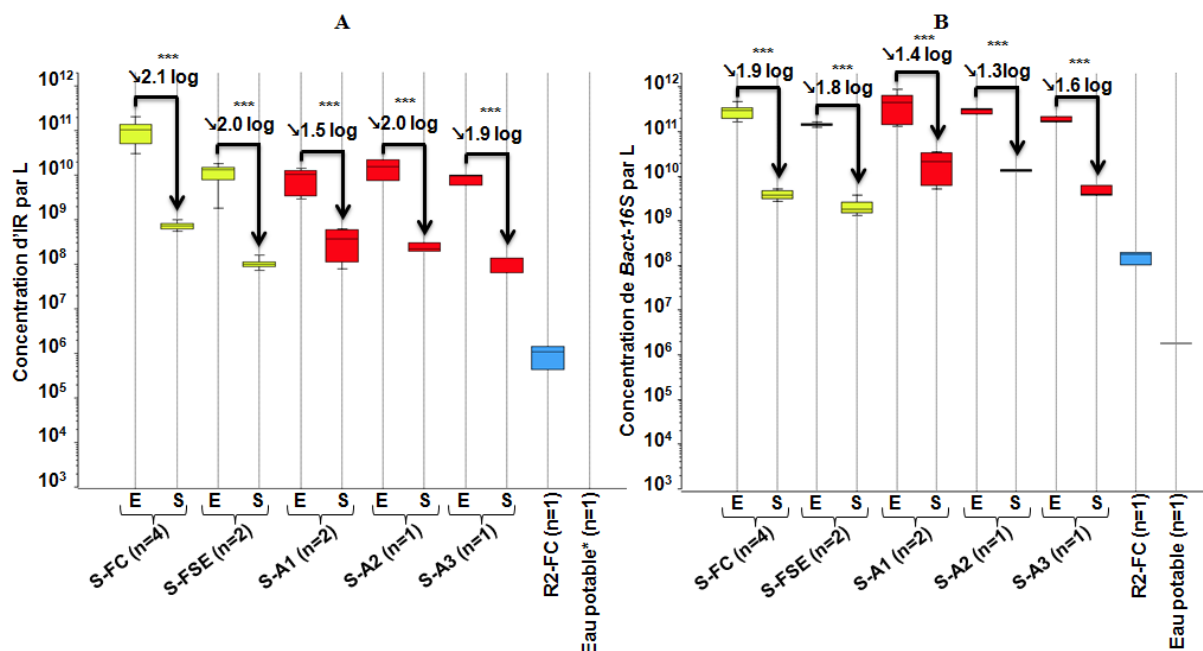


Figure 17 : Graphe en boîtes représentant la répartition des concentrations (A) d'IR et (B) de *Bact-16S* par litre d'eau d'entrée (E) et de sortie (S) de STEP traitant des effluents urbains (jaune) ou d'abattoirs (rouge), ainsi que les résultats obtenus pour une rivière (R2-FC) et de l'eau potable du robinet (bleu). L'abattement moyen de la concentration pour chaque site est exprimé en log₁₀ de la concentration. ***, p < 0,01 ; n, nombre de fois où l'échantillonnage a été réalisé (chaque échantillon a été prélevé en triplicata), *valeur sous la limite de quantification.

² Le terme de *Bact-16S* est employé pour faire référence au fait que dans cette étude, la présence de bactéries se fait au moyen de la mesure de la quantité de gènes codant l'ARNr 16S.

Un abattement d'environ 2 log est usuel en STEP à boue activée (Novo et Manaia, 2010).

Les concentrations d'IR dans les effluents traités urbains et les effluents traités d'abattoirs sont du même ordre de grandeur. Cependant l'efficacité des traitements, sans procédé de désinfection spécifique, ne permet pas de réduire de manière totale la possibilité de dissémination d'IR dans l'environnement. En effet les concentrations d'IR dans les effluents traités sont environ plus élevées de 2 log que dans une rivière sans influence anthropique majeure (figure 17A), et les concentrations de *Bact-16S*, sont respectivement d'environ 1 log plus élevées que dans ce même milieu naturel, et de 2 à 3 log de plus que dans une eau potable du robinet (figure 17B). Ainsi, rapportées au flux d'eau traitée par jour, entre 8.10^{13} et 3.10^{16} copies d'IR sont ainsi déversées quotidiennement dans les rivières par la voie des effluents traités de STEP municipales ou d'abattoirs.

Concernant l'abondance relative, la proportion d'IR dans les effluents municipaux traités est diminuée de manière plus ou moins significative (figure 18). Ces résultats suggèrent que les STEP municipales à boues activées ne permettent pas d'éliminer de manière spécifique les bactéries portant des IR par rapport aux autres bactéries. Ce type d'évolution, suite au traitement opéré par des STEP municipales, a déjà été observé pour certains gènes de résistance et bactéries résistantes (Łuczkiwicz *et al.*, 2010; Munir *et al.*, 2011; Czekalski *et al.*, 2012). Dans certains cas, des augmentations de l'abondance relative de bactéries résistantes ont été rapportées, suggérant que ces bactéries seraient moins bien éliminées (Zhang *et al.*, 2009c; Czekalski *et al.*, 2012).

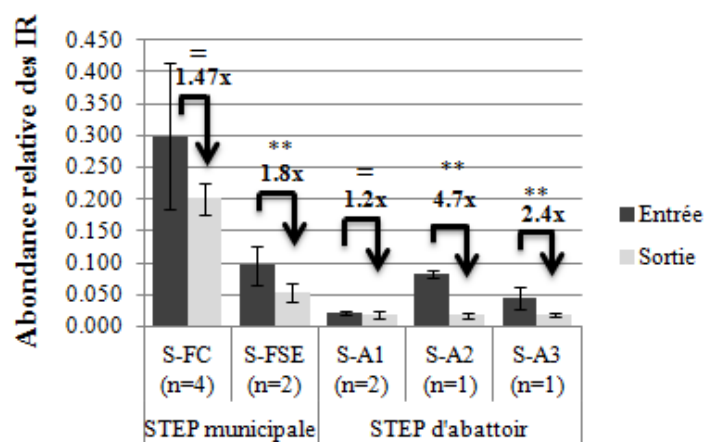


Figure 18 : Abondance relative moyenne des IR au cours des procédés opérés par des STEP à boues activées classiques. Le facteur de réduction moyen, correspondant au ratio de la valeur avant et après traitement, est indiqué pour chaque étape. **, $p < 0,05$; =, $n > 0,05$. n, nombre de fois où l'échantillonnage a été réalisé (chaque échantillon a été prélevé en triplicata).

Toutefois, les STEP étudiées tendent à diminuer l'abondance relative des IR dans les populations bactériennes. Par exemple, pour les STEP d'abattoir, des diminutions significatives sont observées pour les deux sites où les abondances relatives d'IR sont les plus élevées (figure 18). Il semble donc que ces bactéries provenant des effluents et hébergeant des IR soient plus sensibles au procédé, et/ou moins adaptées à l'écosystème épurateur. Ainsi, suite au traitement opéré ces STEP, les valeurs d'abondance relative d'IR dans les effluents de STEP sont égales aux abondances relatives d'IR de milieux naturels (0,018). Ces résultats montrent que les populations bactériennes des effluents traités d'abattoirs ne présentent pas une proportion anormalement élevée d'IR, et que l'introduction d'IR dans l'environnement *via* ces effluents, est majoritairement due aux fortes concentrations de bactéries présentes dans les effluents traités.

Conclusions intermédiaires

- ➔ *Les STEP n'éliminent pas complètement les bactéries hébergeant des IR.*
- ➔ *Les STEP, rassemblant localement les effluents, induisent au point de rejet le déversement de larges quantités d'IR dans les milieux naturels.*

1.2.2.2 Influence de procédés avancés pour le traitement des effluents hospitaliers

L'analyse précédemment réalisée sur un panel d'effluents d'origines anthropiques diverses, a mis en évidence des proportions d'IR plus importantes dans les communautés bactériennes des effluents hospitaliers, par rapport aux effluents d'abattoirs, urbains, ou de centres gériatriques.

De part leur contribution à l'introduction de composés pharmaceutiques dans les STEP, et pouvant avoir des effets écotoxiques sur l'environnement, le traitement à la source des effluents hospitaliers est de plus en plus envisagé (Escher *et al.*, 2011). Ainsi, dans le cadre du projet européen PILLS visant à étudier la faisabilité du traitement sur site des effluents hospitaliers, plusieurs procédés de type Bàm, associés à des traitements avancés ont été évalués. Cette évaluation globale s'est basée sur des critères d'efficacité au regard de molécules d'activité de soins, d'écotoxicité, de données économiques, d'impact environnemental global et de la réduction des bactéries et des IR. Ce chapitre se focalisera uniquement sur l'analyse de ce dernier point, pour laquelle deux types de procédés de Bàm, utilisant la microfiltration et l'ultrafiltration, ont été suivis. Les autres informations figurent dans le rapport PILLS (Pharmaceuticals input and elimination from local sources: Final report of the European cooperation project PILLS, 2012).

1.2.2.2.1 Influence sur les concentrations de *Bact-16S* et d'IR.

Les rendements de réduction des IR et des *Bact-16S* avec le Bàm utilisant la microfiltration (P-LU) sont inférieurs à 2 log (figure 19A et 19B), et par conséquent inférieurs aux rendements de STEP à boue activée classiques. Actuellement, le seuil physique considéré comme arrêtant les bactéries est situé à 0,2 µm, même si certains auteurs rapportent des phénomènes d'infiltration de *Brevundimonas diminuta* ou de *Listeria monocytogenes* après des temps de contact plus ou moins longs sur des membranes de 0,2µm, ou le passage de bactéries de taille inférieure à 0,2µm et appartenant à l'espèce *Hydrogenophaga pseudoflava* (Lee *et al.*, 2010). Au-delà du seuil de 0,2µm, la microfiltration est connue pour ne pas arrêter physiquement toutes les bactéries, expliquant les très faibles taux de réduction de la concentration bactérienne obtenus pour le Bàm utilisant de la microfiltration avec un seuil de coupure de 0,4µm (P-LU). Par conséquent, les concentrations d'IR et de *Bact-16S* dans les effluents traités sont plus élevées que dans des milieux naturels sans influence anthropique majeure d'un facteur d'environ 2 log.

Avec les Bàm utilisant l'ultrafiltration (P-AL et P-HO), les abattements des concentrations d'IR varient en moyenne de 2,9 à 5 log (figure 19A). Ces rendements sont en moyenne plus élevés que les rendements de 2,5 log observés pour le gène *sulI* dans un procédé Bàm (Munir *et al.*, 2011). Cependant dans la même étude, des diminutions de la concentration des gènes de résistance *tetW* et *tetO* d'environ 6 log et 7 log respectivement ont été observées, montrant des comportements très différents selon les gènes étudiés, et reflétant probablement le comportement différent des bactéries qui les hébergent.

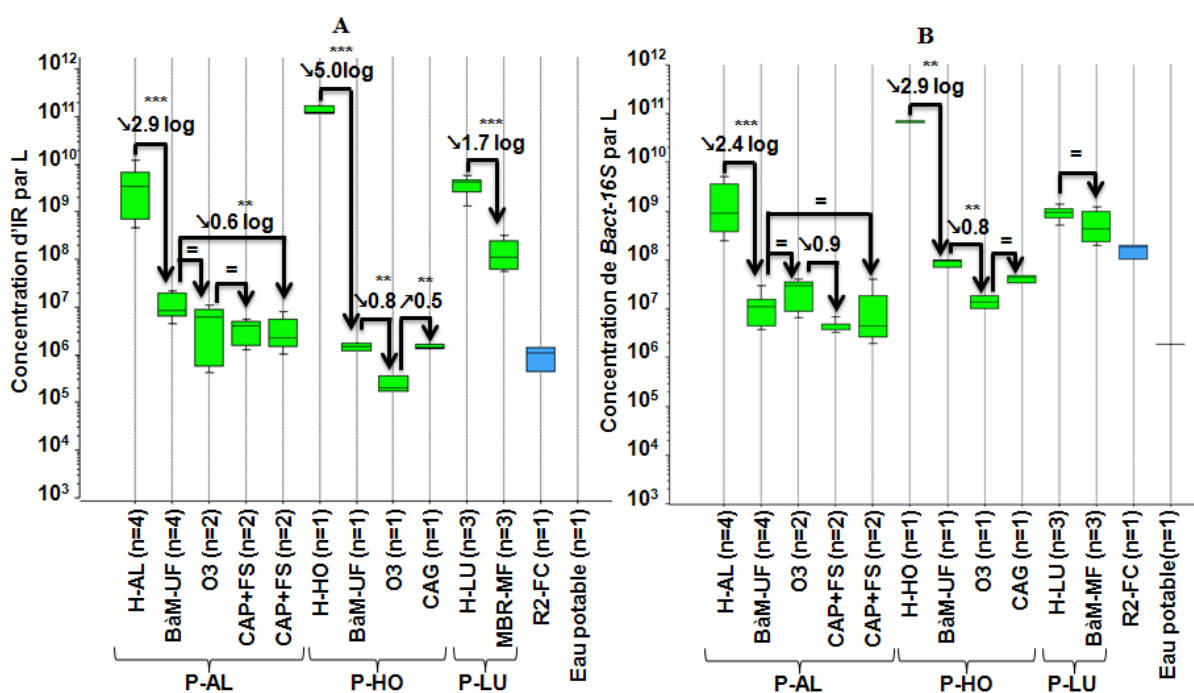


Figure 19 : Graphes en boîtes représentant la répartition des concentrations (A) d'IR et (B) de *Bact-16S* par litre d'eau au cours des procédés avancés testés pour traiter spécifiquement des effluents hospitaliers (■). Les résultats obtenus pour une rivière (R2-FC) et de l'eau potable du robinet sont indiqués (■). L'abattement moyen de la concentration pour chaque site est exprimé en log10 de la concentration. ***, p < 0,01 ; **, p < 0,05 ; =, n > 0,05. n, nombre de fois où l'échantillonnage a été réalisé (chaque échantillon a été prélevé en triplicat). Bàm-UF : fitrat du procédé Bàm par ultrafiltration ; Bàm-MF : fitrat du procédé Bàm par microfiltration, O₃ : ozonation, CAP+FS : charbon actif en poudre couplé à la filtration sur sable, CAG : charbon actif granulaire.

L'ultrafiltration des effluents hospitaliers (P-AL et P-HO) permet d'achever des rendements d'élimination des *Bact-16S* compris en moyenne entre 2,4 et 2,9 log, selon la charge initiale des effluents (figure 19B). Ces taux d'élimination sont proches de valeurs retrouvées dans la littérature. Munir *et al.* (2011) rapportent par des méthodes fondées sur le nombre de gènes codant pour l'ARNr 16S, et sur la culture des bactéries hétérotrophes aérobies (BHA) totales, des diminutions de leur concentration d'environ 3,5 log. Une autre étude réalisée sur

une usine de potabilisation d'eau de surface, utilisant le comptage des BHA totales et une méthode directe de comptage de bactéries par cytométrie en flux, rapporte des diminutions de la concentration bactérienne d'environ 3 log suite à l'ultrafiltration (Hammes *et al.*, 2008).

Finalement, les concentrations d'IR suite à l'ultrafiltration (P-AL et P-HO) sont proches, voire identiques aux concentrations retrouvées dans des milieux naturels sans influence anthropique majeure (figure 19A). De la même manière, les concentrations de *Bact-16S* dans le perméat de l'ultrafiltration (P-AL et P-HO) sont égales ou inférieures aux concentrations retrouvées dans ce même milieu naturel, et proches des valeurs de concentration bactérienne mesurée dans une eau potable, prélevée au robinet (figure 19B).

Suite au traitement des Bàm par ultrafiltration (P-AL et P-HO), la combinaison de différents procédés avancés utilisant l'ozonation, le charbon actif en poudre combiné avec la filtration sur sable, ou le charbon actif granulaire, réduisent au maximum les concentrations d'IR et de *Bact-16S* d'un facteur 0,9 log (Figure 19). Cette valeur, globalement faible, vient probablement du fait que les valeurs de concentration en amont de l'opération unitaire sont déjà très basses. En effet, les procédés par ozonation, couramment utilisés pour la production d'eau potable, permettent d'achever de bon rendement de la réduction de la concentration bactérienne (environ 3 log pour la potabilisation d'eaux de rivières, selon Hammes *et al.* (2008)). Dans nos mesures, des *Bact-16S* sont quantifiées après chaque étape du traitement, et leur élimination est inférieure à cette valeur.

Lorsque que l'on analyse la filière membranaire globale on constate que les rendements obtenus sont plus faibles que ceux théoriquement envisagés, et des *Bact-16S* ont été détectées après la membrane, suggérant plusieurs hypothèses :

- un passage de bactéries au travers de membranes défectueuses, mais celle-ci a étaient neuves,
- de l'ADN passant au travers la membrane, mais les méthodes de traitement des échantillons auraient dû pallier ce biais (filtration des échantillons à 0,45 µm)
- une présence de bactéries exogènes à l'effluent brut.

Il est reconnu que les membranes d'ultrafiltration sont une barrière physique efficace contre les bactéries (Pauwels *et al.*, 2006; Zanetti *et al.*, 2010; Marti *et al.*, 2011; Keskes *et al.*, 2012). Toutefois, le développement de biofilms bactériens, en aval de traitements avancés d'eau

potable, a déjà été notifié dans les réseaux d'eau. Ainsi, ces développements ont été suggérés comme favorisés après une étape d'ozonation qui, suite à la dégradation des composés organiques, augmente la concentration en carbone assimilable (Bancroft *et al.*, 1983; Zacheus *et al.*, 2000; Hammes *et al.*, 2008). De même, le charbon actif et la filtration sur sable, situés après une étape d'ozonation, ont été montrés comme favorisant la croissance de bactéries à la surface des particules (Bancroft *et al.*, 1983; Hammes *et al.*, 2008), en faisant également des sources potentielles de développement bactérien en aval de la filtration.

Ainsi, l'hypothèse la plus vraisemblable serait une contamination en aval du traitement, induisant une surestimation des bactéries en sortie de membrane et une sous-estimation de l'efficacité du traitement. Une conséquence de cette explication est que les populations bactériennes en aval de la membrane ne sont pas obligatoirement les mêmes que celle en aval. Cela sera développé ci-après dans les sections 1.2.2.2.3 et 1.2.2.2.4.

1.2.2.2 Influence sur l'abondance relative des IR.

Suite au procédé par microfiltration du pilote P-LU, l'abondance relative des IR est significativement réduite (figure 20C), indiquant que le procédé Bàm par microfiltration permettrait une élimination plus importante des bactéries hébergeant des IR. Il peut donc être envisagé que les bactéries provenant de l'effluent hospitalier et hébergeant des IR sont plus sensibles au procédé, et/ou moins adaptées à l'écosystème épurateur.

L'ultrafiltration des pilotes P-AL et P-HO réduit significativement l'abondance relative en IR. Cependant les taux de réduction sont variables d'un pilote à l'autre, et les abondances relatives dans le filtrat sont en moyenne comprises entre 0,02 et 0,84 (figure 20A et 20B). Les taux de réduction les plus faibles sont observés pour le pilote P-AL, alors que le pilote P-HO permet d'obtenir d'importants taux de réduction de l'abondance relative. Pour ce dernier pilote, les valeurs d'abondance relative sont équivalentes aux milieux naturels (0,02), montrant l'efficacité du système pour éliminer à la fois les bactéries et les bactéries hébergeant des IR.

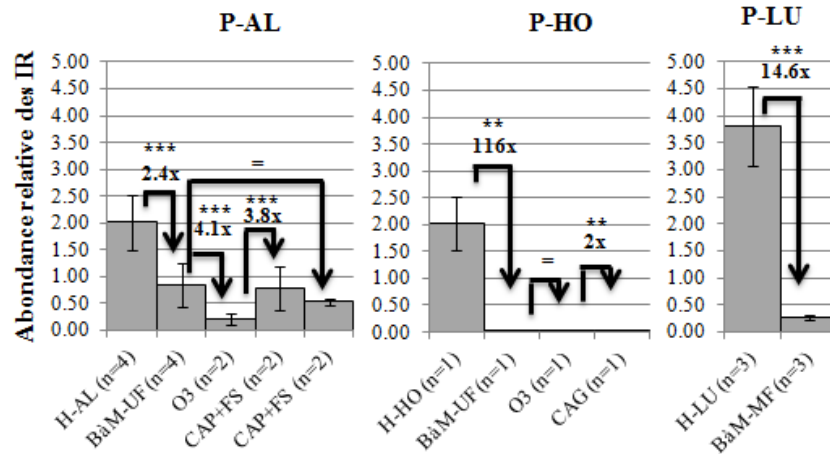


Figure 20 : Abondances relatives moyennes des IR au cours des différents procédés opérés par les pilotes. Le facteur de réduction moyen, correspondant au ratio de la valeur avant et après traitement, est indiqué pour chaque étape. ***, $p < 0,01$; **, $p < 0,05$; =, $n > 0,05$; n, nombre de fois où l'échantillonnage a été réalisé (chaque échantillon a été prélevé en triplicat). BâM-UF : filtrat du procédé BâM par ultrafiltration ; BâM-MF : filtrat du procédé BâM par microfiltration, O₃ : ozonation, CAP+FS: charbon actif en poudre couplé à la filtration sur sable, CAG : charbon actif granulaire.

L'ozonation n'a plus aucun effet significatif lorsque l'abondance relative après l'ultrafiltration est basse (cas du pilote P-HO). Cependant lorsque les valeurs résiduelles d'abondance relative d'IR sont élevées, comme pour le pilote P-AL, l'ozonation permet de réduire significativement l'abondance relative des IR de 0,8 à 0,2 (figure 20A). Néanmoins, la valeur moyenne résiduelle après ozonation reste élevée et est équivalente à une eau usée municipale (figure 15). Finalement, comme pour les concentrations de *Bact-16S* ou d'IR, les étapes de charbon actif en poudre couplées à la filtration sur sable, ou de charbon actif granulaire, ne diminuent pas significativement l'abondance relative des IR (figures 20A et 20B).

Conclusions intermédiaires

- La microfiltration n'élimine pas de manière efficace les *Bact-16S*, et les IR.
- L'ultrafiltration permet d'obtenir des concentrations de *Bact-16S* et d'IR équivalentes aux milieux naturels.
- Des bactéries seraient toujours quantifiables après chaque étape de traitement avancé mais cela viendrait d'un artefact expérimental.
- L'ultrafiltration peut permettre l'obtention de proportions d'IR dans les communautés bactériennes des effluents traités équivalentes à celles observées dans les milieux naturels.

1.2.2.2.3 Analyse de la présence de bactéries par microscopie confocale

La présence de *Bact-16S* et d'IR après chaque étape de traitement des pilotes utilisant l'ultrafiltration nécessite des investigations plus poussées (voir ci dessus). Après chaque traitement opéré par le pilote P-AL des échantillons de l'effluent hospitalier, du perméat du Bàm par ultrafiltration, du perméat du Bàm traité par ozonation, et du perméat du Bàm traité par le charbon actif en poudre couplé à la filtration sur sable, ont été filtrés. Afin de vérifier la présence de bactéries et leur viabilité, les filtres ont été observés par microscopie confocale associés à un marquage par des sondes fluorescentes permettant d'observer la viabilité bactérienne.

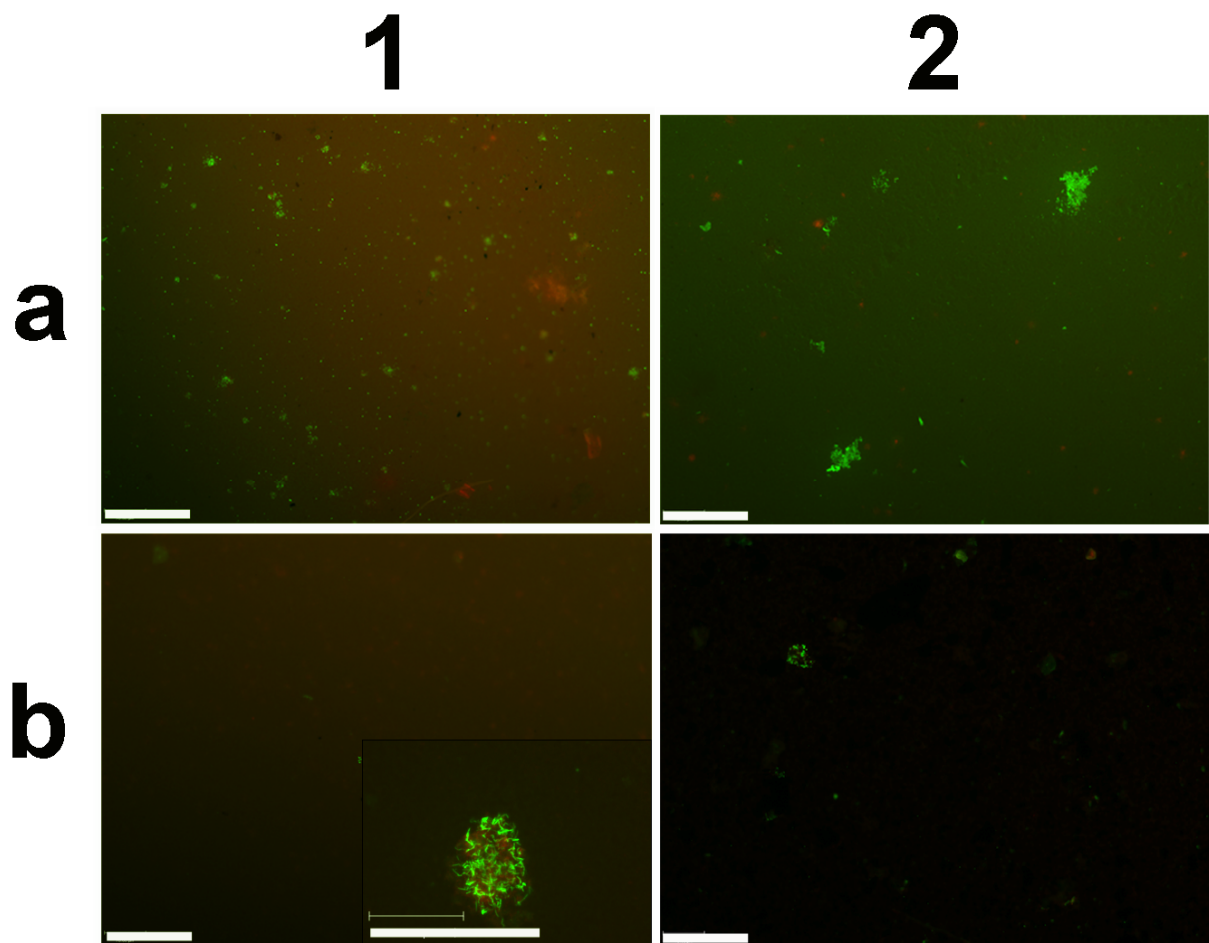


Figure 21 : Images confocales réalisées à partir d'un filtre de (1a) l'effluent hospitalier H-AL, (2a) du perméat du Bàm par ultrafiltration, (1b) du perméat traité par ozonation, et (2b) du perméat traité par le charbon actif en poudre couplé avec la filtration sur sable. Le trait blanc représente l'échelle de 140 µm. La viabilité bactérienne est caractérisée par un marquage fluorométrique à l'aide du SYTO[®]9 et de l'iodure de propidium. En vert apparaissent les bactéries viables, et en rouge, les bactéries non viables.

Les images obtenues montrent la présence de bactéries viables et non viables après chaque étape de traitement du pilote (figure 21), confirmant la présence de bactéries vivantes après chaque étape de traitement opéré par le pilote. Dans l'effluent hospitalier, de nombreuses bactéries vivantes ou mortes, seules ou agglomérées avec des particules allant jusqu'à environ 90µm sont observées (figure 21, 1a).

Après l'ultrafiltration, beaucoup moins de bactéries isolées sont présentes, néanmoins des amas plus ou moins gros (jusqu'à environ 90µm) de bactéries vivantes et mortes sont visualisés (figure 21, 2a). Après l'ozonation, très peu de bactéries isolées sont observées, et seulement quelques petits amas composés de bactéries vivantes sont visibles (figure 21, 2a). La présence d'amas de bactéries après l'ultrafiltration et l'ozonation montre que les communautés bactériennes sont principalement organisées sous forme de biofilms. Après le traitement au charbon actif en poudre couplé à la filtration sur sable, le filtre analysé est recouvert d'une pellicule noire, montrant la présence résiduelle de charbon actif. Comme pour l'ozonation, peu de bactéries isolées sont détectées (figure 21, 2b).

La présence de bactéries après chaque étape de traitement serait imputable à la présence de biofilms dans le réseau (Zacheus *et al.*, 2000; Hammes *et al.*, 2008). Ces biofilms auraient pour origine des contaminations bactériennes exogènes aux effluents hospitaliers. En effet, les réseaux d'eau ne sont pas maintenus stériles et de nombreuses sources d'introduction de bactéries peuvent y avoir lieu. Par exemple, des prises d'air extérieur pour maintenir la pression interne des réservoirs de stockage d'eau suite à la variation de volume pourraient en être la cause.

1.2.2.2.4 Analyse de la diversité bactérienne par PCR-DGGE

Afin de vérifier si la présence de bactéries observées avant et après chaque étape de traitement opérés par les Bàm, est due à des développements *ex situ* aux effluents hospitaliers, l'analyse de la diversité bactérienne a été effectuée par PCR-DGGE d'une portion du gène codant l'ARNr 16S (figure 22). Pour la microfiltration du pilote P-LU, la similarité entre les communautés bactériennes du perméat et des boues est importante (65,3 % de similarité), comparativement à la similarité des communautés bactériennes du perméat et de l'effluent hospitalier (17,8 % de similarité). Ces résultats confirment l'hypothèse que, même si le Bàm par microfiltration laisse passer des bactéries à travers la membrane, les bactéries de l'effluent

hospitalier sont mieux éliminées, et les bactéries quantifiées après la membrane sont majoritairement des bactéries des boues.

L'indice de similarité entre les communautés bactériennes avant et après l'ultrafiltration et l'ozonation du pilote P-HO, est de 0 %, illustrant l'efficacité de la barrière physique de l'ultrafiltration empêchant le passage de bactéries provenant de l'effluent hospitalier, et confirmant que les concentrations bactériennes détectées après l'ultrafiltration seraient dues à des contaminations exogènes à l'effluent hospitalier.

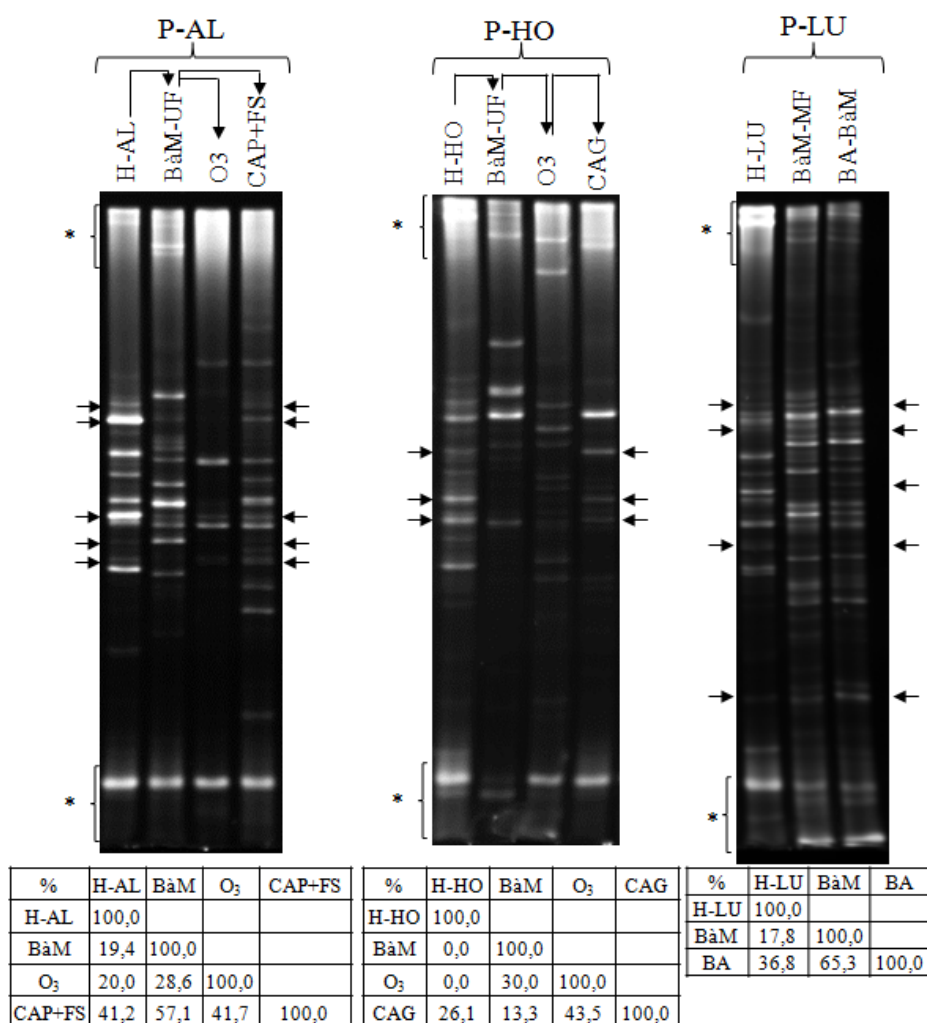


Figure 22 : Analyse par PCR-DGGE de la diversité bactérienne (basée sur l'amplification d'une portion du gène codant l'ARNr 16S) au cours des différents traitements des effluents hospitalier opérés par les pilotes. La similarité des profils basés sur la présence ou l'absence de bande, et calculée par l'indice de Bray-Curtis, est présentée dans les tableaux; BàM-UF : filtrat du procédé BàM par ultrafiltration ; BàM-MF : filtrat du procédé BàM par microfiltration ; BA : boue d'aération. Les flèches représentent les bandes communes aux effluents hospitaliers et dans la suite du traitement. * zone non incluse dans l'analyse. O₃ : ozonation, CAP : charbon actif en poudre, FS : filtration sur sable, CAG : charbon actif granulaire.

Cependant pour le B_àM par ultrafiltration du pilote P-AL, bien que la similarité des communautés bactériennes obtenues après l'ultrafiltration soit faible (17,8 %), certaines bandes communes sont détectées avant et après l'ultrafiltration, suggérant la présence de bactéries appartenant à des mêmes taxons avant et après la filtration. De plus, l'abondance relative des IR des communautés bactériennes après l'ultrafiltration est élevée (0,84), soit des valeurs du même ordre de grandeur qu'un effluent hospitalier (figure 15), suggérant que la contamination en aval est liée aux mêmes bactéries que celles contenues dans l'effluent hospitalier (figure 22A). Toutefois l'ozonation diminue la diversité bactérienne (en terme de nombre de bandes détectées).

Le traitement du perméat membranaire au charbon actif en poudre combiné à la filtration sur sable, augmente la diversité bactérienne. Paradoxalement, le traitement par du charbon actif granulaire, réduit la diversité bactérienne. Comme énoncé précédemment, le charbon actif favorise la croissance de bactéries à la surface des particules, et ce d'autant plus lorsqu'un traitement par ozonation est réalisé avant, justifiant l'augmentation de la diversité bactérienne après cette étape. Cependant, théoriquement, ces bactéries sont fixées sur une phase solide et ne devraient pas se retrouver dans l'effluent traité, comme observé pour le charbon actif granulaire. La présence résiduelle de charbon actif en poudre dans l'effluent traité par la filtration sur sable (étape ayant pour objectif d'éliminer les particules de charbon actif) étant observée (Figure 23), ceci pourrait expliquer l'augmentation de la diversité bactérienne après cette étape.



Figure 23 : photo d'un filtre obtenu après filtration de l'effluent traité au charbon actif en poudre combiné à la filtration sur sable.

Par ailleurs, certains taxons identiques à l'effluent hospitalier sont détectés après le traitement au charbon actif granulaire. Cependant l'abondance relative dans l'effluent traité est très basse (0,02), et équivalente aux milieux naturels, suggérant que ces bactéries sont exogènes à l'effluent hospitalier.

Conclusions intermédiaires

➔ *La différence entre les taux d'élimination des Bact-16S escomptés et ceux mesurés peut provenir d'un artefact expérimental lié à la conception même du pilote et des sites de prélèvement. Il est donc important de recommander une vigilance particulière lors de la conception de ce genre d'installation.*

1.3 Conclusions

L'étude globale d'un panel de résidus biologiques d'origines anthropiques diverses a montré la faisabilité de la mesure globale de l'antibiorésistance en utilisant les IR comme biomarqueurs. Ainsi, il est mis en évidence que les effluents d'origines médicale, municipale, ou de la filière carnée bovine participent à l'introduction d'IR dans l'environnement. Les procédés actuels de traitement des effluents, et opérés par des STEP à boue activée, réduisent à la fois les concentrations de bactéries et d'IR. Cependant ces procédés ne limitent pas suffisamment les concentrations bactériennes, et des quantités non négligeables d'IR peuvent atteindre quotidiennement l'environnement. De plus, ce type de procédé ne réduit pas de manière efficace la proportion d'IR dans les communautés bactériennes, suggérant une introduction de bactéries hébergeant des IR d'origine anthropique dans l'environnement.

Dans un second temps, cette étude a mis en évidence des proportions d'IR plus élevées dans quasiment tous les effluents hospitaliers européens testés, soulignant la sélection et le rôle important des IR dans ces milieux. Par conséquent une vigilance plus accrue dans la gestion de ces effluents doit être menée, et leur implication dans la dissémination de la résistance aux antibiotiques doit être explorée.

La gestion séparée du traitement des effluents hospitaliers par des procédés avancés par Bàm permet de diminuer à la fois la concentration et l'abondance relative des IR. De plus les procédés d'ultrafiltration permettent d'atteindre des concentrations d'IR et de bactéries proches des milieux naturels. Suite à un traitement membranaire efficace, les traitements avancés du perméat membranaire par ozonation, charbon actif en poudre, ou charbon actif granulaire n'ajoutent pas de meilleures performances d'élimination à la fois de bactéries et des IR. Toutefois, l'ozonation est un procédé pouvant se révéler efficace lorsque les étapes en amont le sont moins. Finalement le charbon actif granulaire garantit une meilleure rétention des bactéries que le charbon actif en poudre.

2 EVALUATION DYNAMIQUE DE LA MORPHOLOGIE DES FLOCS, DE LA DIVERSITE BACTERIENNE, ET DES IR DE CLASSE 1 DANS UN REACTEUR A BOUES ACTIVEES TRAITANT LES EFFLUENTS D'UN HOPITAL.

Les effluents issus d'activités de soins constituent pour les systèmes de traitement collectifs une source d'introduction ponctuelle de composés chimiques spécifiquement utilisés dans les hôpitaux, et présentant des risques écotoxiques pour l'environnement (Escher *et al.*, 2011). D'un point de vue microbiologique, la première partie de ce travail a montré qu'il semblerait que ces effluents représentent également une source ponctuelle importante de bactéries hébergeant des IR. Comme alternative à la pollution engendrée par ces effluents, leur traitement spécifique est de plus en plus envisagé. Ainsi, l'utilisation des IR comme biomarqueur de l'antibiorésistance pour évaluer l'efficacité de procédés de traitement des effluents hospitaliers, a laissé paraître un effet du traitement de ces effluents sur la proportion des IR dans les communautés bactériennes des boues d'épuration.

L'objectif de ce chapitre est ainsi de mieux comprendre et évaluer l'influence que peut avoir le traitement d'un effluent hospitalier sur la biomasse épuratrice d'un système à boue activée. Afin d'appréhender cet impact, une étude multi-paramètres a été conduite en faisant appel à des outils permettant une caractérisation des boues d'épuration au niveau physicochimique, microscopique, et moléculaire.

Les résultats de ce travail, présentés sous la forme d'un article soumis pour publication, montrent que le traitement d'un effluent hospitalier semble présenter une toxicité pour les bactéries, comme constaté par l'observation de l'érosion des floccs des boues d'épuration. Cependant les analyses de diversité bactérienne par PCR-DGGE et pyroséquencage montrent que cette toxicité n'aboutit pas à la destruction de la communauté bactérienne des boues, mais à leur adaptation, permettant ainsi de maintenir les performances épuratoires du système. Cette hypothèse est appuyée par les observations réalisées par microscopie confocale, et qui a révélé une plus grande proportion de matrice exopolymérique dans les floccs traitant un effluent hospitalier, comparativement aux floccs traitant un effluent urbain. L'analyse de la diversité bactérienne par pyroséquencage a montré à la fin de l'expérience un accroissement de la proportion de bactéries formant des floccs et connues pour produire des substances

Résultats et discussion

exopolymériques. Parmi ces bactéries, une introduction ou un développement *in situ* d'espèces affiliées au genre *Pseudomonas* a lieu dans les boues traitant l'effluent hospitalier. Concernant les IR de classe 1, cette étude confirme l'observation précédemment faite et montre une augmentation de la proportion d'IR de classe 1 au sein de la communauté bactérienne des floes traitant spécifiquement l'effluent hospitalier. Ainsi il peut être envisagé que cette augmentation serait en partie influencée par les *Pseudomonas* spp., genre bactérien connu pour présenter d'importantes prévalences de souches portant des IR de classe 1. Cette adaptation des boues épuratrices, et observée suite au traitement d'un effluent hospitalier, augmente le risque de dissémination de l'antibiorésistance dans ces communautés bactériennes.

References

- (1) Kümmerer, K. Drugs in the environment: emission of drugs, diagnostic aids and disinfectants into wastewater by hospitals in relation to other sources--a review. *Chemosphere* **2001**, *45*, 957–969.
- 440 (2) Pauwels, B.; Verstraete, W. The treatment of hospital wastewater: an appraisal. *J. Water Health* **2006**, *4*, 405–416.
- (3) Kümmerer, K. Drugs, diagnostic agents and disinfectants in wastewater and water--a review. *Schriftenr Ver Wasser Boden Lufthyg* **2000**, *105*, 59–71.
- 445 (4) Escher, B. I.; Baumgartner, R.; Koller, M.; Treyer, K.; Lienert, J.; McArdell, C. S. Environmental toxicology and risk assessment of pharmaceuticals from hospital wastewater. *Water Res.* **2011**, *45*, 75–92.
- (5) Schwartz, T.; Kohnen, W.; Jansen, B.; Obst, U. Detection of antibiotic-resistant bacteria and their resistance genes in wastewater, surface water, and drinking water biofilms. *FEMS Microbiol. Ecol.* **2003**, *43*, 325–335.
- 450 (6) Oberlé, K.; Capdeville, M.-J.; Berthe, T.; Budzinski, H.; Petit, F. Evidence for a complex relationship between antibiotics and antibiotic-resistant *Escherichia coli*: from medical center patients to a receiving environment. *Environ. Sci. Technol.* **2012**, *46*, 1859–1868.
- 455 (7) Guo, X.; Xia, R.; Han, N.; Xu, H. Genetic diversity analyses of class 1 integrons and their associated antimicrobial resistance genes in *Enterobacteriaceae* strains recovered from aquatic habitats in China. *Lett. App. Microbiol.* **2011**, *52*, 667–675.
- (8) Chitnis, V.; Chitnis, S.; Vaidya, K.; Ravikant, S.; Patil, S.; Chitnis, D. S. Bacterial population changes in hospital effluent treatment plant in central India. *Water Res.* **2004**, *38*, 441–447.
- 460 (9) Louvet, J.-N.; Heluin, Y.; Attik, G.; Dumas, D.; Potier, O.; Pons, M.-N. Assessment of erythromycin toxicity on activated sludge via batch experiments and microscopic techniques (epifluorescence and CLSM). *Process Biochem.* **2010**, *45*, 1787–1794.

- 465 (10) Shi, Y.-J.; Wang, X.-H.; Qi, Z.; Diao, M.-H.; Gao, M.-M.; Xing, S.-F.; Wang, S.-G.; Zhao, X.-C. Sorption and biodegradation of tetracycline by nitrifying granules and the toxicity of tetracycline on granules. *J. Hazard. Mater.* **2011**, *191*, 103–109.
- (11) Kraigher, B.; Kosjek, T.; Heath, E.; Kompare, B.; Mandic-Mulec, I. Influence of pharmaceutical residues on the structure of activated sludge bacterial communities in wastewater treatment bioreactors. *Water Res.* **2008**, *42*, 4578–4588.
- 470 (12) Louvet, J.-N.; Attik, G.; Dumas, D.; Potier, O.; Pons, M.-N. Simultaneous Gram and viability staining on activated sludge exposed to erythromycin: 3D CLSM time-lapse imaging of bacterial disintegration. *Int. J. Hyg. Environ. Health* **2011**, *214*, 470–477.
- (13) Laurent, J.; Jaziri, K.; Guignard, R.; Casellas, M.; Dagot, C. Comprehensive insight of the performances of excess sludge reduction by 90 °C thermal treatment coupled with activated sludge at pilot scale: COD and N removal, bacterial populations, fate of heavy metals. *Process Biochem.* **2011**, *46*, 1808–1816.
- 475 (14) Stokes, H.; Hall, R. A novel family of potentially mobile DNA elements encoding site-specific gene-integration functions: integrons. *Mol. Microbiol.* **1989**, *3*, 1669–1683.
- (15) Stalder, T.; Barraud, O.; Casellas, M.; Dagot, C.; Ploy, M.-C. Integron involvement in environmental spread of antibiotic resistance. *Front. Microbiol.* **2012**, *3*, 119.
- 480 (16) Lupo, A.; Coyne, S.; Berendonk, T. U. Origin and evolution of antibiotic resistance: the common mechanisms of emergence and spread in water bodies. *Front. Microbiol.* **2012**, *3*, 18.
- 485 (17) Ma, Y.; Wilson, C. A.; Novak, J. T.; Riffat, R.; Aynur, S.; Murthy, S.; Pruden, A. Effect of various sludge digestion conditions on sulfonamide, macrolide, and tetracycline resistance genes and class I integrons. *Environ. Sci. Technol.* **2011**, *45*, 7855–7861.
- (18) Rizzo, L.; Manaia, C.; Merlin, C.; Schwartz, T.; Dagot, C.; Ploy, M. C.; Michael, I.; Fatta-Kassinos, D. Urban wastewater treatment plants as hotspots for antibiotic resistant bacteria and genes spread into the environment: A review. *Sci. Total Environ.* **2013**, *447C*, 345–360.

- 490 (19) Da Motta, M.; Pons, M.-N.; Roche, N. Monitoring filamentous bulking in activated
 sludge systems fed by synthetic or municipal wastewater. *Bioprocess Biosyst. Eng.*
2003, *25*, 387–393.
- (20) Lopez, C.; Pons, M. N.; Morgenroth, E. Evaluation of microscopic techniques
 (epifluorescence microscopy, CLSM, TPE-LSM) as a basis for the quantitative image
 495 analysis of activated sludge. *Water Res.* **2005**, *39*, 456–468.
- (21) Muyzer, G.; De Waal, E. C.; Uitterlinden, A. G. Profiling of complex microbial
 populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain
 reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. *Appl. Environ. Microbiol.* **1993**, *59*,
 695–700.
- 500 (22) Barraud, O.; Baclet, M.-C.; Denis, F.; Ploy, M.-C. Quantitative multiplex real-time PCR
 for detecting class 1, 2 and 3 integrons. *J. Antimicrob. Chemother.* **2010**, *65*, 1642–
 1645.
- (23) Park, J.-W.; Crowley, D. E. Dynamic changes in *nahAc* gene copy numbers during
 degradation of naphthalene in PAH-contaminated soils. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*
 505 **2006**, *72*, 1322–1329.
- (24) Klappenbach, J. A.; Saxman, P. R.; Cole, J. R.; Schmidt, T. M. rrndb: the Ribosomal
 RNA Operon Copy Number Database. *Nucleic Acids Res.* **2001**, *29*, 181 –184.
- (25) Martins, A. M. P.; Pagilla, K.; Heijnen, J. J.; Van Loosdrecht, M. C. M. Filamentous
 bulking sludge--a critical review. *Water Res.* **2004**, *38*, 793–817.
- 510 (26) Björnsson, L.; Hugenholtz, P.; Tyson, G. W.; Blackall, L. L. Filamentous *Chloroflexi*
 (green non-sulfur bacteria) are abundant in wastewater treatment processes with
 biological nutrient removal. *Microbiology* **2002**, *148*, 2309–2318.
- (27) Kragelund, C.; Levantesi, C.; Borger, A.; Thelen, K.; Eikelboom, D.; Tandoi, V.; Kong,
 Y.; Van der Waarde, J.; Krooneman, J.; Rossetti, S.; Thomsen, T. R.; Nielsen, P. H.
 515 Identity, abundance and ecophysiology of filamentous *Chloroflexi* species present in
 activated sludge treatment plants. *FEMS Microbiol. Ecol.* **2007**, *59*, 671–682.

- (28) Liwarska-Bizukojs, E.; Bizukojs, M. Effect of selected anionic surfactants on activated sludge flocs. *Enzyme Microb. Technol.* **2006**, *39*, 660–668.
- (29) Liwarska-Bizukojs, E.; Bizukojs, M. The influence of the selected nonionic surfactants on the activated sludge morphology and kinetics of the organic matter removal in the flow system. *Enzyme Microb. Technol.* **2007**, *41*, 26–34.
- (30) Louvet, J. N.; Giammarino, C.; Potier, O.; Pons, M. N. Adverse effects of erythromycin on the structure and chemistry of activated sludge. *Environ. Pollut.* **2010**, *158*, 688–693.
- (31) Avella, A. C.; Delgado, L. F.; Görner, T.; Albasi, C.; Galmiche, M.; De Donato, P. Effect of cytostatic drug presence on extracellular polymeric substances formation in municipal wastewater treated by membrane bioreactor. *Bioresour. Technol.* **2010**, *101*, 518–526.
- (32) Aquino, S. F.; Stuckey, D. C. Soluble microbial products formation in anaerobic chemostats in the presence of toxic compounds. *Water Res.* **2004**, *38*, 255–266.
- (33) Henriques, I. D. S.; Love, N. G. The role of extracellular polymeric substances in the toxicity response of activated sludge bacteria to chemical toxins. *Water Res.* **2007**, *41*, 4177–4185.
- (34) Gotoh, H.; Kasaraneni, N.; Devineni, N.; Dallo, S. F.; Weitao, T. SOS involvement in stress-inducible biofilm formation. *Biofouling* **2010**, *26*, 603–611.
- (35) Bruchmann, J.; Kirchen, S.; Schwartz, T. Sub-inhibitory concentrations of antibiotics and wastewater influencing biofilm formation and gene expression of multi-resistant *Pseudomonas aeruginosa* wastewater isolates. *Environ Sci Pollut Res Int* **2013**.
- (36) Deng, Y.; Zhang, Y.; Gao, Y.; Li, D.; Liu, R.; Liu, M.; Zhang, H.; Hu, B.; Yu, T.; Yang, M. Microbial Community Compositional Analysis for Series Reactors Treating High Level Antibiotic Wastewater. *Environ. Sci. Technol.* **2011**.
- (37) Saikaly, P. E.; Oerther, D. B. Diversity of dominant bacterial taxa in activated sludge promotes functional resistance following toxic shock loading. *Microb. Ecol.* **2011**, *61*, 557–567.

- 545 (38) LaPara, T. M.; Nakatsu, C. H.; Pantea, L. M.; Alleman, J. E. Stability of the bacterial communities supported by a seven-stage biological process treating pharmaceutical wastewater as revealed by PCR-DGGE. *Water Res.* **2002**, *36*, 638–646.
- (39) Tsai, C. T.; Lai, J. S.; Lin, S. T. Quantification of pathogenic micro-organisms in the sludge from treated hospital wastewater. *J. Appl. Microbiol.* **1998**, *85*, 171–176.
- 550 (40) Peymani, A.; Farajnia, S.; Nahaei, M. R.; Sohrabi, N.; Abbasi, L.; Ansarin, K.; Azhari, F. Prevalence of class 1 integron among multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* in Tabriz, northwest of Iran. *Pol. J. Microbiol.* **2012**, *61*, 57–60.
- (41) Mathee, K.; Narasimhan, G.; Valdes, C.; Qiu, X.; Matewish, J. M.; Koehrsen, M.; Rokas, A.; Yandava, C. N.; Engels, R.; Zeng, E.; Olavarietta, R.; Doud, M.; Smith, R. S.; Montgomery, P.; White, J. R.; Godfrey, P. A.; Kodira, C.; Birren, B.; Galagan, J. E.; 555 Lory, S. Dynamics of *Pseudomonas aeruginosa* genome evolution. *PNAS* **2008**, *105*, 3100–3105.
- (42) Bitton, G. *Wastewater microbiology*; 3rd ed.; Wiley-Liss John Wiley & Sons: Hoboken N.J., 2005.
- (43) Boles, B. R.; Thoendel, M.; Singh, P. K. Self-Generated Diversity Produces “insurance Effects” in Biofilm Communities. *PNAS* **2004**, *101*, 16630–16635. 560
- (44) Tsutsui, H.; Anami, Y.; Matsuda, M.; Inoue, D.; Sei, K.; Soda, S.; Ike, M. Transfer of plasmid pJP4 from *Escherichia coli* and *Pseudomonas putida* to bacteria in activated sludge developed under different sludge retention times. *J. Biosci. Bioeng.* **2010**, *110*, 684–689.
- 565 (45) Soda, S.; Otsuki, H.; Inoue, D.; Tsutsui, H.; Sei, K.; Ike, M. Transfer of antibiotic multiresistant plasmid RP4 from *Escherichia coli* to activated sludge bacteria. *J. Biosci. Bioeng.* **2008**, *106*, 292–296.

3 IMPACT QUANTITATIF ET QUALITATIF DES EFFLUENTS D'UN HOPITAL SUR LA DISSEMINATION DES INTEGRONS DE RESISTANCE.

Au cours des différents travaux menés et présentés dans ce manuscrit, nous avons pu observer que globalement les effluents anthropiques étudiés contribueraient à la dissémination de l'antibiorésistance dans les STEP. Toutefois les effluents hospitaliers présentent un taux spécifiquement plus élevé d'IR dans les communautés bactériennes issues de ces structures, suggérant que le risque de dissémination de souches résistantes serait plus accru. Il est donc primordial d'investiguer l'influence réelle des effluents hospitaliers sur la dissémination d'IR au sein d'une STEP urbaine collectant ce type d'effluent, et d'évaluer l'efficacité de ces dernières pour éliminer ces IR. Le travail présenté dans cette partie s'inscrit dans cette thématique. Pour cela, la dynamique de la contribution d'un effluent hospitalier, d'un point de vue quantitatif et qualitatif, c'est-à-dire respectivement en termes de flux des IR et de dissémination des cassettes de gène de résistance aux antibiotiques, a été étudiée.

Ce travail, présenté sous la forme d'un article soumis pour publication est basé sur une analyse réalisée au niveau métagénomique et associant des données de flux d'eaux usées, afin de donner une vision générale et réelle des transferts d'IR de classe 1, 2 et 3 de la source jusqu'au rejet dans l'environnement. De la même manière, l'investigation des cassettes de gène hébergées par les IR de classe 1 par une approche métagénomique a pour objectif de donner une vision globale et essayant d'être la plus exhaustive, afin de caractériser la diversité génétique associée à ces IR transitant au travers des réseaux d'eaux usées.

Cette étude montre au niveau local, une influence des effluents hospitaliers sur l'introduction des IR au niveau des STEP. En effet bien que dilué dans le réseau urbain, au moins 14% des IR arrivant dans la STEP auraient une origine hospitalière. De plus les cassettes caractérisées dans l'effluent hospitalier contiennent des gènes spécifiques de l'activité hospitalière. Cependant, cette étude montre aussi que le restant des effluents arrivant à la STEP, et ayant principalement une origine urbaine, participent quantitativement au plus grand apport d'IR au niveau des STEP et aussi à l'introduction d'une plus grande diversité génétique, comprenant certaines cassettes de gènes de résistance d'intérêt clinique. Finalement la STEP urbaine réduit la concentration d'IR mais n'empêche pas des IR d'origine anthropique de

Résultats et discussion

rejoindre l'environnement. De plus les résultats de cette étude appuient l'hypothèse que des échanges génétiques auraient lieu entre des bactéries d'origines anthropique et environnementale, soulevant la nécessité de mieux contrôler les flux microbiologiques anthropiques introduits dans l'environnement.

Reference

- Amann RI, Ludwig W, Schleifer KH. (1995). Phylogenetic identification and *in situ* detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiol. Rev.* 59:143–169.
- 480 Arakawa Y, Murakami M, Suzuki K, Ito H, Wacharotayankun R, Ohsuka S, *et al.* (1995). A novel integron-like element carrying the metallo-beta-lactamase gene *blaIMP*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 39:1612–1615.
- Baquero F, Martínez J-L, Cantón R. (2008). Antibiotics and antibiotic resistance in water environments. *Curr. Opin. Biotechnol.* 19:260–265.
- 485 Barraud O, Baclet M-C, Denis F, Ploy M-C. (2010). Quantitative multiplex real-time PCR for detecting class 1, 2 and 3 integrons. *J. Antimicrob. Chemother.* 65:1642–1645.
- Binh CTT, Heuer H, Kaupenjohann M, Smalla K. (2009). Diverse *aadA* gene cassettes on class 1 integrons introduced into soil *via* spread manure. *Res. Microbiol.* 160:427–433.
- Boucher Y, Labbate M, Koenig JE, Stokes HW. (2007). Integrons: mobilizable platforms that promote genetic diversity in bacteria. *Trends Microbiol.* 15:301–309.
- 490 Cambray G, Guerout A-M, Mazel D. (2010). Integrons. *Annu. Rev. Genet.* 44:141–166.
- Collis CM, Hall RM. (2004). Comparison of the structure-activity relationships of the integron-associated recombination sites *attI3* and *attI1* reveals common features. *Microbiology* 150:1591–1601.
- 495 Correia M, Boavida F, Grosso F, Salgado MJ, Lito LM, Cristino JM, *et al.* (2003). Molecular characterization of a new class 3 integron in *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 47:2838–2843.
- Diehl DL, Lapara TM. (2010). Effect of temperature on the fate of genes encoding tetracycline resistance and the integrase of class 1 integrons within anaerobic and aerobic digesters treating municipal wastewater solids. *Environ. Sci. Technol.* 44:9128–9133.
- 500 Ferreira da Silva M, Vaz-Moreira I, Gonzalez-Pajuelo M, Nunes OC, Manaia CM. (2007). Antimicrobial resistance patterns in *Enterobacteriaceae* isolated from an urban wastewater treatment plant. *FEMS Microbiol. Ecol.* 60:166–176.
- 505 Figueira V, Serra E, Manaia CM. (2011). Differential patterns of antimicrobial resistance in population subsets of *Escherichia coli* isolated from waste- and surface waters. *Sci. Total Environ.* 409:1017–1023.
- Forsberg KJ, Reyes A, Wang B, Selleck EM, Sommer MOA, Dantas G. (2012). The shared antibiotic resistome of soil bacteria and human pathogens. *Science* 337:1107–1111.
- 510 Gaze WH, Zhang L, Abdousslam NA, Hawkey PM, Calvo-Bado L, Royle J, *et al.* (2011). Impacts of anthropogenic activity on the ecology of class 1 integrons and integron-associated genes in the environment. *ISME J.* 5:1253–1261.

- Gillings M R, Xuejun D, Hardwick SA, Holley MP, Stokes HW. (2008). Gene cassettes encoding resistance to quaternary ammonium compounds: a role in the origin of clinical class 1 integrons? *ISME J.* 3:209–215.
- 515 Glupczynski Y, Bogaerts P, Deplano A, Berhin C, Huang T-D, Van Eldere J, *et al.* (2010). Detection and characterization of class A extended-spectrum-beta-lactamase-producing *Pseudomonas aeruginosa* isolates in Belgian hospitals. *J. Antimicrob. Chemother.* 65:866–871.
- 520 Guo X, Xia R, Han N, Xu H. (2011). Genetic diversity analyses of class 1 integrons and their associated antimicrobial resistance genes in *Enterobacteriaceae* strains recovered from aquatic habitats in China. *Lett. App. Microbiol.* 52:667–675. (Consulté novembre 6, 2011).
- Hardwick SA, Stokes HW, Findlay S, Taylor M, Gillings Michael R. (2008). Quantification of class 1 integron abundance in natural environments using real-time quantitative PCR. *FEMS Microbiol. Lett.* 278:207–212.
- 525 Klappenbach JA, Saxman PR, Cole JR, Schmidt TM. (2001). rrndb: the ribosomal RNA operon copy number database. *Nucleic Acids Res.* 29:181–184.
- Koenig JE, Boucher Yan, Charlebois RL, Nesbø C, Zhaxybayeva O, Baptiste E, *et al.* (2008). Integron-associated gene cassettes in Halifax Harbour: assessment of a mobile gene pool in marine sediments. *Environ. Microbiol.* 10:1024–1038.
- 530 Koenig JE, Bourne DG, Curtis B, Dlutek M, Stokes HW, Doolittle WF, *et al.* (2011). Coral-mucus-associated *Vibrio* integrons in the Great Barrier Reef: genomic hotspots for environmental adaptation. *ISME J.* 5:962–972.
- 535 Koenig JE, Sharp C, Dlutek M, Curtis B, Joss M, Boucher Y, *et al.* (2009). Integron gene cassettes and degradation of compounds associated with industrial waste: the case of the Sydney tar ponds. *PLoS ONE* 4:e5276.
- Kümmerer K. (2001). Drugs in the environment: emission of drugs, diagnostic aids and disinfectants into wastewater by hospitals in relation to other sources--a review. *Chemosphere* 45:957–969.
- 540 Labbate M, Case RJ, Stokes HW. (2009). The integron/gene cassette system: an active player in bacterial adaptation. *Methods Mol. Biol.* 532:103–125.
- Lapara TM, Burch TR, McNamara PJ, Tan DT, Yan M, Eichmiller JJ. (2011). Tertiary-treated municipal wastewater is a significant point source of antibiotic resistance genes into Duluth-Superior harbor. *Environ. Sci. Technol.* 45:9543–9549.
- 545 Laroche E, Pawlak B, Berthe T, Skurnik D, Petit F. (2009). Occurrence of antibiotic resistance and class 1, 2 and 3 integrons in *Escherichia coli* isolated from a densely populated estuary (Seine, France). *FEMS Microbiol. Ecol.* 68:118–130.
- Lévesque C, Piché L, Larose C, Roy PH. (1995). PCR mapping of integrons reveals several novel combinations of resistance genes. *Antimicrob. Agents Chemother.* 39:185–191.

- 550 Łuczkiwicz A, Jankowska K, Fudala-Książek S, Olańczuk-Neyman K. (2010). Antimicrobial resistance of fecal indicators in municipal wastewater treatment plant. *Water Res.* 44:5089–5097.
- Martínez JL. (2009). Environmental pollution by antibiotics and by antibiotic resistance determinants. *Environ. Pollut.* 157:2893–2902.
- Mazel D. (2006). Integrons: agents of bacterial evolution. *Nat. Rev. Microbiol.* 4:608–620.
- 555 Mokracka J, Koczura R, Kaznowski A. (2012). Multiresistant *Enterobacteriaceae* with class 1 and class 2 integrons in a municipal wastewater treatment plant. *Water Res.* 46:3353–3363.
- 560 Moura A, Henriques I, Smalla K, Correia A. (2010). Wastewater bacterial communities bring together broad-host range plasmids, integrons and a wide diversity of uncharacterized gene cassettes. *Res. Microbiol.* 161:58–66.
- Moura A, Jové T, Ploy M-C, Henriques I, Correia A. (2012). Diversity of gene cassette promoters in class 1 integrons from wastewater environments. *Appl. Environ. Microbiol.* 78:5413–5416.
- 565 Moura A, Pereira C, Henriques I, Correia A. (2011). Novel gene cassettes and integrons in antibiotic-resistant bacteria isolated from urban wastewaters. *Res. Microbiol.* 163:92–100.
- Novo A, Manaia C. (2010). Factors influencing antibiotic resistance burden in municipal wastewater treatment plants. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 87:1157–1166.
- 570 Park J-W, Crowley DE. (2006). Dynamic changes in *nahAc* gene copy numbers during degradation of naphthalene in PAH-contaminated soils. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 72:1322–1329.
- Partridge SR, Tsafnat G, Coiera E, Iredell JR. (2009). Gene cassettes and cassette arrays in mobile resistance integrons. *FEMS Microbiol. Rev.* 33:757–784.
- 575 Paulsen IT, Littlejohn TG, Rådström P, Sundström L, Sköld O, Swedberg G, *et al.* (1993). The 3' conserved segment of integrons contains a gene associated with multidrug resistance to antiseptics and disinfectants. *Antimicrob. Agents Chemother.* 37:761–768.
- 580 Pellegrini C, Celenza G, Segatore B, Bellio P, Setacci D, Amicosante G, *et al.* (2011). Occurrence of class 1 and 2 integrons in resistant *Enterobacteriaceae* collected from a urban wastewater treatment plant: first report from central Italy. *Microb. Drug Resist.* 17:229–234.
- Poirel L, Brinas L, Verlinde A, Ide L, Nordmann P. (2005). BEL-1, a novel clavulanic acid-inhibited extended-spectrum β -lactamase, and the class 1 integron *In120* in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 49:3743–3748.
- 585 Poirel L, Carattoli A, Bernabeu S, Bruderer T, Frei R, Nordmann P. (2010). A novel IncQ plasmid type harbouring a class 3 integron from *Escherichia coli*. *J. Antimicrob. Chemother.* 65:1594–1598.

- Poirel L, Weldhagen GF, Naas T, De Champs C, Dove MG, Nordmann P. (2001). GES-2, a class A β -lactamase from *Pseudomonas aeruginosa* with increased hydrolysis of imipenem. *Antimicrob. Agents Chemother.* 45:2598–2603.
- 590 Rosewarne CP, Pettigrove V, Stokes HW, Parsons YM. (2010). Class 1 integrons in benthic bacterial communities: Abundance, association with Tn402-like transposition modules and evidence for coselection with heavy-metal resistance. *FEMS Microbiol. Ecol.* 72:35–46.
- 595 Rowe-Magnus DA, Guerout A-M, Mazel D. (2002). Bacterial resistance evolution by recruitment of super-integron gene cassettes. *Mol. Microbiol.* 43:1657–1669.
- Skurnik D, Le Menac’h A, Zurakowski D, Mazel D, Courvalin P, Denamur E, *et al.* (2005). Integron-associated antibiotic resistance and phylogenetic grouping of *Escherichia coli* isolates from healthy subjects free of recent antibiotic exposure. *Antimicrob. Agents Chemother.* 49:3062–3065.
- 600 Skurnik D, Ruimy R, Andremont A, Amorin C, Rouquet P, Picard B, *et al.* (2006). Effect of human vicinity on antimicrobial resistance and integrons in animal faecal *Escherichia coli*. *J. Antimicrob. Chemother.* 57:1215–1219.
- Stalder T, Barraud Olivier, Casellas M, Dagot C, Ploy M-C. (2012). Integron involvement in environmental spread of antibiotic resistance. *Front. Microbiol.* 3:119.
- 605 Stokes H, Hall R. (1989). A novel family of potentially mobile DNA elements encoding site-specific gene-integration functions: integrons. *Mol. Microbiol.* 3:1669–1683.
- Stokes HW, Gillings M. (2011). Gene flow, mobile genetic elements and the recruitment of antibiotic resistance genes into Gram-negative pathogens. *FEMS Microbiol. Rev.* 35:790–819.
- 610 Su H-C, Ying G-G, Tao R, Zhang R-Q, Zhao J-L, Liu Y-S. (2012). Class 1 and 2 integrons, *sul* resistance genes and antibiotic resistance in *Escherichia coli* isolated from Dongjiang river, South China. *Environ. Pollut.* 169C:42–49. (Consulté juillet 4, 2012).
- 615 Szczepanowski R, Linke B, Krahn I, Gartemann K-H, Gützkow T, Eichler W, *et al.* (2009). Detection of 140 clinically relevant antibiotic-resistance genes in the plasmid metagenome of wastewater treatment plant bacteria showing reduced susceptibility to selected antibiotics. *Microbiology* 155:2306–2319.
- Tennstedt T, Szczepanowski R, Braun S, Pühler A, Schlüter A. (2003). Occurrence of integron-associated resistance gene cassettes located on antibiotic resistance plasmids isolated from a wastewater treatment plant. *FEMS Microbiol. Ecol.* 45:239–252.
- 620 Wright MS, Baker-Austin C, Lindell AH, Stepanauskas R, Stokes HW, McArthur JV. (2008). Influence of industrial contamination on mobile genetic elements: class 1 integron abundance and gene cassette structure in aquatic bacterial communities. *ISME J.* 2:417–428.
- 625 Xu H, Davies J, Miao V. (2007). Molecular characterization of class 3 integrons from *Delftia* spp. *J. Bacteriol.* 189:6276–6283.

- Zhang X, Wu B, Zhang Y, Zhang T, Yang L, Fang HHP, *et al.* (2009a). Class 1 integronase gene and tetracycline resistance genes *tetA* and *tetC* in different water environments of Jiangsu Province, China. *Ecotoxicology* 18:652–660.
- 630 Zhang XX, Zhang T, Zhang M, Fang HHP, Cheng SP. (2009b). Characterization and quantification of class 1 integrons and associated gene cassettes in sewage treatment plants. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 82:1169–1177.

SYNTHESE ET CONCLUSIONS DES TRAVAUX

La résistance des bactéries aux antibiotiques et leurs modes de dissémination sont des problématiques majeures interpellant les gestionnaires du risque sanitaire, du corps médical, les scientifiques spécialistes du transfert de gènes, ainsi que les exploitants de centres d'activités de soins, de stations d'épuration (STEP) et les gestionnaires de l'environnement. Ces questionnements font actuellement l'objet d'une médiatisation relativement importante, suscitant une certaine inquiétude quant à la gestion globale des rejets contaminés et le contrôle de ces bactéries dans différents environnements naturels ou anthropiques. Il devient donc essentiel de se préoccuper de cette problématique en couplant à la fois les différentes approches et points de vue des parties prenantes pour y répondre au mieux.

Les travaux présentés dans ce manuscrit avaient donc pour objectif d'évaluer l'implication des effluents d'activités hospitalières et de la filière carnée, sur la dissémination de l'antibiorésistance, au travers de la dynamique des IR de leurs sources à leurs rejets.

Ces travaux constituent ainsi une contribution :

- à la caractérisation rapide de l'antibiorésistance d'une manière globale,
- à l'établissement d'un bilan quantitatif de l'antibiorésistance dans différents effluents et matrices solides,
- à la caractérisation de l'efficacité des procédés biologiques, traditionnels et avancés, mis en place sur des STEP pour l'élimination des pollutions organiques et/ou médicamenteuses.

Pour ce faire, cinq parties ont été explorées : (i) la pertinence et la faisabilité de la mesure des IR comme biomarqueur, (ii) le bilan des contenus en IR d'effluents et résidus biologiques, (iii) la caractérisation locale de l'influence d'activités hospitalières sur le réseau d'eaux usées urbain et sur l'efficacité de traitement d'une STEP municipale, (iiii) l'efficacité de procédés avancés sur l'antibiorésistance et (iiiiii) les évolutions de la biomasse épuratrice soumise à l'impact d'effluents hospitaliers. Chacune de ces parties reposent sur l'investigation d'un élément génétique, les intégrons de résistance (IR), définis comme une plateforme d'acquisition, d'accumulation et d'expression de gènes de résistance aux antibiotiques. Ce type de structure génétique émerge en effet dans la littérature scientifique comme un marqueur potentiel de l'acquisition de la multirésistance bactérienne.

1 PERTINENCE ET FAISABILITE DE L'EVALUATION GLOBALE DE L'ANTIBIORESISTANCE EN UTILISANT LES IR COMME MARQUEUR GENETIQUE.

De nombreux facteurs sont impliqués dans la dissémination de la résistance aux antibiotiques. Parmi les facteurs génétiques, l'implication des intégrons de résistance (IR) dans l'acquisition et l'expression de l'antibiorésistance chez les bactéries à Gram-négatif, a fait l'objet de nombreuses études en milieux hospitalier et vétérinaire. Ces études ont souligné le rôle et l'implication des IR dans l'émergence de l'antibiorésistance chez des souches pathogènes pour l'homme et l'animal (Barraud et Ploy, 2011).

Par ailleurs, les IR ont été montrés comme ubiquitaires dans l'environnement. Ce caractère universel en fait des structures idéales dans les échanges entre le résistome de l'environnement et le microbiome de l'homme et de l'animal. De plus, d'une manière générale, les impacts anthropiques modernes tendent à augmenter la prévalence des IR aussi bien chez l'homme, que chez l'animal, ou dans l'environnement (Skurnik *et al.*, 2005, 2006; Rosewarne *et al.*, 2010).

D'un point de vue méthodologique, la diversité génétique, impliquée dans la résistance aux antibiotiques et sa dissémination, rend toute évaluation globale fastidieuse. Dans la littérature, cette diversité se traduit par une multitude de méthodes employées pour étudier la dissémination de l'antibiorésistance dans l'environnement, rendant l'évaluation de la contribution de certains biotopes difficile à appréhender.

De part le rôle important des IR dans l'acquisition et l'expression de la résistance aux antibiotiques en milieu hospitalier, leur implication potentielle dans les échanges génétiques bactériens entre l'homme, l'animal et l'environnement et leur structure conservée facilitant leur détection, ils sont un outil idéal pour évaluer l'implication des effluents d'origine anthropique dans la dissémination de l'antibiorésistance dans l'environnement.

Dans nos travaux, l'utilisation de méthodes métagénomiques pour la recherche et la caractérisation des IR s'est révélée comme un moyen d'évaluer, et ce d'une manière globale, la résistance aux antibiotiques, dans une série de matrices d'origines anthropiques et géographiques diverses. Ainsi, nous avons démontré que l'utilisation de ce bio-marqueur permet d'évaluer la contribution des effluents anthropiques, issus pour notre cas des activités

hospitalières et de production carnée bovine, dans la dissémination de l'antibiorésistance dans l'environnement (chapitres 1 et 3).

2 MESURE GLOBALE DES QUANTITES D'IR DANS DES EFFLUENTS ISSUS DE DIFFERENTES ACTIVITES ANTHROPIQUES.

Actuellement peu d'études se sont intéressées à l'antibiorésistance dans les effluents en amont des STEP, alors que paradoxalement les STEP ont été montrées comme une source de bactéries résistantes et de gènes de résistance (Volkmann *et al.*, 2004; Poole *et al.*, 2005; Szczepanowski *et al.*, 2009; Novo et Manaia, 2010). De plus, certains *points chauds* de sélection et de dissémination de la résistance aux antibiotiques comme les hôpitaux et les fermes sont suspectés de participer activement à la dissémination de l'antibiorésistance dans l'environnement (Lupo *et al.*, 2012).

Par comparaison avec des milieux naturels, toutes les matrices anthropiques étudiées, et donc toutes les activités humaines ciblées durant cette étude (activités de soins, activités urbaines, activités d'épuration des eaux usées, activités de production et d'abattages de bovins), contribueraient à la dissémination de l'antibiorésistance dans l'environnement *via* les IR. De plus, au regard des abondances relatives, toutes ces activités anthropiques tendent à sélectionner les IR au sein des communautés bactériennes des effluents ou des résidus biologiques (figure 24). Afin d'éviter toute introduction d'IR d'origine anthropique dans l'environnement, le traitement de ces effluents pour éliminer les bactéries hébergeant ces IR est primordial.

Ainsi, ce travail a permis de confirmer que les traitements des effluents urbains et d'abattoirs par les STEP à boues activées diminuent les concentrations d'IR d'environ 2 log (efficacités égales aux réductions de la concentration bactérienne). Cependant, ces taux de réduction ne permettent pas d'atteindre la qualité des milieux récepteurs, en terme de concentration d'IR, et de concentration de bactéries (estimée à partir de la quantification des gènes codant l'ARNr 16S). Ainsi, jusqu'à 10^{16} IR sont déversés quotidiennement dans l'environnement.

Toutefois, la dilution des effluents traités dans les rivières réceptrices n'aboutit pas à une augmentation détectable de la concentration et de l'abondance relative des IR. En effet, les IR sont des éléments génétiques ubiquitaires et initialement présents dans les communautés bactériennes de l'environnement, constituant un « seuil minimal » d'IR dans ces communautés. Dans les différents milieux naturels étudiés, les valeurs observées sont d'ailleurs du même ordre de grandeur que dans des échantillons avec très peu, ou pas, de pression anthropique (Gillings

et al., 2008b; Hardwick *et al.*, 2008; Wright *et al.*, 2008). Cependant, l'analyse de plusieurs prélèvements effectués dans des milieux naturels (étangs et rivières), a suggéré un effet de la proximité de zones urbaines sur les concentrations et sur l'abondance relative des IR dans ces communautés bactériennes (Rosewarne *et al.*, 2010).

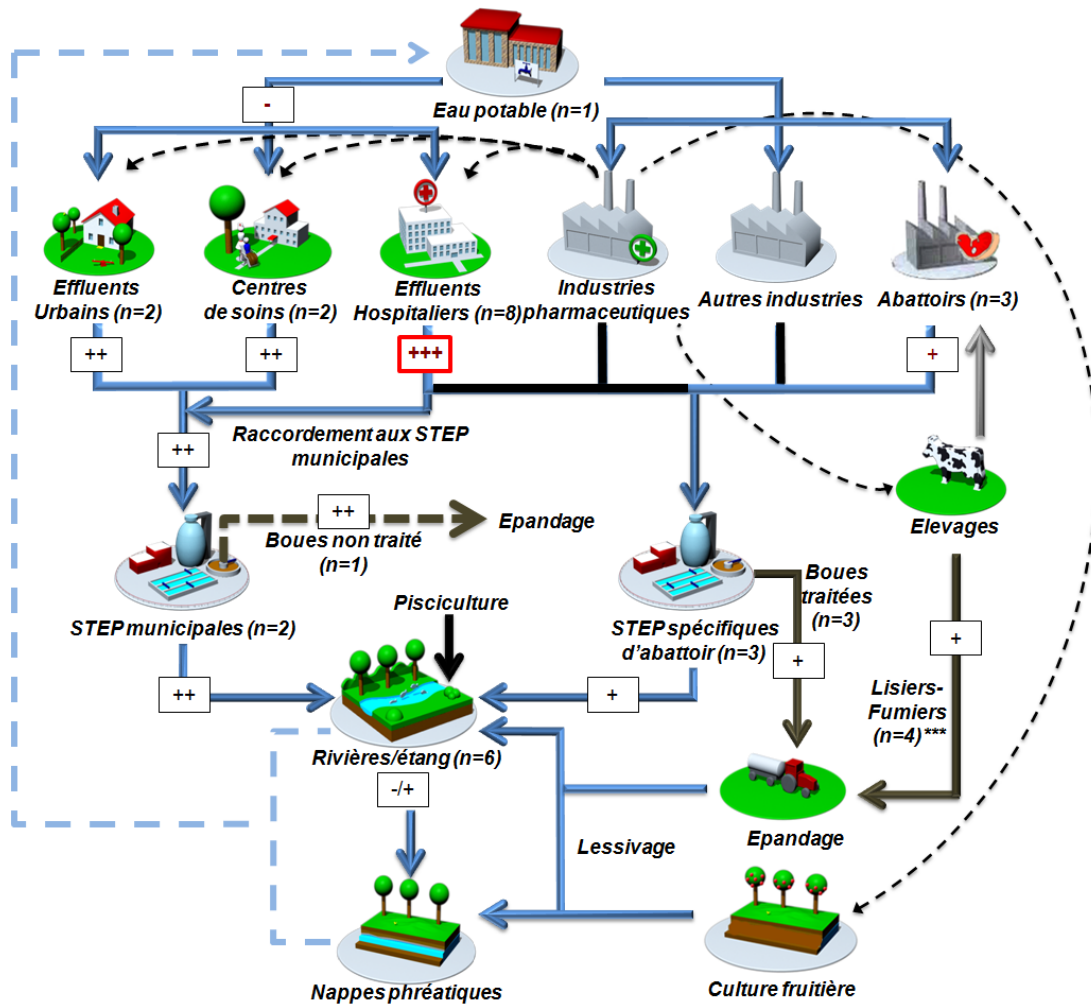


Figure 24 : Principales voies d'entrée des IR dans l'environnement, basées sur la proportion d'IR dans les communautés bactériennes (abondances relatives). Les flèches représentent en bleu : les flux d'eau (les pointillés indiquent la filière de potabilisation de l'eau, ou la filière de traitement des boues), en marron : les flux de solide, en gris : le cheminement des animaux vers les abattoirs, en pointillées noirs : les consommations d'antibiotiques, et en noir : les effluents non étudiés. Les croix représentent des abondances relatives : $+++ \geq 0,3$ et pouvant aller jusqu'à 5 ; $++ \geq 0,03$; $+ < 0,1$.

Les déchets solides issus de la production et de la transformation bovine (fumier, lisier et boues traitées de STEP), présentent des concentrations importantes d'IR, mais des abondances relatives faibles (figure 24). Bien que des biais de méthodologie peuvent interférer dans la comparaison des données avec la littérature (Delmont *et al.*, 2012), ces abondances relatives sont environ 1000 fois supérieures à des sols sans influence anthropique (Byrne-Bailey

et al., 2010; Gaze *et al.*, 2011), suggérant que leur utilisation comme amendement agricole participerait à la dissémination de la résistance aux antibiotiques dans les sols.

Enfin, par rapport à toutes les matrices étudiées, les communautés bactériennes issues des effluents de 7 hôpitaux Européens présentent des abondances relatives d'IR 3 à 280 fois plus élevées que toutes les autres matrices étudiées (figure 24), montrant que ce phénomène est global. Nous pouvons suggérer que les activités hospitalières tendent à sélectionner principalement des souches hébergeant des IR, et par conséquent le potentiel de dissémination de la résistance aux antibiotiques par les effluents hospitaliers est accru par rapport aux autres effluents. De plus, les hôpitaux peuvent être contraints à l'utilisation d'antibiotiques de dernier recours, augmentant la probabilité de voir émerger des souches résistantes à ces antibiotiques dans les effluents de soins. Ces conclusions amènent à la nécessité d'une vigilance plus accrue quant à la gestion aval du traitement de ces effluents (chapitre 1.2.1).

3 CARACTERISATION QUANTITATIVE ET QUALITATIVE DE L'IMPACT D'UN EFFLUENT HOSPITALIER SUR LA DISSEMINATION DES IR

Afin de mieux évaluer l'influence locale d'un effluent hospitalier sur la dissémination de l'antibiorésistance *via* les IR, une caractérisation quantitative et qualitative, c'est-à-dire en termes respectivement de flux d'IR, et de cassettes de gène de résistance portées par les IR de classe 1, a été réalisée de la source des effluents au rejet dans la rivière (chapitre 3) (figure 25).

Cette étude a révélé une large diversité de cassettes de gènes au sein des IR de classe 1, et dont un certain nombre codent des résistances aux antibiotiques. De nombreuses cassettes de gènes, jusqu'alors uniquement décrites dans des isolats cliniques, ont été retrouvées dans les différents échantillons, montrant que les IR de classe 1 jouent un rôle majeur dans la dissémination de la résistance aux antibiotiques dans l'environnement.

Les activités hospitalières semblent avoir un impact direct sur la proportion des IR et le portage de cassettes de gène des IR de classe 1 des communautés bactériennes des effluents hospitaliers. En effet, des prévalences élevées de cassettes de gènes de résistance à des antibiotiques principalement utilisés en milieu hospitalier (aminoglycosides) sont retrouvées dans l'effluent hospitalier. Ces résultats montrent le rôle significatif des IR de classe 1 dans les hôpitaux, où la pression de sélection exercée par les antibiotiques favorise leur dissémination. De plus, les ammoniums quaternaires sont très utilisés dans les milieux hospitaliers (Kümmerer, 2001), et les IR de classe 1 caractérisés au cours de cette étude possèdent au moins un gène de résistance à ces composés, *qacEAI* (Paulsen *et al.*, 1993). Dans certains biotopes, le rôle des ammoniums quaternaires dans la sélection d'IR de classe 1 a été rapporté (Gaze *et al.*, 2005; Gillings *et al.*, 2008b), suggérant que dans les hôpitaux des effets de cosélection entre antibiotiques et ammoniums quaternaires pourraient être impliqués dans la sélection des IR de classe 1.

La dilution des effluents hospitaliers au niveau du réseau collectif (plus de 50 fois), réduit leur charge globale à l'arrivée dans les stations de traitement. Malgré cela, 14% des IR arrivant dans la STEP municipale proviennent de l'effluent hospitalier (figure 25), et certaines cassettes de gène, à *priori* spécifiques de cet effluent, sont identifiées à l'entrée de la STEP, soulignant l'impact des effluents hospitaliers dans la dissémination des IR de classe 1 dans les

STEP. Néanmoins, les quantités d'IR et la composition des cassettes de gènes retrouvées en entrée de STEP sont principalement influencées par les effluents urbains (figure 25), qui restent les contributeurs majoritaires de l'apport d'IR. Dans ces effluents, la proportion d'IR dans les communautés bactériennes est moins conséquente, et la diversité génétique des cassettes de gène d'IR de classe 1 est plus importante, mais majoritairement affiliée à des cassettes de gène impliquées dans des résistances à des antibiotiques actuellement très peu utilisés en médecine humaine (streptomycine, spectinomycine) (figure 25). Toutefois, certaines cassettes de gène pouvant avoir des répercussions cliniques, telles que des cassettes de gènes codant des β -lactamase à spectre étendu (*bla_{BEL-1}* et *bla_{GES-2}*), ont été retrouvées dans ces effluents. La spécificité des traitements d'antibiothérapie au niveau des établissements de soins semble engendrer une plus grande proportion de certaines des résistances spécifiques, qui sera cependant réduite dans les réseaux d'eau non connectés à un établissement de soins.

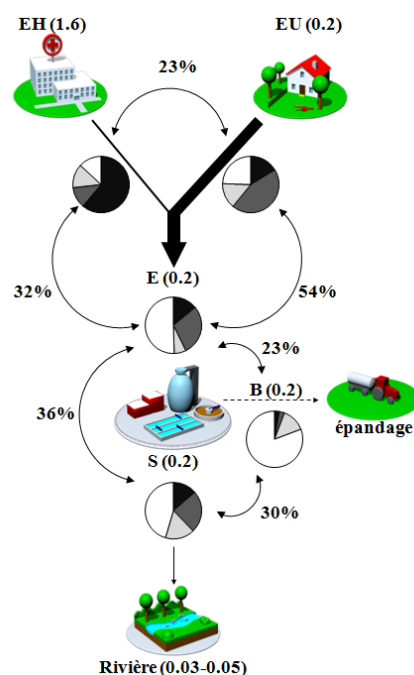


Figure 25 : Flux et abondances relatives moyennes (entre parenthèses) des IR, ainsi que la composition des cassettes de gène des IR de classe 1 (camembert) de la source au rejet. L'épaisseur des flèches est proportionnelle à la quantité d'IR arrivant et sortant de la STEP (l'entrée de la STEP est égale à 100%, et les effluents urbains échantillonnés sont considérés comme représentatifs de tous les effluents urbains collectés par la STEP) ; la flèche en pointillés symbolise que les boues sont non traitées ; les quartiers de cercle représentent les proportions, en noir : de cassettes de gène impliquées dans la résistance à des antibiotiques autre que *aadA*, en gris foncé : les cassettes de gène affiliées aux gènes *aadA*, en gris clair : les cassettes de gène impliquées dans d'autres fonctions (majoritairement inconnues), en blanc : les réseaux ne comprenant aucune cassette de gène . Les double-flèches indiquent le pourcentage de similarité des pools de cassettes de gène entre eux, selon l'indice de Bray-Curtis.

Comme précédemment observé dans la première partie de ce travail, les STEP à boue activée urbaines éliminent une fraction des IR (d'environ 2 log), mais ne diminuent pas significativement la proportion des IR de classe 1 et 2 dans les communautés bactériennes (figure 25). Ainsi, parmi les 10^{16} IR rejetés quotidiennement dans l'environnement, plus d'un tiers correspond à des IR de classe 1 hébergeant des cassettes de gène potentiellement impliquées dans la résistance aux antibiotiques. Cependant, le procédé de traitement réduit la diversité des cassettes de gène par rapport à l'effluent brut (figure 25), indiquant un effet du procédé sur les IR de classe 1. Une partie des cassettes de gène retrouvée dans l'effluent traité correspond aux cassettes de gène majoritairement retrouvées (i) dans les effluents non traités, et dans ce cas impliquées dans la résistance aux antibiotiques, et (ii) dans les boues d'épuration, et codant potentiellement pour des protéines de fonctions inconnues. Sur le postulat que les cassettes de gène de fonctions inconnues, et uniquement retrouvées dans les boues d'épuration correspondent à des IR de classe 1 naturellement présents au sein des communautés bactériennes de l'environnement, la STEP mélangerait ces IR avec des IR de classe 1 d'origine anthropique, augmentant la probabilité d'échanges entre microbiome d'origine anthropique et microbiome environnemental. D'ailleurs, cette étude a permis d'apporter certaines preuves, appuyant la théorie que des échanges de cassettes de gènes entre intégrons chromosomique de bactéries environnementales (considérés comme des ancêtres des IR et des réservoirs de nouvelles cassettes de gènes), et IR auraient bien lieu. Par exemple, certains sites de recombinaison *attC* de cassettes de gène de fonction inconnues d'IR de classe 1 retrouvés au cours de cette étude présentent plus de 95% d'identité de séquence nucléotidique avec des sites de recombinaison *attC* de cassettes de gène d'intégrons chromosomiques de bactéries environnementales, suggérant leurs origines (chapitre 3).

Par ailleurs, dans toutes les communautés bactériennes analysées, nous avons montré que les IR de classe 3 sont plus prévalents que les IR de classe 2. Ce type d'IR, moins recherché que les deux autres, est très rarement décrit chez des souches bactériennes d'intérêt clinique issues du milieu médical, du milieu vétérinaire ou de l'environnement. Actuellement seulement quatre IR de classe 3 ont été complètement décrits (Arakawa *et al.*, 1995; Correia *et al.*, 2003; Xu *et al.*, 2007; Poirel *et al.*, 2010). Deux de ces IR isolés de souches cliniques présentaient des cassettes de gènes impliquées dans la résistance aux antibiotiques, alors que les deux autres IR de classe 3, isolés de souches environnementales, présentaient des cassettes de gènes encodant pour des protéines de fonctions inconnues. Dans les eaux, les IR de classe 3 sont donc sous-

Synthèse & conclusions des travaux

estimés et probablement portés par des souches bactériennes d'intérêt clinique ou vétérinaire moindre. Leur rôle dans la dissémination de la résistance aux antibiotiques reste à éclaircir.

4 EFFICACITE DE PROCEDES DE TRAITEMENT AVANCE SUR LE TRAITEMENT DES EFFLUENTS HOSPITALIERS

A l'image des composés pharmaceutiques, pour lesquels les molécules retrouvées dans les STEP ont majoritairement pour origine les effluents urbains (Kümmerer, 2001), les effluents hospitaliers ne participant qu'à environ 14% de l'apport de certains de ces composés (Ort *et al.*, 2010; Escher *et al.*, 2011), les charges d'IR arrivant dans les STEP en provenance des hôpitaux sont similaires. D'un point de vue chimique, les hôpitaux participent à l'introduction de composés pharmaceutiques spécifiques dans les STEP, et du point de vue des IR, la même observation peut être faite, avec des résistances spécifiquement liées à l'activité hospitalière.

Afin d'éviter l'introduction de composés pharmaceutiques et de bactéries spécifiquement liés à l'activité hospitalière dans le réseau d'eau usée municipale, le traitement à la source de ces effluents par des procédés avancés est de plus en plus envisagé. Dans le cadre du projet européen PILLS visant à évaluer la faisabilité du traitement sur site des effluents hospitaliers, plusieurs procédés de type bioréacteur à membrane (BàM), associés à des traitements avancés, ont été évalués pour leur efficacité sur la réduction des IR et des bactéries (estimées à partir de la quantification des gènes codant l'ARNr 16S) (chapitre 1.2.2).

Cette étude a mis en évidence que le traitement par BàM utilisant la microfiltration, avec un seuil de coupure de 0,04µm, ne permet pas la séparation efficace des communautés bactériennes des effluents hospitaliers et des effluents traités. Ainsi le rendement d'élimination bactérien est faible. *A contrario*, les BàM utilisant l'ultrafiltration réduisent de manière efficace à la fois la concentration bactérienne et la concentration d'IR, avec des rendements d'élimination pouvant aller respectivement jusqu'à 2,9 et 5 log, aboutissant à une qualité des effluents traités proche des milieux naturels. Deux BàM équipés de membrane d'ultrafiltration ont été étudiés. Dans un cas, le traitement par ultrafiltration permet une séparation efficace entre les communautés bactériennes de l'effluent hospitalier et des communautés bactériennes du réseau d'eau traitée. Cependant dans le second cas, la présence de taxons bactériens communs avant et après l'ultrafiltration, et l'abondance relative élevée des IR dans les communautés bactériennes du réseau d'eau traitée, suggère une contamination d'origine hospitalière après la membrane. Ces procédés, dans leur utilisation optimale, peuvent donc constituer un moyen efficace d'éliminer la pollution bactérienne d'un effluent anthropique.

Synthèse & conclusions des travaux

Par ailleurs, les traitements avancés par ozonation et par charbons actifs n'influencent pas majoritairement la qualité des effluents traités par les Bàm utilisant l'ultrafiltration, en termes de concentrations d'IR et de bactéries (estimées à partir de la quantification des gènes codant l'ARNr 16S). Cependant dans le cas du Bàm avec l'ultrafiltration présentant des dysfonctionnements probables, l'ozonation réduit à la fois l'abondance relative des IR et la diversité bactérienne, montrant l'utilité de ce traitement avancé. Par ailleurs, le charbon actif granulaire aboutit à une meilleure séparation des communautés bactériennes du système de traitement et des effluents traités que le charbon actif en poudre couplé à la filtration sur sable.

5 L'IMPACT DU TRAITEMENT DES EFFLUENTS HOSPITALIERS SUR LA BIOMASSE BACTERIENNE ACTIVE DES PROCÉDES BIOLOGIQUES.

Les résultats du traitement spécifique des effluents hospitaliers par des procédés à boues activées ont suggéré qu'il pouvait y avoir une influence de l'effluent hospitalier sur l'abondance relative des IR au sein des communautés bactériennes de la biomasse épuratrice.

Afin d'approfondir cette hypothèse, une reproduction à l'échelle du laboratoire d'un procédé de traitement par boues activées classique a été étudiée et la morphologie des floccs par microscopie confocale a été suivie. Deux pilotes identiques ont été conduits en parallèle, en étant alimentés soit avec un effluent hospitalier, soit avec un effluent urbain sans activité de soins. Cette étude a mis en évidence l'influence générale du traitement des effluents hospitaliers sur la biomasse épuratrice à plusieurs échelles, et notamment sur la diversité bactérienne et la dissémination des IR (chapitre 2).

Le traitement spécifique des effluents hospitaliers augmente la proportion relative des IR de classe 1 dans les communautés bactériennes des boues d'épuration. Cette augmentation concordant avec l'introduction ou le développement *in situ* de bactéries connues pour présenter des taux importants d'IR de classe 1, et appartenant au genre *Pseudomonas* (Stokes *et al.*, 2012), suggère que l'augmentation observée serait imputée à ce genre bactérien. Les *Pseudomonas* ssp. sont connues pour être impliquées dans l'adhésion de la structure des floccs par la production d'exopolymères (Bitton, 2005). Suite au traitement de l'effluent hospitalier, l'imagerie par microscopie confocale a révélé une surproduction d'exopolymères par les floccs, probablement induite par certains composés présents dans les effluents hospitaliers (Aquino et Stuckey, 2004; Henriques et Love, 2007; Avella *et al.*, 2010). Ces résultats suggèrent donc que les bactéries du genre *Pseudomonas* joueraient un rôle majeur dans l'adaptation des floccs lors du traitement des effluents hospitaliers.

Les bactéries du genre *Pseudomonas* ont une capacité d'adaptation très développée, ce qui leur vaut d'être retrouvées dans de nombreux environnements. Cette capacité est en partie due à la plasticité de leur génome constitué de nombreux éléments génétiques mobiles (Mathee *et al.*, 2008). Certaines de ces espèces sont d'ailleurs des pathogènes opportunistes très problématiques dans les milieux hospitaliers de part leur résistance à de nombreux antibiotiques

(Kunz et Brook, 2010). Dans l'environnement, les *Pseudomonas* spp. seraient largement impliquées dans l'acquisition et la dissémination de gènes de résistance (Witte, 2000). Dans le cadre du traitement des effluents hospitaliers, les boues d'épuration représenteraient une niche écologique pour le développement de bactéries du genre *Pseudomonas* spp.. Par conséquent, le risque de dissémination des gènes de résistance dans les communautés bactériennes des boues traitant les effluents hospitaliers serait accru.

De plus, les cassettes de gènes précédemment caractérisées dans les effluents municipaux et encodant potentiellement des β -lactamases à spectre étendu (*bla_{BEL-1}* et *bla_{GES-2}*), ont actuellement été décrites uniquement dans des IR de classe 1 de *Pseudomonas* spp. (Poirel *et al.*, 2001, 2005a). De la même manière, des sites *attC* de cassettes de gène d'IR de classe 1 précédemment identifiées, étaient affiliés à des sites *attC* d'intégrons chromosomiques de *Pseudomonas* spp.. Tout ces résultats laissent penser que les bactéries du genre *Pseudomonas* pourraient jouer un rôle majeur dans les échanges de gènes entre bactéries de l'environnement et bactéries commensales de l'homme et de l'animal, et que le traitement spécifique des effluents hospitaliers peut contribuer à favoriser ces échanges au sein des boues d'épuration.

PERSPECTIVES

Les travaux réalisés durant cette thèse ont permis de faire émerger certaines questions, dont les réponses pourront/devront être explorées, sur la dissémination de la résistance aux antibiotiques d'un point de vue global, fondamental, et sur une meilleure gestion du traitement des effluents.

Du point de vue global, l'utilisation d'une méthodologie identique a permis de comparer rigoureusement l'influence de plusieurs sources anthropiques suspectées de participer à la dissémination de l'antibiorésistance. Cependant d'autres activités anthropiques telles que la pisciculture, ou la production industrielle, ont été montrées comme participant à la dissémination de la résistance aux antibiotiques dans l'environnement (Knapp *et al.*, 2011; Wright *et al.*, 2008; Gao *et al.*, 2012a). De plus, une influence de la proximité des zones urbaines sur les concentrations et les abondances relatives des IR dans les communautés bactériennes des eaux naturelles a été observée. Ainsi dans la continuité de cette étude l'inclusion d'autres effluents d'origines anthropique, et l'investigation de la dissémination de l'antibiorésistance par la même méthode, et à l'échelle d'un bassin versant permettrait, d'un point de vue général, d'appréhender au mieux les sources et les points d'entrée majeurs de l'antibiorésistance d'origine anthropique dans l'environnement.

Du point de vue de la gestion aval du traitement des effluents d'origine anthropique, cette étude a soulevé plusieurs points qui ouvrent plusieurs voies d'exploration.

Le traitement spécifique des effluents d'un hôpital par un procédé à boue activée a mis au jour une augmentation de la proportion et la concentration des IR au sein des communautés bactériennes des boues, ainsi qu'une intrusion et/ou un développement de bactéries du genre *Pseudomonas*, soulevant le questionnement de la gestion du traitement aval de ces boues contaminées. Une étude similaire et conduite à l'échelle réelle d'une STEP permettrait de confirmer et généraliser ces résultats observés à l'échelle du laboratoire. De plus, la recherche et la caractérisation des souches appartenant au genre *Pseudomonas*, et des IR et de leurs cassettes de gène de résistances présents au sein de ces boues permettraient d'affiner ces hypothèses et de mieux évaluer le risque sanitaire de ces déchets, s'il y a lieu. Par la suite l'influence de procédés de traitement des boues pourrait être envisagée.

Le traitement des effluents hospitaliers, et plus globalement des effluents municipaux, par des procédés de BâM basés sur l'ultrafiltration représente un avenir dans la réduction de la pollution microbiologique de l'environnement. Toutefois, une contamination probable des

effluents traités par des bactéries de l'effluent non traité a été observée sur l'un des pilotes étudiés. L'identification et la caractérisation des bactéries présentes avant et après l'ultrafiltration permettrait de confirmer cette hypothèse et trouver la cause de contamination afin d'optimiser ce procédé. Par ailleurs, de l'ADN sous forme libre et provenant du bassin biologique pourrait potentiellement passer les membranes d'ultrafiltration. L'intégration naturelle d'ADN libre par des bactéries par transformation étant un phénomène se produisant dans l'environnement (Aminov, 2011), l'acquisition d'ADN libre d'origine anthropique par les populations bactériennes de l'environnement et présentes dans les réseaux d'eaux traitées devrait être envisagée afin de garantir l'élimination de la dissémination de l'antibiorésistance.

La dissémination de l'antibiorésistance par l'épandage de résidus biologiques issus des activités de production carnée sont un fait (Gaze *et al.*, 2011). Les filières de valorisation des résidus biologiques agricoles, comme la méthanisation, sont de plus en plus envisagées. Ce type de traitement anaérobie pour réduire les concentrations et les abondances relatives d'IR et de gènes de résistance dans les boues de STEP a été rapporté comme étant plus ou moins efficace selon les paramètres d'opération (Ma *et al.*, 2011). Dans un souci d'optimisation de cette filière, l'évaluation de l'influence de tels procédés sur la dissémination de l'antibiorésistance semble donc indispensable.

D'un point de vue fondamental, plusieurs points ont également été mis en exergue et soulèvent d'autres questions.

Dans cette étude nous nous sommes focalisés sur la dissémination des gènes des intégrases de classe 1, 2 et 3, et des cassettes de gènes hébergées par les IR de classe 1, confirmant l'ubiquité de ces structures et leur répartition différente parmi les populations microbiennes. L'analyse de la dynamique d'expression de ces cassettes de gènes et de ces intégrases au sein des écosystèmes, notamment les écosystèmes épurateurs, permettrait d'identifier les facteurs biotiques et abiotiques favorisant leur expression, et potentiellement la recombinaison de cassettes de gène, mais permettrait également de mieux appréhender le rôle des IR dans leur environnement. De plus, les promoteurs des IR et des cassettes de gène sont connus pour influencer grandement leur expression et le fonctionnement des IR. Des études de la diversité de ces promoteurs, par des méthodes de séquençage haut débit, dans les écosystèmes naturels, mais aussi dans des études microcosmes sous contrôle peuvent être envisagées. Ce type d'études apporterait aussi des éclaircissements quant aux mécanismes d'évolution et les facteurs les influençant conduisant à la sélection, ou non, de certains types de variants de

promoteur permettant de mieux exprimer ou non l'intégrase et/ou les cassettes de gène au sein des communautés bactériennes.

Cette étude a également souligné que le traitement des effluents hospitaliers induit une surproduction de matrice exopolymérique des floccs bactériens. Par analogie avec les biofilms, la réponse SOS bactérienne, induite par la formation d'ADN simple brin intracellulaire suite à un stress, a été suggérée comme pouvant induire la formation de biofilms chez *Pseudomonas aeruginosa* (Gotoh *et al.*, 2010). Cette voie de régulation est aussi impliquée dans bien d'autres voies de régulation bactérienne tels que le transfert horizontal de gènes (Aminov, 2011) et l'expression de l'intégrase des IR de classe 1 (Guerin *et al.*, 2009). Sur la base d'études similaires, et réalisées à partir d'échantillons environnementaux tels que des boues de STEP ou des sédiments de rivière, le suivi de l'expression de gènes induits par la réponse SOS permettrait de mieux comprendre les facteurs environnementaux induisant des stress bactériens, et par conséquent impliqués dans des mécanismes d'échange et de recombinaison génétique. La réalisation d'un tel projet permettrait de mieux comprendre les mécanismes moléculaires mis en place dans l'adaptation des communautés bactériennes soumises à des pressions anthropiques.

La microscopie confocale associée à des marquages par sondes fluorescentes s'est révélée être un outil efficace et instructif pour la caractérisation *in situ* d'échantillons environnementaux et notamment dans la caractérisation des matrices exopolymériques de boues de STEP. L'application de ce type de méthode dans le suivi des IR dans leur biotope (biofilms ou floc par exemple) permettrait d'apporter une contribution cruciale dans la clarification des rôles et des fonctions des IR dans l'environnement.

Cette étude a montré que les IR de classe 3 sont plus largement disséminés que ce qui était suggéré. La détermination des CG portées par ces éléments, et aussi l'identification des bactéries les hébergeant permettrait de mieux comprendre leur rôle dans la dissémination de la résistance aux antibiotiques.

Finalement de nombreuses CG identifiées au cours de cette étude n'ont jamais été décrites par ailleurs, et encodent potentiellement des protéines de fonctions inconnues. L'élucidation de leur origine et de leur fonction ainsi que la caractérisation des bactéries les hébergeant permettraient d'étendre les connaissances sur les IR et leurs fonctions dans l'environnement. Une de ces cassettes de gène, très prévalentes dans les effluents de l'hôpital,

encoderaient une protéine conférant une résistance à une toxine bactérienne agissant de manière analogue aux fluoroquinolones. L'éclaircissement sur l'implication éventuelle de cette protéine dans la résistance aux fluoroquinolones est d'un intérêt clinique certain.

L'étude de la résistance aux antibiotiques est donc un challenge pour nos sociétés actuelles. La dissémination de l'antibiorésistance est une problématique mondiale du fait des échanges internationaux advenant au-delà des frontières géographiques ou sociales. La conséquence de ce constat est ainsi la nécessité d'une réponse globale mettant à contribution les chercheurs, médecins, pharmaciens, et gestionnaires. Grâce à la mutualisation des connaissances et à l'émergence de nouvelles techniques d'exploration génétique, nous sommes certainement à l'aube de nouvelles découvertes sur les mécanismes et le rôle des transferts de gènes entre microorganismes, qui permettront certainement de révolutionner certaines approches.

Le défi de la recherche est à l'échelle des risques potentiels et des découvertes à venir.

BIBLIOGRAPHIE

- Agersø, Y., et Petersen, A. (2007). The tetracycline resistance determinant Tet 39 and the sulphonamide resistance gene *sulIII* are common among resistant *Acinetobacter* spp. isolated from integrated fish farms in Thailand. *J. Antimicrob. Chemother.* 59, 23–27.
- Albrich, W. C., Angstwurm, M., Bader, L., et Gärtner, R. (1999). Drug resistance in intensive care units. *Infection* 27, 19–23.
- Albrich, W. C., Monnet, D. L., et Harbarth, S. (2004). Antibiotic selection pressure and resistance in *Streptococcus pneumoniae* and *Streptococcus pyogenes*. *Emerg. Infect. Dis.* 10, 514–517.
- Allen, H. K., Donato, J., Wang, H. H., Cloud-Hansen, K. A., Davies, J., et Handelsman, J. (2010). Call of the wild: Antibiotic resistance genes in natural environments. *Nat. Rev. Microbiol.* 8, 251–259.
- Aminov, R. I. (2011). Horizontal gene exchange in environmental microbiota. *Front. Microbiol.* 2, 158.
- Aminov, R. I., et Mackie, R. I. (2007). Evolution and ecology of antibiotic resistance genes. *FEMS Microbiol. Lett.* 271, 147–161.
- Aquino, S. F., et Stuckey, D. C. (2004). Soluble microbial products formation in anaerobic chemostats in the presence of toxic compounds. *Water Res.* 38, 255–266.
- Arakawa, Y., Murakami, M., Suzuki, K., Ito, H., Wacharotayankun, R., Ohsuka, S., Kato, N., et Ohta, M. (1995). A novel integron-like element carrying the metallo-beta-lactamase gene *blaIMP*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 39, 1612–1615.
- Araújo, C., Torres, C., Silva, N., Carneiro, C., Gonçalves, A., Radhouani, H., Correia, S., da Costa, P. M., Paccheco, R., Zarazaga, M., et al. (2010). Vancomycin-resistant enterococci from Portuguese wastewater treatment plants. *J. Basic Microbiol.* 50, 605–609.
- Armstrong, J. L., Calomiris, J. J., et Seidler, R. J. (1982). Selection of antibiotic-resistant standard plate count bacteria during water treatment. *Appl. Environ. Microbiol.* 44, 308–316.
- Armstrong, J. L., Shigeno, D. S., Calomiris, J. J., et Seidler, R. J. (1981). Antibiotic-resistant bacteria in drinking water. *Appl. Environ. Microbiol.* 42, 277–283.
- Auerbach, E. A., Seyfried, E. E., et McMahon, K. D. (2007). Tetracycline resistance genes in activated sludge wastewater treatment plants. *Water Res.* 41, 1143–1151.
- Avella, A. C., Delgado, L. F., Görner, T., Albasi, C., Galmiche, M., et de Donato, P. (2010). Effect of cytostatic drug presence on extracellular polymeric substances formation in municipal wastewater treated by membrane bioreactor. *Bioresour. Technol.* 101, 518–526.
- Baltz, R. H. (2008). Renaissance in antibacterial discovery from *Actinomycetes*. *Curr. Opin. Pharmacol.* 8, 557–563.

Bibliographie

- Bancroft, K., Maloney, S. W., McElhaney, J., Suffet, I. H., et Pipes, W. O. (1983). Assessment of bacterial growth and total organic carbon removal on granular activated carbon contactors. *Appl. Environ. Microbiol.* 46, 683–688.
- Baquero, F., Martínez, J.-L., et Cantón, R. (2008). Antibiotics and antibiotic resistance in water environments. *Curr. Opin. Biotechnol.* 19, 260–265.
- Barlow, R. S., Fegan, N., et Gobius, K. S. (2008). A comparison of antibiotic resistance integrons in cattle from separate beef meat production systems at slaughter. *J. Appl. Microbiol.* 104, 651–658.
- Barlow, R. S., Fegan, N., et Gobius, K. S. (2009). Integron-containing bacteria in faeces of cattle from different production systems at slaughter. *J. Appl. Microbiol.* 107, 540–545.
- Barraud, O., Baclet, M.-C., Denis, F., et Ploy, M.-C. (2010). Quantitative multiplex real-time PCR for detecting class 1, 2 and 3 integrons. *J. Antimicrob. Chemother.* 65, 1642–1645.
- Barraud, O., et Ploy, M.-C. (2011). Actualités sur les intégrons de résistance aux antibiotiques : mise au point. *Journal des Anti-infectieux* 13, 133–144.
- Binh, C. T. T., Heuer, H., Gomes, N. C. M., Kotzerke, A., Fulle, M., Wilke, B.-M., Schloter, M., et Smalla, K. (2007). Short-term effects of amoxicillin on bacterial communities in manured soil. *FEMS Microbiol. Ecol.* 62, 290–302.
- Bitton, G. (2005). *Wastewater microbiology*. 3rd ed. Hoboken N.J.: Wiley-Liss John Wiley & Sons.
- Blanch, A. R., Caplin, J. L., Iversen, A., Kühn, I., Manero, A., Taylor, H. D., et Vilanova, X. (2003). Comparison of enterococcal populations related to urban and hospital wastewater in various climatic and geographic European regions. *J. Appl. Microbiol.* 94, 994–1002.
- van den Bogaard, A. E., et Stobberingh, E. E. (2000). Epidemiology of resistance to antibiotics: Links between animals and humans. *Int. J. Antimicrob. Agents* 14, 327–335.
- Borjesson, S., Dienues, O., Jarnheimer, P.-A., Olsen, B., Matussek, A., et Lindgren, P.-E. (2009). Quantification of genes encoding resistance to aminoglycosides, beta-lactams and tetracyclines in wastewater environments by real-time PCR. *Int. J. Environ. Health Res.* 19, 219–230.
- Börjesson, S., Matussek, A., Melin, S., Löfgren, S., et Lindgren, P. E. (2010). Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in municipal wastewater: an uncharted threat? *J. Appl. Microbiol.* 108, 1244–1251.
- Botitsi, E., Frosyni, C., et Tsipi, D. (2007). Determination of pharmaceuticals from different therapeutic classes in wastewaters by liquid chromatography-electrospray ionization-tandem mass spectrometry. *Anal Bioanal. Chem.* 387, 1317–1327.
- Byrne-Bailey, K. G., Gaze, W. H., Kay, P., Boxall, A. B. A., Hawkey, P. M., et Wellington, E. M. H. (2009). Prevalence of sulfonamide resistance genes in bacterial isolates from manured agricultural soils and pig slurry in the United Kingdom. *Antimicrob. Agents Chemother.* 53, 696–702.

- Byrne-Bailey, K. G., Gaze, W. H., Zhang, L., Kay, P., Boxall, A., Hawkey, P. M., et Wellington, E. M. H. (2010). Integron prevalence and diversity in manured soil. *Appl. Environ. Microbiol.* 77, 684–687.
- Caplin, J. L., Hanlon, G. W., et Taylor, H. D. (2008). Presence of vancomycin and ampicillin-resistant *Enterococcus faecium* of epidemic clonal complex-17 in wastewaters from the south coast of England. *Environ. Microbiol.* 10, 885–892.
- Cattoir, V., Poirel, L., Mazel, D., Soussy, C.-J., et Nordmann, P. (2007). *Vibrio splendidus* as the source of plasmid-mediated QnrS-like quinolone resistance determinants. *Antimicrob. Agents Chemother.* 51, 2650–2651.
- Chee-Sanford, J. C., Mackie, R. I., Koike, S., Krapac, I. G., Lin, Y.-F., Yannarell, A. C., Maxwell, S., et Aminov, R. I. (2009). Fate and transport of antibiotic residues and antibiotic resistance genes following land application of manure waste. *J. Environ. Qual.* 38, 1086–1108.
- Chen, J., Michel, F. C., Jr, Sreevatsan, S., Morrison, M., et Yu, Z. (2010). Occurrence and persistence of erythromycin resistance genes (*erm*) and tetracycline resistance genes (*tet*) in waste treatment systems on swine farms. *Microb. Ecol.* 60, 479–486.
- Chitnis, V., Chitnis, S., Vaidya, K., Ravikant, S., Patil, S., et Chitnis, D. S. (2004). Bacterial population changes in hospital effluent treatment plant in central India. *Water Res.* 38, 441–447.
- Correia, M., Boavida, F., Grosso, F., Salgado, M. J., Lito, L. M., Cristino, J. M., Mendo, S., et Duarte, A. (2003). Molecular characterization of a new class 3 integron in *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 47, 2838–2843.
- da Costa, P. M., Vaz-Pires, P., et Bernardo, F. (2008). Antimicrobial resistance in *Escherichia coli* isolated in wastewater and sludge from poultry slaughterhouse wastewater plants. *J. Environ. Health* 70, 40-45, 51, 53.
- Czekalski, N., Berthold, T., Caucci, S., Egli, A., et Bürgmann, H. (2012). Increased levels of multiresistant bacteria and resistance genes after wastewater treatment and their dissemination into lake Geneva, Switzerland. *Front. Microbiol.* 3, 106.
- D'Costa, V. M., McGrann, K. M., Hughes, D. W., et Wright, G. D. (2006). Sampling the antibiotic resistome. *Science* 311, 374–377.
- Davies, J. (2007). Microbes have the last word. A drastic re-evaluation of antimicrobial treatment is needed to overcome the threat of antibiotic-resistant bacteria. *EMBO Rep.* 8, 616–621.
- Van De Sande-Bruinsma, N., Grundmann, H., Verloo, D., Tiemersma, E., Monen, J., Goossens, H., Ferech, M., Mittermayer, H., Metz, S., Koller, W., et al. (2008). Antimicrobial drug use and resistance in Europe. *Emerg. Infect. Dis.* 14, 1722–1730.
- Delmont, T. O., Prestat, E., Keegan, K. P., Faubladiet, M., Robe, P., Clark, I. M., Pelletier, E., Hirsch, P. R., Meyer, F., Gilbert, J. A., et al. (2012). Structure, fluctuation and magnitude of a natural grassland soil metagenome. *ISME J.* 6, 1677–1687.

Bibliographie

- Diwan, V., Tamhankar, A., Khandal, R., Sen, S., Aggarwal, M., Marothi, Y., Iyer, R., Sundblad Tonderski, K., et Stalsby Lundborg, C. (2010). Antibiotics and antibiotic-resistant bacteria in waters associated with a hospital in Ujjain, India. *BMC Public Health* 10, 414.
- Escher, B. I., Baumgartner, R., Koller, M., Treyer, K., Lienert, J., et McArdell, C. S. (2011). Environmental toxicology and risk assessment of pharmaceuticals from hospital wastewater. *Water Res.* 45, 75–92.
- Fajardo, A., et Martínez, J. L. (2008). Antibiotics as signals that trigger specific bacterial responses. *Curr. Opin. Microbiol.* 11, 161–167.
- Ferreira, A. E., Marchetti, D. P., De Oliveira, L. M., Gusatti, C. S., Fuentefria, D. B., et Corção, G. (2011). Presence of OXA-23-producing isolates of *Acinetobacter baumannii* in wastewater from hospitals in southern Brazil. *Microb. Drug Resist.* 17, 221–227.
- Ferreira da Silva, M., Vaz-Moreira, I., Gonzalez-Pajuelo, M., Nunes, O. C., et Manaia, C. M. (2007). Antimicrobial resistance patterns in *Enterobacteriaceae* isolated from an urban wastewater treatment plant. *FEMS Microbiol. Ecol.* 60, 166–176.
- Figueira, V., Serra, E. A., Vaz-Moreira, I., Brandão, T. R. S., et Manaia, C. M. (2012). Comparison of ubiquitous antibiotic-resistant *Enterobacteriaceae* populations isolated from wastewaters, surface waters and drinking waters. *J. Water Health* 10, 1–10.
- Figueira, V., Serra, E., et Manaia, C. M. (2011). Differential patterns of antimicrobial resistance in population subsets of *Escherichia coli* isolated from waste- and surface waters. *Sci. Total Environ.* 409, 1017–1023.
- Forsberg, K. J., Reyes, A., Wang, B., Selleck, E. M., Sommer, M. O. A., et Dantas, G. (2012). The shared antibiotic resistome of soil bacteria and human pathogens. *Science* 337, 1107–1111.
- Fuentefria, D. B., Ferreira, A. E., et Corção, G. (2011). Antibiotic-resistant *Pseudomonas aeruginosa* from hospital wastewater and superficial water: Are they genetically related? *J. Environ. Manage.* 92, 250–255.
- Galvin, S., Boyle, F., Hickey, P., Vellinga, A., Morris, D., et Cormican, M. (2010). Enumeration and characterization of antimicrobial-resistant *Escherichia coli* bacteria in effluent from municipal, hospital, and secondary treatment facility sources. *Appl. Environ. Microbiol.* 76, 4772–4779.
- Gao, P., Mao, D., Luo, Y., Wang, L., Xu, B., et Xu, L. (2012a). Occurrence of sulfonamide and tetracycline-resistant bacteria and resistance genes in aquaculture environment. *Water Res.* 46, 2355–2364.
- Gao, P., Munir, M., et Xagoraki, I. (2012b). Correlation of tetracycline and sulfonamide antibiotics with corresponding resistance genes and resistant bacteria in a conventional municipal wastewater treatment plant. *Sci. Total Environ.* 421–422, 173–183.
- Gaze, W. H., Abdousslam, N., Hawkey, P. M., et Wellington, E. M. H. (2005). Incidence of class 1 integrons in a quaternary ammonium compound-polluted environment. *Antimicrob. Agents Chemother.* 49, 1802–1807.

- 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., *et al.* (2011). Impacts of anthropogenic activity on the ecology of class 1 integrons and integron-associated genes in the environment. *ISME J.* 5, 1253–1261.
- Ghosh, S., Ramsden, S. J., et LaPara, T. M. (2009). The role of anaerobic digestion in controlling the release of tetracycline resistance genes and class 1 integrons from municipal wastewater treatment plants. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 84, 791–796.
- Gillings, M. R., Krishnan, S., Worden, P. J., et Hardwick, S. A. (2008a). Recovery of diverse genes for class 1 integron-integrases from environmental DNA samples. *FEMS Microbiol. Lett.* 287, 56–62.
- Gillings, M. R., Xuejun, D., Hardwick, S. A., Holley, M. P., et Stokes, H. W. (2008b). Gene cassettes encoding resistance to quaternary ammonium compounds: a role in the origin of clinical class 1 integrons? *ISME J.* 3, 209–215.
- Goñi-Urriza, M., Capdepuy, M., Raymond, N., Quentin, C., et Caumette, P. (1999). Impact of an urban effluent on the bacterial community structure in the Arga River (Spain), with special reference to culturable Gram-negative rods. *Can. J. Microbiol.* 45, 826–832.
- Gotoh, H., Kasaraneni, N., Devineni, N., Dallo, S. F., et Weitao, T. (2010). SOS involvement in stress-inducible biofilm formation. *Biofouling* 26, 603–611.
- Gotz, A., et Smalla, K. (1997). Manure enhances plasmid mobilization and survival of *Pseudomonas putida* introduced into field soil. *Appl. Environ. Microbiol.* 63, 1980–1986.
- Grabow, W. O. K., van Zyl, M., et Prozesky, O. W. (1976). Behaviour in conventional sewage purification processes of coliform bacteria with transferable or non-transferable drug-resistance. *Water Res.* 10, 717–723.
- Gu, B., Pan, S., Wang, T., Zhao, W., Mei, Y., Huang, P., et Tong, M. (2008). Novel cassette arrays of integrons in clinical strains of *Enterobacteriaceae* in China. *Int. J. Antimicrob. Agents* 32, 529–533.
- Guardabassi, L., Petersen, A., Olsen, J. E., et Dalsgaard, A. (1998). Antibiotic resistance in *Acinetobacter* spp. isolated from sewers receiving waste effluent from a hospital and a pharmaceutical plant. *Appl. Environ. Microbiol.* 64, 3499–3502.
- Guerin, E., Cambray, G., Sanchez-Alberola, N., Campoy, S., Erill, I., Da Re, S., Gonzalez-Zorn, B., Barbé, J., Ploy, M.-C., et Mazel, D. (2009). The SOS response controls integron recombination. *Science* 324, 1034.
- Guo, X., Xia, R., Han, N., et Xu, H. (2011). Genetic diversity analyses of class 1 integrons and their associated antimicrobial resistance genes in *Enterobacteriaceae* strains recovered from aquatic habitats in China. *Lett. App. Microbiol.* 52, 667–675.
- Hall, B. G., et Barlow, M. (2004). Evolution of the serine beta-lactamases: past, present and future. *Drug Resist. Update* 7, 111–123.

Bibliographie

- Hammes, F., Berney, M., Wang, Y., Vital, M., Köster, O., et Egli, T. (2008). Flow-cytometric total bacterial cell counts as a descriptive microbiological parameter for drinking water treatment processes. *Water Res.* 42, 269–277.
- Harbarth, S., Harris, A. D., Carmeli, Y., et Samore, M. H. (2001). Parallel analysis of individual and aggregated data on antibiotic exposure and resistance in gram-negative bacilli. *Clin. Infect. Dis.* 33, 1462–1468.
- Hardwick, S. A., Stokes, H. W., Findlay, S., Taylor, M., et Gillings, M. R. (2008). Quantification of class 1 integron abundance in natural environments using real-time quantitative PCR. *FEMS Microbiol. Lett.* 278, 207–212.
- Henriques, I. D. S., et Love, N. G. (2007). The role of extracellular polymeric substances in the toxicity response of activated sludge bacteria to chemical toxins. *Water Res.* 41, 4177–4185.
- Heuer, H., Focks, A., Lamshöft, M., Smalla, K., Matthies, M., et Spiteller, M. (2008). Fate of sulfadiazine administered to pigs and its quantitative effect on the dynamics of bacterial resistance genes in manure and manured soil. *Soil Biol. Biochem.* 40, 1892–1900.
- Heuer, H., Schmitt, H., et Smalla, K. (2011). Antibiotic resistance gene spread due to manure application on agricultural fields. *Curr. Opin. Microbiol.* 14, 236–243.
- Heuer, H., et Smalla, K. (2007). Manure and sulfadiazine synergistically increased bacterial antibiotic resistance in soil over at least two months. *Environ. Microbiol.* 9, 657–666.
- Huang, J.-J., Hu, H.-Y., Tang, F., Li, Y., Lu, S.-Q., et Lu, Y. (2011a). Inactivation and reactivation of antibiotic-resistant bacteria by chlorination in secondary effluents of a municipal wastewater treatment plant. *Water Res.* 45, 2775–2781.
- Igbinosa, E. O., Odjadjare, E. E., Igbinosa, I. H., Orhue, P. O., Omoigberale, M. N. O., et Amhanre, N. I. (2012). Antibiotic synergy interaction against multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* isolated from an abattoir effluent environment. *The Scientific World Journal* 2012.
- Iwane, T., Urase, T., et Yamamoto, K. (2001). Possible impact of treated wastewater discharge on incidence of antibiotic resistant bacteria in river water. *Water Sci. Technol.* 43, 91–99.
- Jensen, L. B., Baloda, S., Boye, M., et Aarestrup, F. M. (2001). Antimicrobial resistance among *Pseudomonas* spp. and the *Bacillus cereus* group isolated from Danish agricultural soil. *Environ. Int.* 26, 581–587.
- Jungfer, C., Schwartz, T., et Obst, U. (2007). UV-induced dark repair mechanisms in bacteria associated with drinking water. *Water Res.* 41, 188–196.
- Keskes, S., Hmaied, F., Gannoun, H., Bouallagui, H., Godon, J. J., et Hamdi, M. (2012). Performance of a submerged membrane bioreactor for the aerobic treatment of abattoir wastewater. *Bioresour. Technol.* 103, 28–34.
- Klappenbach, J. A., Saxman, P. R., Cole, J. R., et Schmidt, T. M. (2001). rrndb: the ribosomal RNA operon copy number database. *Nucleic Acids Res.* 29, 181–184.

- Knapp, C. W., Dolfing, J., Ehlert, P. A. ., et Graham, D. W. (2010). Evidence of increasing antibiotic resistance gene abundances in archived soils since 1940. *Environ. Sci. Technol.* 44, 580–587.
- Knapp, C. W., McCluskey, S. M., Singh, B. K., Campbell, C. D., Hudson, G., et Graham, D. W. (2011). Antibiotic resistance gene abundances correlate with metal and geochemical conditions in archived Scottish soils. *PLoS ONE* 6, e27300.
- Koczura, R., Mokracka, J., Jabłońska, L., Gozdecka, E., Kubek, M., et Kaznowski, A. (2012). Antimicrobial resistance of integron-harboring *Escherichia coli* isolates from clinical samples, wastewater treatment plant and river water. *Sci. Total Environ.* 414, 680–685.
- Koenraad, P. M., Jacobs-Reitsma, W. F., Van der Laan, T., Beumer, R. R., et Rombouts, F. M. (1995). Antibiotic susceptibility of *Campylobacter* isolates from sewage and poultry abattoir drain water. *Epidemiol. Infect.* 115, 475–483.
- Kohanski, M. A., DePristo, M. A., et Collins, J. J. (2010). Sublethal antibiotic treatment leads to multidrug resistance via radical-induced mutagenesis. *Mol. Cell* 37, 311–320.
- Kopmann, C., Jechalke, S., Rosendahl, I., Groeneweg, J., Krögerrecklenfort, E., Zimmerling, U., Weichelt, V., Siemens, J., Amelung, W., Heuer, H., et al. (2012). Abundance and transferability of antibiotic resistance as related to the fate of sulfadiazine in maize rhizosphere and bulk soil. *FEMS Microbiol. Ecol.* in press.
- Kümmerer, K. (2001). Drugs in the environment: emission of drugs, diagnostic aids and disinfectants into wastewater by hospitals in relation to other sources--a review. *Chemosphere* 45, 957–969.
- Kümmerer, K. (2004). Resistance in the environment. *J. Antimicrob. Chemother.* 54, 311–320.
- Kümmerer, K., et Henninger, A. (2003). Promoting resistance by the emission of antibiotics from hospitals and households into effluent. *Clin. Microbiol. Infect.* 9, 1203–1214.
- Kunz, A. N., et Brook, I. (2010). Emerging resistant Gram-negative aerobic bacilli in hospital-acquired infections. *Chemotherapy* 56, 492–500.
- Lapara, T. M., Burch, T. R., McNamara, P. J., Tan, D. T., Yan, M., et Eichmiller, J. J. (2011). Tertiary-treated municipal wastewater is a significant point source of antibiotic resistance genes into Duluth-superior harbor. *Environ. Sci. Technol.* 45, 9543–9549.
- Laurent, J., Jaziri, K., Guignard, R., Casellas, M., et Dagot, C. (2011). Comprehensive insight of the performances of excess sludge reduction by 90 °C thermal treatment coupled with activated sludge at pilot scale: COD and N removal, bacterial populations, fate of heavy metals. *Process Biochem.* 46, 1808–1816.
- Lee, A., McVey, J., Faustino, P., Lute, S., Sweeney, N., Pawar, V., Khan, M., Brorson, K., et Hussong, D. (2010). Use of *Hydrogenophaga pseudoflava* penetration to quantitatively assess the impact of filtration parameters for 0.2-micrometer-pore-size filters. *Appl. Environ. Microbiol.* 76, 695–700.

Bibliographie

- Li, D., Yang, M., Hu, J., Zhang, J., Liu, R., Gu, X., Zhang, Y., et Wang, Z. (2009). Antibiotic-resistance profile in environmental bacteria isolated from penicillin production wastewater treatment plant and the receiving river. *Environ. Microbiol.* 11, 1506–1517.
- Li, D., Yu, T., Zhang, Y., Yang, M., Li, Z., Liu, M., et Qi, R. (2010). Antibiotic resistance characteristics of environmental bacteria from an oxytetracycline production wastewater treatment plant and the receiving river. *Appl. Environ. Microbiol.* 76, 3444–3451.
- López-Lozano, J.-M., Monnet, D. L., Yagüe, A., Burgos, A., Gonzalo, N., Campillos, P., et Saez, M. (2000). Modelling and forecasting antimicrobial resistance and its dynamic relationship to antimicrobial use: a time series analysis. *Int. J. Antimicrob. Agents* 14, 21–31.
- Łuczkiwicz, A., Jankowska, K., Fudala-Książek, S., et Olańczuk-Neyman, K. (2010). Antimicrobial resistance of fecal indicators in municipal wastewater treatment plant. *Water Res.* 44, 5089–5097.
- Luo, Y., Mao, D., Rysz, M., Zhou, Q., Zhang, H., Xu, L., et J J Alvarez, P. (2010). Trends in antibiotic resistance genes occurrence in the Haihe River, China. *Environ. Sci. Technol.* 44, 7220–7225.
- Lupo, A., Coyne, S., et Berendonk, T. U. (2012). Origin and evolution of antibiotic resistance: the common mechanisms of emergence and spread in water bodies. *Front. Microbiol.* 3, 18.
- Ma, Y., Wilson, C. A., Novak, J. T., Riffat, R., Aynur, S., Murthy, S., et Pruden, A. (2011). Effect of various sludge digestion conditions on sulfonamide, macrolide, and tetracycline resistance genes and class I integrons. *Environ. Sci. Technol.* 45, 7855–7861.
- Marti, E., Monclús, H., Jofre, J., Rodriguez-Roda, I., Comas, J., et Balcázar, J. L. (2011). Removal of microbial indicators from municipal wastewater by a membrane bioreactor (MBR). *Bioresour. Technol.* 102, 5004–5009.
- Martínez, J. L. (2008). Antibiotics and antibiotic resistance genes in natural environments. *Science* 321, 365–367.
- Martínez, J. L. (2009a). Environmental pollution by antibiotics and by antibiotic resistance determinants. *Environ. Pollut.* 157, 2893–2902.
- Martínez, J. L. (2009b). The role of natural environments in the evolution of resistance traits in pathogenic bacteria. *Proc. Biol. Sci.* 276, 2521–2530.
- Martínez, J. L., Fajardo, A., Garmendia, L., Hernandez, A., Linares, J. F., Martínez-Solano, L., et Sánchez, M. B. (2009). A global view of antibiotic resistance. *FEMS Microbiol. Rev.* 33, 44–65.
- Martins da Costa, P. M., Vaz-Pires, P. M., et Bernardo, F. M. (2006). Antibiotic resistance of *Enterococcus* spp. isolated from wastewater and sludge of poultry slaughterhouses. *J. Environ. Sci. Health B* 41, 1393–1403.

- Mathee, K., Narasimhan, G., Valdes, C., Qiu, X., Matewish, J. M., Koehrsen, M., Rokas, A., Yandava, C. N., Engels, R., Zeng, E., *et al.* (2008). Dynamics of *Pseudomonas aeruginosa* genome evolution. *PNAS* 105, 3100–3105.
- McGhee, G. C., et Sundin, G. W. (2011). Evaluation of kasugamycin for fire blight management, effect on nontarget bacteria, and assessment of kasugamycin resistance potential in *Erwinia amylovora*. *Phytopathology* 101, 192–204.
- McManus, P. S., Stockwell, V. O., Sundin, G. W., et Jones, A. L. (2002). Antibiotic use in plant agriculture. *Annu. Rev. Phytopathol.* 40, 443–465.
- Meckes, M. C. (1982). Effect of UV light disinfection on antibiotic-resistant coliforms in wastewater effluents. *Appl. Environ. Microbiol.* 43, 371–377.
- Merlin, C., Bonot, S., Courtois, S., et Block, J.-C. (2011). Persistence and dissemination of the multiple-antibiotic-resistance plasmid pB10 in the microbial communities of wastewater sludge microcosms. *Water Res.* 45, 2897–2905.
- Mokracka, J., Koczura, R., Pawlowski, K., et Kaznowski, A. (2011). Resistance patterns and integron cassette arrays of *Enterobacter cloacae* complex strains of human origin. *J. Med. Microbiol.* 60, 737–743.
- Mølbak, L., Molin, S., et Kroer, N. (2007). Root growth and exudate production define the frequency of horizontal plasmid transfer in the Rhizosphere. *FEMS Microbiol. Ecol.* 59, 167–176.
- Moura, A., Henriques, I., Ribeiro, R., et Correia, A. (2007). Prevalence and characterization of integrons from bacteria isolated from a slaughterhouse wastewater treatment plant. *J. Antimicrob. Chemother.* 60, 1243–1250.
- Moura, A., Henriques, I., Smalla, K., et Correia, A. (2010). Wastewater bacterial communities bring together broad-host range plasmids, integrons and a wide diversity of uncharacterized gene cassettes. *Res. Microbiol.* 161, 58–66.
- Moura, A., Oliveira, C., Henriques, I., Smalla, K., et Correia, A. (2012). Broad diversity of conjugative plasmids in integron-carrying bacteria from wastewater environments. *FEMS Microbiol. Lett.* 330, 157–164.
- Moura, A., Pereira, C., Henriques, I., et Correia, A. (2011). Novel gene cassettes and integrons in antibiotic-resistant bacteria isolated from urban wastewaters. *Res. Microbiol.* 163, 92–100.
- Mullany, P., Roberts, A. P., et Aarts, H. J. M. (2011). Acquired antibiotic resistance genes: an overview. *Front. Microbiol.* 2, 203.
- Munir, M., Wong, K., et Xagorarakis, I. (2011). Release of antibiotic resistant bacteria and genes in the effluent and biosolids of five wastewater utilities in Michigan. *Water Res.* 45, 681–693.
- Muyzer, G., de Waal, E. C., et Uitterlinden, A. G. (1993). Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. *Appl. Environ. Microbiol.* 59, 695–700.

Bibliographie

- Ndi, O. L., et Barton, M. D. (2011). Incidence of class 1 integron and other antibiotic resistance determinants in *Aeromonas* spp. from rainbow trout farms in Australia. *J. Fish Dis.* 34, 589–599.
- Nemergut, D. R., Martin, A. P., et Schmidt, S. K. (2004). Integron diversity in heavy-metal-contaminated mine tailings and inferences about integron evolution. *Appl. Environ. Microbiol.* 70, 1160–1168.
- Novo, A., et Manaia, C. (2010). Factors influencing antibiotic resistance burden in municipal wastewater treatment plants. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 87, 1157–1166.
- O'Hara, A. M., et Shanahan, F. (2006). The gut flora as a forgotten organ. *EMBO Rep.* 7, 688–693.
- Oberlé, K., Capdeville, M.-J., Berthe, T., Budzinski, H., et Petit, F. (2012). Evidence for a complex relationship between antibiotics and antibiotic-resistant *Escherichia coli*: from medical center patients to a receiving environment. *Environ. Sci. Technol.* 46, 1859–1868.
- Ort, C., Lawrence, M. G., Reungoat, J., Eaglesham, G., Carter, S., et Keller, J. (2010). Determining the fraction of pharmaceutical residues in wastewater originating from a hospital. *Water Res.* 44, 605–615.
- Park, J.-W., et Crowley, D. E. (2006). Dynamic changes in *nahAc* gene copy numbers during degradation of naphthalene in PAH-contaminated soils. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 72, 1322–1329.
- Passerat, J., Tamtam, F., Le Bot, B., Eurin, J., Chevreuil, M., et Servais, P. (2010). Antimicrobials and faecal bacteria resistant to antimicrobials in the rivers of the Seine River watershed: Impacts of hospital effluents. *Journal Europeen d'Hydrologie* 41, 1–13.
- Paulsen, I. T., Littlejohn, T. G., Rådström, P., Sundström, L., Sköld, O., Swedberg, G., et Skurray, R. A. (1993). The 3' conserved segment of integrons contains a gene associated with multidrug resistance to antiseptics and disinfectants. *Antimicrob. Agents Chemother.* 37, 761–768.
- Pauwels, B., Fru Ngwa, F., Deconinck, S., et Verstraete, W. (2006). Effluent quality of a conventional activated sludge and a membrane bioreactor system treating hospital wastewater. *Environ. Technol.* 27, 395–402.
- Pharmaceuticals input and elimination from local sources: Final report of the European cooperation project PILLS (2012). Available at: <http://www.pills-project.eu/>.
- Poirel, L., Brinas, L., Verlinde, A., Ide, L., et Nordmann, P. (2005a). BEL-1, a novel clavulanic acid-inhibited extended-spectrum β -lactamase, and the class 1 integron In120 in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 49, 3743–3748.
- Poirel, L., Carattoli, A., Bernabeu, S., Bruderer, T., Frei, R., et Nordmann, P. (2010). A novel IncQ plasmid type harbouring a class 3 integron from *Escherichia coli*. *J. Antimicrob. Chemother.* 65, 1594–1598.

- Poirel, L., Kämpfer, P., et Nordmann, P. (2002). Chromosome-encoded Ambler class A beta-lactamase of *Kluyvera georgiana*, a probable progenitor of a subgroup of CTX-M extended-spectrum beta-lactamases. *Antimicrob. Agents Chemother.* 46, 4038–4040.
- Poirel, L., Rodriguez-Martinez, J.-M., Mammeri, H., Liard, A., et Nordmann, P. (2005b). Origin of plasmid-mediated quinolone resistance determinant QnrA. *Antimicrob. Agents Chemother.* 49, 3523–3525.
- Poirel, L., Weldhagen, G. F., Naas, T., De Champs, C., Dove, M. G., et Nordmann, P. (2001). GES-2, a Class A β -Lactamase from *Pseudomonas aeruginosa* with Increased Hydrolysis of Imipenem. *Antimicrob. Agents Chemother.* 45, 2598–2603.
- Poole, T. L., Hume, M. E., Campbell, L. D., Scott, H. M., Alali, W. Q., et Harvey, R. B. (2005). Vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* strains isolated from community wastewater from a semiclosed agri-food system in Texas. *Antimicrob. Agents Chemother.* 49, 4382–4385.
- Rahube, T. O., et Yost, C. K. (2010). Antibiotic resistance plasmids in wastewater treatment plants and their possible dissemination into the environment. *Afr. J. Biotechnol.* 9, 9183–9190.
- Ramirez, M. S., et Tolmasky, M. E. (2010). Aminoglycoside modifying enzymes. *Drug Resist. Update* 13, 151–171.
- Reinthaler, F. ., Posch, J., Feierl, G., Wüst, G., Haas, D., Ruckebauer, G., Mascher, F., et Marth, E. (2003). Antibiotic resistance of *E. coli* in sewage and sludge. *Water Res.* 37, 1685–1690.
- Ridgway, H. F., et Olson, B. H. (1982). Chlorine resistance patterns of bacteria from two drinking water distribution systems. *Appl. Environ. Microbiol.* 44, 972–987.
- Roberts, R. R., Hota, B., Ahmad, I., Scott, R. D., 2nd, Foster, S. D., Abbasi, F., Schabowski, S., Kampe, L. M., Ciavarella, G. G., Supino, M., et al. (2009). Hospital and societal costs of antimicrobial-resistant infections in a Chicago teaching hospital: implications for antibiotic stewardship. *Clin. Infect. Dis.* 49, 1175–1184.
- Rosewarne, C. P., Pettigrove, V., Stokes, H. W., et Parsons, Y. M. (2010). Class 1 integrons in benthic bacterial communities: Abundance, association with Tn402-like transposition modules and evidence for coselection with heavy-metal resistance. *FEMS Microbiol. Ecol.* 72, 35–46.
- Salyers, A. A., Gupta, A., et Wang, Y. (2004). Human intestinal bacteria as reservoirs for antibiotic resistance genes. *Trends Microbiol.* 12, 412–416.
- Schmieder, R., et Edwards, R. (2012). Insights into antibiotic resistance through metagenomic approaches. *Future Microbiol.* 7, 73–89.
- Schwartz, T., Kohnen, W., Jansen, B., et Obst, U. (2003). Detection of antibiotic-resistant bacteria and their resistance genes in wastewater, surface water, and drinking water biofilms. *FEMS Microbiol. Ecol.* 43, 325–335.

Bibliographie

- Schwartz, T., Volkmann, H., Kirchen, S., Kohnen, W., Schön-Hölz, K., Jansen, B., et Obst, U. (2006). Real-time PCR detection of *Pseudomonas aeruginosa* in clinical and municipal wastewater and genotyping of the ciprofloxacin-resistant isolates. *FEMS Microbiol. Ecol.* 57, 158–167.
- Sharma, D. R., Pradhan, B., et Mishra, S. K. (2010). Multiple drug resistance in bacterial isolates from liquid wastes generated in central hospitals of Nepal. *Kathmandu Univ. Med. J.* 8, 40–44.
- Siegrist, H. (2003). Micropolluant-Le traitement des eaux usées face à un nouveau défi ? *EWAG news* 50, 7–10.
- Da Silva, M. F., Tiago, I., Veríssimo, A., Boaventura, R. A. R., Nunes, O. C., et Manaia, C. M. (2006). Antibiotic resistance of enterococci and related bacteria in an urban wastewater treatment plant. *FEMS Microbiol. Ecol.* 55, 322–329.
- Skurnik, D., Le Menac'h, A., Zurakowski, D., Mazel, D., Courvalin, P., Denamur, E., Andremont, A., et Ruimy, R. (2005). Integron-associated antibiotic resistance and phylogenetic grouping of *Escherichia coli* isolates from healthy subjects free of recent antibiotic exposure. *Antimicrob. Agents Chemother.* 49, 3062–3065.
- Skurnik, D., Ruimy, R., Andremont, A., Amorin, C., Rouquet, P., Picard, B., et Denamur, E. (2006). Effect of human vicinity on antimicrobial resistance and integrons in animal faecal *Escherichia coli*. *J. Antimicrob. Chemother.* 57, 1215–1219.
- Sommer, M. O. A., Dantas, G., et Church, G. M. (2009). Functional characterization of the antibiotic resistance reservoir in the human microflora. *Science* 325, 1128–1131.
- Sørensen, S. J., Bailey, M., Hansen, L. H., Kroer, N., et Wuertz, S. (2005). Studying plasmid horizontal transfer in situ: a critical review. *Nat. Rev. Microbiol.* 3, 700–710.
- De Souza, M.-J., Nair, S., Loka Bharathi, P. A., et Chandramohan, D. (2006). Metal and antibiotic-resistance in psychrotrophic bacteria from Antarctic Marine waters. *Ecotoxicology* 15, 379–384.
- Stokes, H., et Hall, R. (1989). A novel family of potentially mobile DNA elements encoding site-specific gene-integration functions: integrons. *Mol. Microbiol.* 3, 1669–1683.
- Stokes, H. W., et Gillings, M. (2011). Gene flow, mobile genetic elements and the recruitment of antibiotic resistance genes into Gram-negative pathogens. *FEMS Microbiol. Rev.* 35, 790–819.
- Stokes, H. W., Martinez, E., Chowdhury, P. R., et Djordjevic, S. (2012). Class 1 integron-associated spread of resistance regions in *Pseudomonas Aeruginosa*: plasmid or chromosomal platforms? *J. Antimicrob. Chemother.* 67, 1799–1800.
- Szczepanowski, R., Linke, B., Krahn, I., Gartemann, K.-H., Gützkow, T., Eichler, W., Pühler, A., et Schlüter, A. (2009). Detection of 140 clinically relevant antibiotic-resistance genes in the plasmid metagenome of wastewater treatment plant bacteria showing reduced susceptibility to selected antibiotics. *Microbiology* 155, 2306–2319.

- Tamminen, M., Karkman, A., Löhmus, A., Muziasari, W. I., Takasu, H., Wada, S., Suzuki, S., et Virta, M. (2011). Tetracycline resistance genes persist at aquaculture farms in the absence of selection pressure. *Environ. Sci. Technol.* 45, 386–391.
- Taviani, E., Ceccarelli, D., Lazaro, N., Bani, S., Cappuccinelli, P., Colwell, R. R., et Colombo, M. M. (2008). Environmental *Vibrio* spp., isolated in Mozambique, contain a polymorphic group of integrative conjugative elements and class 1 integrons. *FEMS Microbiol. Ecol.* 64, 45–54.
- Taylor, N. G. H., Verner-Jeffreys, D. W., et Baker-Austin, C. (2011). Aquatic systems: maintaining, mixing and mobilising antimicrobial resistance? *Trends Ecol. Evol.* 26, 278–284.
- Tennstedt, T., Szczepanowski, R., Braun, S., Pühler, A., et Schlüter, A. (2003). Occurrence of integron-associated resistance gene cassettes located on antibiotic resistance plasmids isolated from a wastewater treatment plant. *FEMS Microbiol. Ecol.* 45, 239–252.
- Tenover, F. C. (2006). Mechanisms of antimicrobial resistance in bacteria. *Am. J. Infect. Control.* 34, S3-10; discussion S64-73.
- Toomey, N., Monaghan, A., Fanning, S., et Bolton, D. (2009). Transfer of antibiotic resistance marker genes between lactic acid bacteria in model rumen and plant environments. *Appl. Environ. Microbiol.* 75, 3146–3152.
- Tuméo, E., Gbaguidi-Haore, H., Patry, I., Bertrand, X., Thouverez, M., et Talon, D. (2008). Are antibiotic-resistant *Pseudomonas aeruginosa* isolated from hospitalised patients recovered in the hospital effluents? *Int. J. Hyg. Environ. Health* 211, 200–204.
- Vander Stichele, R. H., Elseviers, M. M., Ferech, M., Blot, S., et Goossens, H. (2006). Hospital consumption of antibiotics in 15 European countries: results of the ESAC Retrospective Data Collection (1997-2002). *J. Antimicrob. Chemother.* 58, 159–167.
- Vetting, M. W., Hegde, S. S., Zhang, Y., et Blanchard, J. S. (2011). Pentapeptide-repeat proteins that act as topoisomerase poison resistance factors have a common dimer interface. *Acta Crystallogr. Sect. F Struct. Biol. Cryst. Commun.* 67, 296–302.
- Volkman, H., Schwartz, T., Bischoff, P., Kirchen, S., et Obst, U. (2004). Detection of clinically relevant antibiotic-resistance genes in municipal wastewater using real-time PCR (TaqMan). *J. Microbiol. Methods* 56, 277–286.
- Watanabe, T. (1963). Infective heredity of multiple drug resistance in bacteria. *Bacteriol. Rev.* 27, 87–115.
- Wax, R. G. (2008). *Bacterial resistance to antimicrobials*. 2nd éd. Boca Raton: CRC Press.
- Witte, W. (2000). Ecological impact of antibiotic use in animals on different complex microflora: environment. *Int. J. Antimicrob. Agents* 14, 321–325.
- Wozniak, R. A. F., et Waldor, M. K. (2010). Integrative and conjugative elements: mosaic mobile genetic elements enabling dynamic lateral gene flow. *Nat. Rev. Microbiol.* 8, 552–563.

Bibliographie

- Wright, G. D. (2010). Antibiotic resistance in the environment: a link to the clinic? *Curr. Opin. Microbiol.* 13, 589–594.
- Wright, G. D. (2007). The antibiotic resistome: the nexus of chemical and genetic diversity. *Nat. Rev. Microbiol.* 5, 175–186.
- Wright, M. S., Baker-Austin, C., Lindell, A. H., Stepanauskas, R., Stokes, H., et McArthur, J. V. (2008). Influence of industrial contamination on mobile genetic elements: class 1 integron abundance and gene cassette structure in aquatic bacterial communities. *ISME J.* 2, 417–428.
- Xi, C., Zhang, Y., Marrs, C. F., Ye, W., Simon, C., Foxman, B., et Nriagu, J. (2009). Prevalence of antibiotic resistance in drinking water treatment and distribution systems. *Appl. Environ. Microbiol.* 75, 5714–5718.
- Xie, W., Wang, F., Guo, L., Chen, Z., Sievert, S. M., Meng, J., Huang, G., Li, Y., Yan, Q., Wu, S., et al. (2011). Comparative metagenomics of microbial communities inhabiting deep-sea hydrothermal vent chimneys with contrasting chemistries. *ISME J.* 5, 414–426.
- Xu, H., Davies, J., et Miao, V. (2007). Molecular characterization of class 3 integrons from *Delftia* spp. *J. Bacteriol.* 189, 6276–6283.
- Zacheus, O. M., Iivanainen, E. K., Nissinen, T. K., Lehtola, M. J., et Martikainen, P. J. (2000). Bacterial biofilm formation on polyvinyl chloride, polyethylene and stainless steel exposed to ozonated water. *Water Res.* 34, 63–70.
- Zanetti, F., De Luca, G., et Sacchetti, R. (2010). Performance of a full-scale membrane bioreactor system in treating municipal wastewater for reuse purposes. *Bioresour. Technol.* 101, 3768–3771.
- Zaneveld, J. R., Nemergut, D. R., et Knight, R. (2008). Are all horizontal gene transfers created equal? Prospects for mechanism-based studies of HGT patterns. *Microbiology* 154, 1–15.
- Zhang, T., Shao, M. F., et Ye, L. (2012). 454 pyrosequencing reveals bacterial diversity of activated sludge from 14 sewage treatment plants. *ISME J.* 6, 1137–1147.
- Zhang, T., Zhang, X. X., et Ye, L. (2011). Plasmid metagenome reveals high levels of antibiotic resistance genes and mobile genetic elements in activated sludge. *PLoS ONE* 6, e26041.
- Zhang, X., Wu, B., Zhang, Y., Zhang, T., Yang, L., Fang, H. H. P., Ford, T., et Cheng, S. (2009a). Class 1 integronase gene and tetracycline resistance genes *tetA* and *tetC* in different water environments of Jiangsu Province, China. *Ecotoxicology* 18, 652–660.
- Zhang, X. X., Zhang, T., Zhang, M., Fang, H. H. P., et Cheng, S. P. (2009b). Characterization and quantification of class 1 integrons and associated gene cassettes in sewage treatment plants. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 82, 1169–1177.
- Zhang, Y., Marrs, C. F., Simon, C., et Xi, C. (2009c). Wastewater treatment contributes to selective increase of antibiotic resistance among *Acinetobacter* spp. *Sci. Total Environ.* 407, 3702–3706.

**Annexes –1 : Informations supplémentaires de l'article :
« Dynamic assessment of the floc morphology, the bacterial
diversity and the class 1 integrons in an activated sludge
reactor processing a hospital effluent »**

Annexes –3 : Publications, communications, formations

Publications

Stalder T., Barraud O., Casellas M., Dagot C., Ploy M.C. (2012). Integron involvement in environmental spread of antibiotic resistance. *Front. Microbiol.* 3, 119. *Review article*

Païsse S., Goñi-Urriza M.S., **Stalder T.**, Budzinski H., Duran R. (2012). Ring-hydroxylating dioxygenase (RHD) expression in a microbial community during the early response to oil pollution. *FEMS Microbiol. Ecol.* 80, 77-86. *Research article*

Publications en préparation

Stalder T., Barraud O., Casellas M., Dagot C., Ploy M.C. Quantitative and qualitative impact of a hospital effluent on the mobile integron pool dissemination. *Submitted.*

Stalder T., Alrhoun M., Louvet J.N., Casellas M., Maftah C., Carrion C., Pons M.N., Ploy M.C., Dagot C. Dynamic assessment of the floc morphology, the bacterial diversity and a specific bacterial genetic support constitutive of an activated sludge processing an hospital effluent. *Submitted.*

Louvet J.N., Carrion C., **Stalder T.**, Potier O., Pons M.N., Dagot C. Antibiotics sorption on activated sludge; 3D CLSM time-lapse imaging of the vancomycin case.

Jaziri K., **Stalder T.**, Casellas M., Dagot . Thorough study of the effects of low thermal treatment on waste activated sludge structure, activity and microbiological diversity. (Under revision)

Contributions à des rapports de projets

Rapport scientifique PILLS, *Pharmaceuticals input and elimination from local sources: Scientific report of the European cooperation project PILLS, 2012.* www.pills-project.eu

Rapport final PILLS, *Pharmaceuticals input and elimination from local sources: Final report of the European cooperation project PILLS, 2012.* www.pills-project.eu

Rapport scientifique SIPIBEL, *Effluents hospitaliers et station d'épuration urbaine : caractérisation, risques environnementaux et sanitaires, traitabilité.*
<http://www.graie.org/graie/sipibelpublic/a-sipibel.htm>

Communications scientifiques

2012

T. Stalder, O. Barraud, M. Casellas, C. Dagot, M. Ploy. Influence of hospital effluents advanced treatment processes on the reduction of a genetic element involved in the antibiotic resistance issue. *9th International congress of the GRUTTEE, October 29–31, 2012, Aix-en-Provence (France)*. **Oral presentation**

M. Alrhoun, J.N Louvet, **T. Stalder**, M. N. Pons, M. Casellas, C. Dagot. Traitement à la source d'eaux usées hospitalières par boues activées : faisabilité et impacts sur la biomasse. *Polluants émergents : quels défis pour une meilleure gestion de l'eau ? XIV congress of the French society of process engineering (SFGP), November 2012, Poitiers (France)*. **Oral presentation**

M.G. Urriza, S. Païssé, **T. Stalder**, A. Courtiès, R. Duran. Fast adaptive response of sediment microbial communities to an oil input. *14th International Symposium on Microbial Ecology, ISME14, August 19-24, 2012, Copenhagen (Denmark)*. **Poster**

X. Bellanger, H. Guilloteau, **T. Stalder**, S. Bonot, M-C. Ploy, and C. Merlin. Persistence and dissemination of the multiple-antibiotic-resistance plasmid pB10 in complex environmental communities. *3rd ASM Conference on Antimicrobial Resistance in Zoonotic Bacteria and Foodborne Pathogens, June 26–29, 2012, Aix-en-Provence (France)*. **Oral presentation**

T. Stalder, O. Barraud, M. Casellas, M. Gaschet, C. Dagot, and M.C. Ploy. Integrons into the discharged water from slaughterhouses. *3rd ASM Conference on Antimicrobial Resistance in Zoonotic Bacteria and Foodborne Pathogens, June 26–29, 2012, Aix-en-Provence (France)*. **Poster**

T. Stalder, O. Barraud, M. Casellas, C. Dagot, and M.C. Ploy. Abundance of class 1 integrons and diversity of their associated gene cassettes in hospital and urban effluents. *6th SETAC World Congress (Society of Environmental Toxicology and Chemistry), May 20-24, 2012, Berlin (Germany)*. **Poster**

C. Merlin, **T. Stalder**, X. Bellanger, O. Barraud, S. Bonot, M. Casellas, M. Fick, S. Pacaud, M.C. Ploy and C. Dagot. Occurrence and dissemination of antibiotic resistance genes in anthropic environments. *6th SETAC World Congress (Society of Environmental Toxicology and Chemistry), May 20-24, 2012, Berlin (Germany)*. **Oral presentation**

M. Alrhoun, J.N Louvet, **T. Stalder**, M. N. Pons, **M. Casellas**, C. Dagot. Traitement à la Source d'Eaux Usées Hospitalières par Boues Activées: Faisabilité et Impact sur la Biomasse. *Polluants émergents 2012- congrès SFGP, February 1-2, 2012, Nantes (France)*. **Oral presentation**

2011

Stalder, T., **Casellas, M.**, Barraud, O., Ploy M.C. , Dagot, C. Fate of amoxicillin on an activated sludge system. *XIIIth congress of the French society of process engineering (SFGP), November 29-December 1, 2011, Lille (France)*. **Oral presentation**

M.G. Urriza, S. Païssé, **T. Stalder**, A. Courtiès, R. Duran. Première réponse adaptative, structurale et fonctionnelle, des communautés microbiennes sédimentaires à une contamination pétrolière. *5^{ème} colloque de l'AFEM, November 14-16, 2011, Hammamet (Tunisie)*. **Oral presentation**

T. Stalder, O. Barraud, M. Casellas, M. Lapouge, C. Dagot, and M.C. Ploy. Diversity of class 1 integrons gene cassettes in hospital and urban effluents. *51st Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy (ICAAC). September 17–20, 2011, Chicago-Illinois (USA)*. **Oral presentation**

T. Stalder, O. Barraud, M. Casellas, C. Dagot, and M.C. Ploy. Are wastewater treatment plants effective for antibiotic-resistant integrons elimination? *4th Symposium on Antimicrobial Resistance in Animals and the Environment (ARAE), June 27-29, 2011, Tours (France)*. **Oral presentation**

T. Stalder, O. Barraud, M. Casellas, C. Dagot, and M.C. Ploy. Quantification of mobile integrons in manure and slurry of an experimental biological farm. *4th Symposium on Antimicrobial Resistance in Animals and the Environment (ARAE), June 27-29, 2011, Tours (France)*. **Poster**

T. Stalder, O. Barraud, M. Casellas, M. C. Ploy, C. Dagot. Prévalence des intégrons de multirésistance dans les effluents hospitaliers. *2^{ème} colloque francophone PLUridisciplinaire sur les Matériaux, l'Environnement et l'Electronique (PLUMEE 2011), 30 June 1, 2011, Limoges (France)*. **Poster**

O. Barraud, **T. Stalder**, L. Melayers, C. Dagot, and M.C. Ploy. Novel class 3 Integron in an *Acinetobacter johnsonii* Isolate. *111th American Society for Microbiology (ASM) General Meeting, May 20-24, 2011, New Orleans (USA)*. **Poster**

2010

T. Stalder, O. Barraud, D. Chainier, B. Mayjonnade, M. Casellas, M. C. Ploy, C. Dagot. Assessment of the health risk of the hospitals effluents in the spread of the antibiotic resistance by the integrons research. *IWA Specialist Conference «Water and Wastewater Treatment Plants in Towns and Communities of the XXI Century: Technologies, Design and Operation», June 2-4, 2010, Moscow (Russia)*. **Oral presentation**

T. Stalder, O. Barraud, M. Casellas, C. Dagot, and M.C. Ploy. Prevalence of class 1 and 2 integrons from the hospital effluent to the river; a potential hazard for human health? *15^e Colloque sur le Contrôle Epidémiologique des Maladies Infectieuses (CEMI), May 17-18, 2010, Institut Pasteur Paris (France)*. **Poster**

Formations suivies pendant la thèse

Formations professionnelles :

Les outils méthodologiques pour optimiser son CV (3h)

Préparer un entretien d'embauche (3h)

Savoir identifier ses compétences et ses aptitudes, les exprimer et les valoriser dans sa future recherche d'emploi (4h)

Définir son projet professionnel pour déterminer sa stratégie de recherche d'emploi (3h)

Thèse électronique (3h)

Management de groupe (14h)

Les carrières universitaires et de la recherche publique (3h)

Formations thématiques :

Séminaire thématique 1 : Biostatistiques (14h)

Séminaire thématique 2 : Échantillonnage et mesure en environnement (14h)

Séminaire thématique 3 : Imagerie Fonctionnelle (14h)

Formations spécialisées :

Séminaire du GRESE (7h)

Formation REACH: (7h)

Séminaire du GRESE (7h)

Résumé :

Ce travail a permis d'évaluer la contribution et l'influence des activités hospitalières et d'élevage sur la dissémination de l'antibiorésistance dans l'environnement, au travers du suivi de la dynamique d'éléments génétiques utilisés comme biomarqueurs de l'antibiorésistance : les intégrons de résistance (IR). Ainsi, de nombreux résidus biologiques solides et liquides d'origines anthropiques et géographiques diverses peuvent participer à la dissémination de l'antibiorésistance. Les effluents hospitaliers présentent des proportions plus élevées d'IR, et contribuent à l'apport de 14% des IR arrivant dans les stations d'épuration municipales, néanmoins les effluents urbains représentent la fraction majoritaire. La caractérisation des cassettes de gènes de résistance hébergées par ces IR, a mis à jour des gènes de résistance bien spécifiques dans les effluents hospitaliers, alors que les effluents urbains participent à l'apport d'une plus grande diversité de gènes dont des gènes codant pour des résistances multiples (BLSE). Les procédés de traitement actuels éliminent une fraction des IR mais n'empêchent pas des IR d'origine anthropique de rejoindre l'environnement. De plus, une étude pilote a révélé que le traitement des effluents hospitaliers par ces procédés à boues activées induit une augmentation des IR et de bactéries potentiellement pathogènes au sein des boues d'épuration, soulevant la problématique de la dissémination de l'antibiorésistance au sein de ces matrices. Finalement la mise en exergue de ce biomarqueur pour évaluer des procédés de traitement avancés des effluents hospitaliers (bioréacteur membranaires, ozonation, charbon actif), a montré l'efficacité des bioréacteurs membranaires par ultrafiltration pour réduire à la fois les bactéries et les IR d'origine anthropique.

Mots clés : antibiorésistance, intégrons, effluents hospitaliers, procédé de traitement

Involvement of the hospital effluents and the meat industry on the spread of antibiotic resistance: dynamic of the integrons from the source to the release.

Abstract :

This work aims to assess the global contribution and influence of hospital activities and livestock industries on the dissemination of antibiotic resistance in the environment. For this purpose, the dynamics of a genetic element used as a biomarker of antibiotic resistance, the resistance integrons (RI), was monitored. Indeed, a wide range of solids and liquids biological wastes from different geographical and anthropogenic origins are involved in the antibiotic resistance dissemination. However, we showed that hospital effluents contained a high proportion of RIs in bacterial communities, and the gene cassette (GC) content of class 1 RI mainly showed antibiotic resistance GCs. Hospital effluent contributed to 14% of the RIs introduced in the waste water treatment plant (WWTP). While urban effluents diluted the risk associated with hospital effluent, RIs harboring GCs of clinical interest, such as ESBL-encoding GCs, were found in these effluents unaffected by medical and industrial activities. The WWTP did not reduce the proportion of RIs in treated effluents but eliminated a fraction of the bulk of GCs from the influent. Large quantities of RIs harboring antibiotic-resistance GCs, and also GCs with unknown functions were released daily into the environment. In addition, a pilot study showed that the treatment of hospital wastewater by the activated sludge process promoted the increase of IR and potentially pathogenic bacteria in the sewage sludge, and consequently increased the issue of antibiotic- resistance spread in these matrices. Finally the use of RI as biomarker to assess the efficiency of advanced treatment processes for hospital effluents (membrane bioreactor ozonation, activated carbon) highlighted the effectiveness of membrane bioreactors using ultrafiltration to reduce both bacteria and IR of anthropogenic origins.

Keywords: antibiotic resistance, integron, hospital effluents, treatment process